

# **Rolle des EAG-Kaliumkanals bei der Retinat-induzierten Differenzierung und Proliferationshemmung in humanen Neuroblastomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Norbert Meyer**

geboren am 09. November 1979 in Karl-Marx-Stadt

5. Dezember 2006

Gutachter

1: .....

2: .....

3: .....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

# Verzeichnis der Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Erklärung</i>
ACh	Acetylcholin
$C_{Zelle}$	Kapazität der Zelle
$Ca^{2+}$	Kalziumionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAG	eather à go go
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)tetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure
HERG	human eather à go go related gene
$K^+$	Kaliumionen
I	Stromstärke
$I_{Na}$	Natriumstrom
$I_{EAG}$	EAG-Strom
$I_{VZ}$	verzögerter Gleichrichterstrom
$I_{HERG}$	HERG-Strom
$IC_{50}$	halb-maximale inhibitorische Wirkkonzentration
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
KCl	Kaliumchlorid
Kv-Kanäle	spannungsgesteuerte (voltage-gated) Kaliumkanäle
$Mg^{2+}$	Magnesiumionen
$Na^+$	Natriumionen
PI	Phosphatidylinositole
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
RNA	Ribonucleinsäure
RXR	Rexinoid
RAR	Retinoid acid
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
$V_{mem}$	Membranpotential
VG	Verzögerter Gleichrichter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Neuroblastome . . . . .	12
2.2 Retinate . . . . .	13
2.2.1 Mechanismus der Signaltransduktion durch Retinat . . . . .	14
2.2.2 Klinische Bedeutung der Retinate . . . . .	16
2.2.3 Beeinflussung der PI3-Kinase durch Retinate . . . . .	17
2.3 Ionenkanäle . . . . .	18
2.3.1 Kaliumkanäle . . . . .	19
2.3.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle . . . . .	20
2.3.3 Der EAG-Kanal . . . . .	22
2.3.4 Physiologische Funktion der EAG-Kanäle . . . . .	24
2.3.5 Die verzögerten Gleichrichter-Kanäle . . . . .	25
2.3.6 ERG-Kanäle . . . . .	26
2.4 Mechanismen zur Regulation der Zellproliferation . . . . .	27
2.4.1 Rolle des Membranpotentials bei der Tumorgenese . . . . .	27
2.4.2 Rolle des Kalziumeinstroms bei der Tumorgenese . . . . .	28
2.4.3 Rolle des Zellvolumens bei der Tumorgenese . . . . .	28
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>30</b>
<b>4 Materialien und Methoden</b>	<b>32</b>
4.1 Zellkulturen . . . . .	32
4.1.1 Kultivierung der Zelllinien . . . . .	32
4.1.2 Transiente Transfektion . . . . .	33
4.2 Elektrophysiologische Messungen . . . . .	33

4.2.1	Strommessungen . . . . .	36
4.3	Morphologische Analyse der Zellen . . . . .	37
4.3.1	Fixierung der Zellen . . . . .	37
4.3.2	Fotografieren der Zellen mittels Autofluoreszenzmikroskopie . . . . .	37
4.3.3	Fotografieren der Zellen mittels <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
5.1	Charakterisierung von Kalium- und Natriumströmen in Neuroblastomzellen	39
5.2	Auswirkungen von Retinat auf spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumströme . . . . .	48
5.3	Retinateffekt auf stabile mit hEAG1 transfizierte Zellklone der Zelllinie SH-SY5Y . . . . .	52
5.4	Retinate und ihre Wirkung auf die Zelldifferenzierung . . . . .	59
5.5	Involvierung der PI3-Kinase in der Regulation von EAG . . . . .	68
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
6.1	Zusammenhänge zwischen EAG-Kanälen, Proteinkinasen und Retinaten . . . . .	77
6.1.1	Retinate beeinflussen EAG-Kanäle mittels transkriptioneller Kontrolle . . . . .	77
6.1.2	Beeinflussung der EAG-Kanäle durch PI3-Kinasen . . . . .	80
6.2	Rolle des EAG-Kanals bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung . . . . .	82
6.2.1	Einfluss von EAG auf die Zellproliferation . . . . .	83
6.2.2	Einfluss von EAG auf die Zelldifferenzierung . . . . .	84
6.3	Zusammenhang zwischen EAG, Retinat, PI3-Kinasen, Zelldifferenzierung und Proliferation . . . . .	86
6.4	Aktueller therapeutischer Einsatz von Retinaten . . . . .	87
<b>7</b>	<b>Zusammenfassende Schlussfolgerungen</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>101</b>
9.1	Danksagung . . . . .	101
9.2	Lebenslauf . . . . .	102
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	103

# Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Isomere des Retinats</i> . . . . .	13
2.2	<i>Mechanismus der Transkriptionskontrolle durch RAR/RXR Heterodimere (Altucci und Gronemeyer 2001)</i> . . . . .	15
2.3	<i>Beeinflussung der Tumorgenese durch Retinate</i> . . . . .	16
2.4	<i>Membrantopologie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle</i> . . . . .	21
2.5	<i>EAG-Familie</i> . . . . .	22
2.6	<i>Die Aktivierungskinetik von EAG ist vom Haltepotential und der extrazellulären Magnesiumkonzentration abhängig</i> . . . . .	23
2.7	<i>Die Aktivierungskinetik des verzögerten Gleichrichterstroms ist unabhängig vom Haltepotential</i> . . . . .	25
2.8	<i>Aktivierung und Inaktivierung von ERG</i> . . . . .	26
2.9	<i>Kaliumkanäle beeinflussen die Zellproliferation.</i> . . . . .	27
3.1	<i>Schwerpunkte der Arbeit</i> . . . . .	31
4.1	<i>Schritte bis zum Ganzzellpatch</i> . . . . .	35
4.2	<i>Darstellung der Kalium- und Natriumströme bei Depolarisation auf +50 mV von den Haltepotentialen -60 mV und -120 mV</i> . . . . .	36
5.1	<i>Abhängigkeit des EAG-Stromes und des verzögerten Gleichrichterstromes von der Spannung.</i> . . . . .	41
5.2	<i>ERG-Ströme in Neuroblastomzellen</i> . . . . .	42
5.3	<i>Spannungsgesteuerte Natriumkanäle in Neuroblastomzellen</i> . . . . .	43
5.4	<i>Spannungsgesteuerte Kaliumströme in verschiedenen Neuroblastomzelllinien</i> . . . . .	44
5.5	<i>Vorkommen von EAG und verzögertem Gleichrichter in verschiedenen Neuroblastomzelllinien</i> . . . . .	46

5.6	<i>Veränderung von spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumströmen mit zunehmender Kultivierungszeit</i>	47
5.7	<i>Absenkung des EAG-Stroms in SH-SY5Y und SK-N-FI Zellen unter Retinatzugabe (1µM)</i>	50
5.8	<i>Akute Applikation von Retinat</i>	51
5.9	<i>Verringerung des Ruhemembranpotentials in SH-SY5Y Zellen unter 48-stündiger 13-cis-Retinatinkubation (1µM).</i>	51
5.10	<i>Zellklone, die mit hEAG1 transfiziert wurden, besitzen mehr EAG-Strom und weniger verzögerten Gleichrichterstrom als die Kontrolle.</i>	53
5.11	<i>EAG-Ströme in mit hEAG1 transfizierten SH-SY5Y Zellen können nicht durch Retinat vollständig herunterreguliert werden.</i>	56
5.12	<i>Einfluss von 1 µM 13-cis-Retinat auf die Proliferation von SH-SY5Y Zellen und von mit EAG transfizierten stabilen Zellklonen</i>	58
5.13	<i>Mit hEAG1 transfizierte Zellklone besitzen ein positiveres Membranpotential.</i>	59
5.14	<i>Morphologische Differenzierung der Wildtypzellen SH-SY5Y nach 48-stündiger Retinatzugabe.</i>	60
5.15	<i>Morphologische Differenzierung des mit hEAG1 transfizierten Einzelzellklons A nach 48-stündiger Retinatzugabe.</i>	61
5.16	<i>Morphologische Differenzierung des mit EAG transfizierten Mischzellklons nach 48-stündiger Retinatzugabe.</i>	62
5.17	<i>Zunahme der Zellfortsatzlängen und der Natriumströme unter Retinatbehandlung bei den mit hEAG1 transfizierten Zellklonen und bei der Wildtypkontrolle</i>	64
5.18	<i>EAG-Strom von SH-SY5Y Zellen in Nährmedium mit einem Serum ohne Wachstumsfaktoren</i>	66
5.19	<i>Differenzierung der SH-SY5Y Zellen im Wachstumsfaktor-freien Medium</i>	67
5.20	<i>Die Reduktion des EAG-Stroms in SH-SY5Y Zellen ist von der PI3-Kinaseaktivität abhängig.</i>	70
5.21	<i>Blockade des EAG-Kanals mittels akuter Applikation von 1 µM LY 294002</i>	72
5.22	<i>Strukturformel von LY 294002</i>	73
5.23	<i>Erhöhung des EAG-Stromes in SH-SY5Y Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 10 µM AS 041164.</i>	74
5.24	<i>Keine Veränderung der Kaliumströme bei akuter Applikation von 10 µM AS 041164</i>	75
5.25	<i>Herunterregulation von EAG-Strom durch Überexpression der PI3-Kinasen in SH-SY5Y Zellen</i>	76

6.1	<i>Mögliche Regulationsmechanismen des EAG-Kanals . . . . .</i>	82
6.2	<i>Zusammenhänge zwischen Retinaten, PI3-Kinasen und EAG in der Beeinflussung der Zellproliferation . . . . .</i>	87
6.3	<i>Klinische Studie der Retinatbehandlung . . . . .</i>	88



# Tabellenverzeichnis

2.1	<i>Retinate und ihr therapeutischer Einsatz . . . . .</i>	17
2.2	<i>Überblick über Kaliumkanäle in Tumoren (Wang 2004) . . . . .</i>	20
5.1	<i>Überblick über Kaliumströme in verschiedenen Neuroblastomzelllinien . . . . .</i>	45
5.2	<i>Tabellarischer Überblick über die Messwerte von Abbildung 5.6 . . . . .</i>	48
5.3	<i>EAG-Stromdichten der mit hEAG1 transfizierten Klone und der Kontrolle (SH-SY5Y) . . . . .</i>	53
5.4	<i>Zunehmende Zellfortsätze und Natriumströme in SH-SY5Y Zellen unter 13-cis-Retinatinkubation (1<math>\mu</math>M) . . . . .</i>	63

# 1 Zusammenfassung

Die unterstützende Therapie mit Retinaten wird bei Patienten mit Neuroblastomen oft angewandt, um die Überlebensrate nach konventionellen therapeutischen Maßnahmen wie zytotoxische Chemotherapie oder Operation zu erhöhen. Neuroblastomzelllinien werden sehr häufig als Modell verwendet, um die molekularen Zusammenhänge der Effekte von Retinat in Neuroblastomen näher zu untersuchen. In verschiedenen humanen Neuroblastomzelllinien konnte durch Retinatinkubation eine Zelldifferenzierung und Herabsetzung der Proliferation erreicht werden.

Weiterhin ist bekannt, dass Kaliumkanäle in Neuroblastomzelllinien durch Retinate beeinflusst werden. Insbesondere der zu den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen gehörende EAG-Kanal, dem ein onkogenes Potential zugeschrieben wird, kann durch Retinate in Neuroblastomzelllinien herunterreguliert werden. Es stellte sich die Frage, ob die Reduktion des EAG-Kaliumstroms an den Retinateffekten auf die Neuroblastomzellen beteiligt sein könnte.

In dieser Arbeit kann unter Verwendung der *Whole-cell-clamp*-Technik gezeigt werden, dass EAG-Ströme in verschiedenen Neuroblastomzelllinien unter Applikation von 13-cis- und all-trans-Retinat reduziert werden können. Gleichzeitig ist eine Induktion der Zelldifferenzierung und eine Proliferationshemmung in SH-SY5Y Zellen unter Retinat beobachtet wurden.

Um zu untersuchen, ob die Ursache für die Effekte von Retinat auf die Neuroblastomzellen auf die Reduktion von EAG zurückzuführen ist, wurden stabile mit einem konstitutiven Promotor für hEAG1 transfizierte Zellklone hergestellt. Der EAG-Strom in diesen Zellen konnte durch Retinatinkubation im Gegensatz zu den ursprünglichen Zellen nicht vollständig reduziert werden und es kann gezeigt werden, dass die Proliferationsrate unter Retinat in den Zellklonen deutlich höher war als bei den Wildtypzellen. Die mit hEAG1 transfizierten Zellklone zeigten jedoch keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtypzellen bei der Retinat-induzierten Zelldifferenzierung, die mittels morphologi-

scher Analyse der Zellfortsatzlängen und durch elektrophysiologische Bestimmung der Natriumstromdichten erfasst wurde.

Der unter Retinatinkubation nicht vollständig ausschaltbare EAG-Strom in den mit hEAG1 transfizierten Zellklonen lässt auch vermuten, dass eine transkriptive Kontrolle der EAG-Kanäle durch Retinat vorliegt. Jedoch war die geringe mRNA Reduktion um den Faktor 2 bei nahezu vollständigem Verlust des EAG-Stromes nach 24-stündiger Retinatinkubation ein Hinweis darauf, dass nicht nur eine Reduktion der Translationsvorlagen für EAG eine Rolle spielt.

Da die PI3-Kinase Aktivität durch Retinate beeinflusst werden kann und bekannt ist, dass dieses Enzym einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung in Neuroblastomzellen hat, wurde eine Beeinflussung des EAG-Kanals durch PI3-Kinasen vermutet.

Es kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die mittlere EAG-Stromdichte nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen PI3-Kinase Inhibitoren jeweils um den Faktor zwei erhöhte. Außerdem zeigten transient mit PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierte SH-SY5Y Zellen eine deutliche Herabsetzung der EAG-Stromdichte.

Diese neuen Erkenntnisse, dass EAG-Kaliumkanäle in Neuroblastomen ein onkogenes Potential besitzen und mittels transkriptioneller Kontrolle durch Retinate und über die Phospholipidsignalwege reguliert werden können, stellen neue Ansatzpunkte für therapeutische Möglichkeiten von Neuroblastomen dar.

## 2 Einleitung

### 2.1 Neuroblastome

Neuroblastome sind Tumore des peripheren sympathischen Nervensystems abstammend von der Neuralleiste. Sie kommen typischer Weise bei Säuglingen oder bei Kindern vor. Die Inzidenz bezogen auf 100000 Kinder unter 15 Jahren lag 2002 in Deutschland bei 1,9% und der Anteil der Neuroblastome bezogen auf die Gesamtzahl der neu aufgetretenen Krebserkrankungen war ungefähr 8,4% (Quelle: Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, ermittelt zwischen 1993 und 2002).

Es handelt sich um einen relativ schwierig kurativ therapierbaren Tumor, dessen durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate bei 75% liegt (Quelle: Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, ermittelt zwischen 1993 und 2002). Die Prognose für Neuroblastompatienten ist abhängig vom klinischen Stadium des Tumors. Insgesamt unterscheidet man 5 Stadien, deren Einteilung von der Tumorgröße, der Tumorausbreitung im umliegenden Nervengewebe, der Absiedlung von Metastasen und der Histologie des Tumors abhängig ist. Die Behandlung der Neuroblastome basiert hauptsächlich auf konventionellen therapeutischen Maßnahmen wie z.B. Operation, Bestrahlung oder zytotoxische Chemotherapie. Unabhängig von der Therapie ist man auf der Suche nach neuen therapieunterstützenden Möglichkeiten, um die Überlebensrate zu verbessern. Neuere Ansätze könnten eine Induktion der Differenzierung der Neuroblastome und eine Verringerung der Proliferationsrate darstellen. Matthay et al. (1999) konnten in Versuchen zeigen, dass die Überlebensrate von Neuroblastompatienten signifikant verbessert werden konnte, wenn der konventionellen Therapie eine Behandlung mit 13-cis-Retinat folgte. Ähnliche Ergebnisse konnten mit verschiedenen Retinatderivaten, die in hoher Konzentration nach einer Chemotherapie verabreicht wurden, beobachtet werden (Reynolds et al. 2003). Heute ist die unterstützende Therapie mit Retinaten zum

Standard für Patienten mit einem Neuroblastomtumor im fortgeschrittenen Stadium geworden (Brodeur 2003).

## 2.2 Retinate

Retinat ist ein Derivat des fettlöslichen Vitamin A. Dieses Vitamin kommt insbesondere in Eiern, Milch und Fischöl vor. In der Schleimhaut des Dünndarms erfolgt die Resorption des Vitamins, und nach einer Veresterung wird es über die Lymphe und über das Blut in Chylomykronen zur Leber transportiert, dem Speicherort von Vitamin A. Die Mobilisierung beginnt mit der Abspaltung des Esterrestes, und danach erfolgt der Transport zu den Zielzellen, wo Vitamin A zu 11-cis-Retinat oxidiert wird. Ein geringer Teil (0.2-0.5%) des Retinats wird zu all-trans-Retinat umgewandelt.

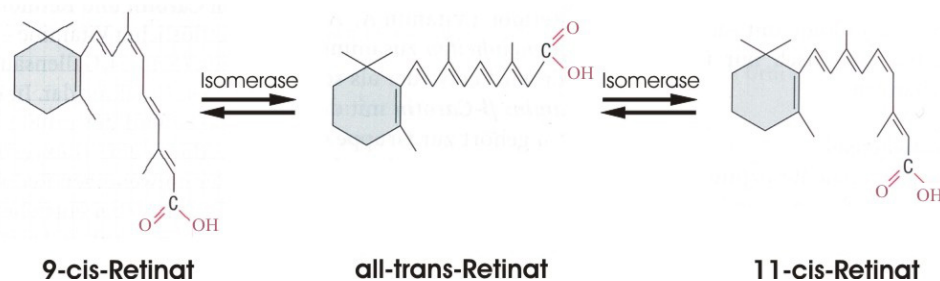


Abbildung 2.1: *Isomere des Retinats*

Dargestellt sind all-trans-Retinat und die dazugehörigen Isomere 11-cis-Retinat und 9-cis-Retinat. Chemisch sind dies drei identische Substanzen, die sich durch die geometrische Anordnung der Kohlenstoffatome an der 9. bzw. 11. Doppelbindung unterscheiden.

Für den Aufbau eines komplexen Organismus aus verschiedenen Zellarten ist während der Embryogenese ein spezifisches System für die intrazelluläre Kommunikation notwendig, um verschiedene Organsysteme anzulegen, die bestimmte physiologische Funktionen erfüllen. Retinate sind Signalmoleküle, die durch Interaktion mit ihren Rezeptoren Signale zwischen Zellen übertragen können, die für die embryonale Entwicklung notwendig sind (Niederreither et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass während einer Schwangerschaft durch die präventive Gabe von Vitamin A bestimmte kongenitale Defekte verhindert werden können (Pasqualetti und Rijli 2001). Allerdings weisen Retinate auch ab einer bestimmten Dosis eine teratogene Wirkung auf. Weiterhin spielen Retinate eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem, bei der Regulation der Organogenese und Or-

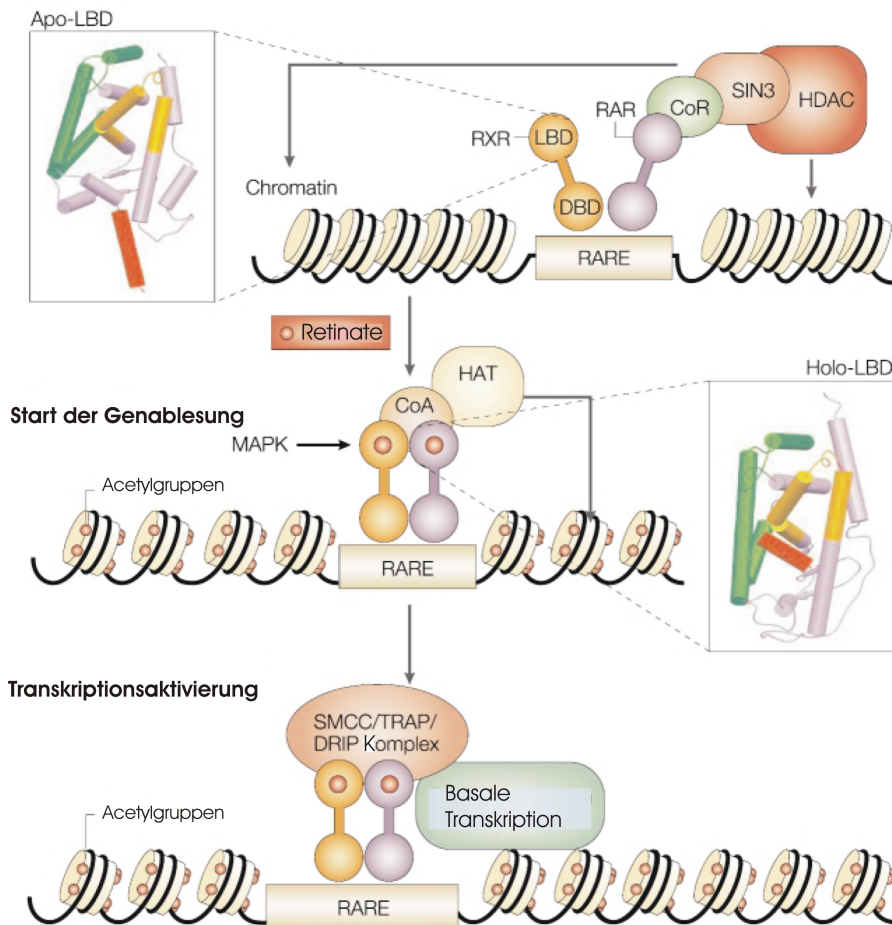
ganhomöostase sowie bei der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Apoptose (de Urquiza et al. 2000, Krezel et al. 1998).

### 2.2.1 Mechanismus der Signaltransduktion durch Retinat

Retinate entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezielle Rezeptoren, die unter anderem zur Familie der Steroidrezeptoren gehören. Diese Retinatrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die an DNA binden und die Transkription verschiedener Gene modulieren können. Die biologischen Effekte auf die Zelle werden durch zwei verschiedene intrazelluläre Rezeptorfamilien vermittelt: durch den *Retinoit Acid* Rezeptor (RAR), an dessen die endogenen Liganden all-trans- und 13-cis-Retinat binden und durch den *Rexinoid* Rezeptor (RXR), an den die endogenen Liganden 13-cis- und 9-cis-Retinat binden. Jede Rezeptorfamilie besteht aus drei Untergruppen von Rezeptoren, die sich durch unterschiedliche Carboxy- und Aminotermini unterscheiden (Rastinejad et al. 2000, Lefebvre et al. 2005).

Außerdem können *Rexinoid* Rezeptoren mit anderen Rezeptoren wie zum Beispiel Schilddrüsenhormonrezeptoren, Vitamin D Rezeptoren oder Leber-X-Rezeptoren Heterodimere bilden, wodurch die Transkription bestimmter Zielgene beeinflusst werden kann. In der Leber zum Beispiel kann über die Interaktion der Retinate mit den Leber-X-Rezeptoren der Lipidstoffwechsel geregelt werden (Norata et al. 2005). RXR und RAR spielen eine wichtige Rolle für die hormonelle Signalübertragung und haben die Fähigkeit durch Regulierung der Transkription die Expression verschiedener Gene zu modulieren (Rastinejad et al. 2000). An dieser Transkriptionskontrolle sind verschiedene Repressoren und Aktivatoren sowie die Histonacetylase beteiligt.

### Unterdrückung der Genablesung



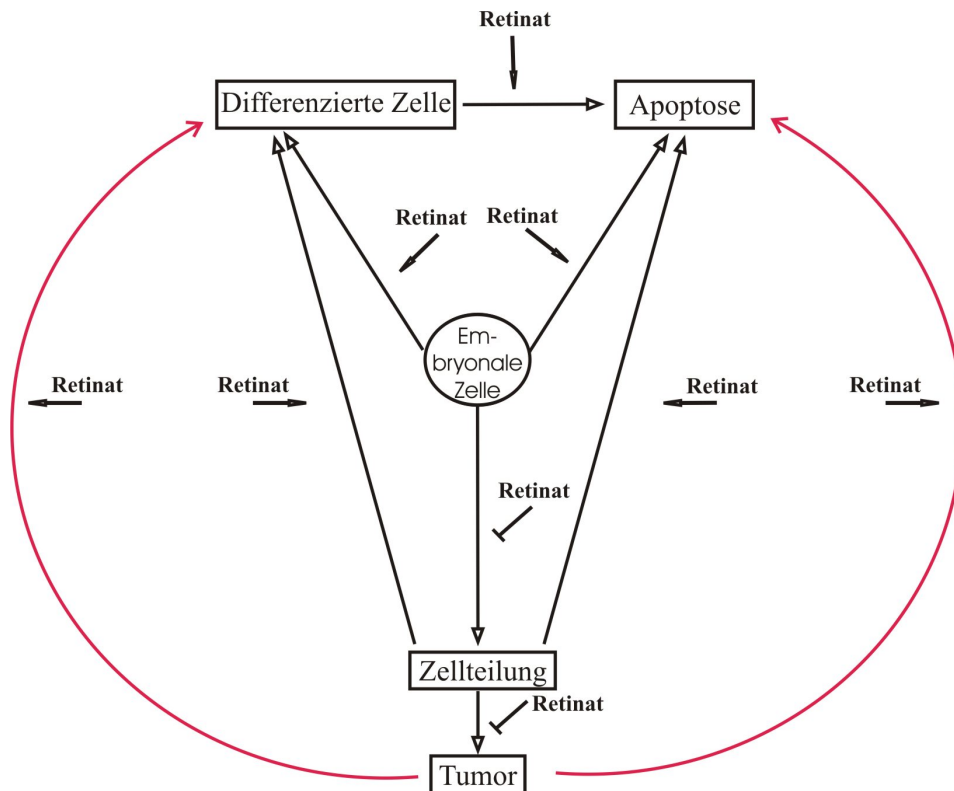
DBD: DNA-Bindungsdomäne ; LBD: Liganden-Bindungsdomäne; RARE: Retinat-Response-Element  
 LBD: ligandenbindende Domäne; HDAC: Histoneacetylase; HAT: Histonacetylase

**Abbildung 2.2:** Mechanismus der Transkriptionskontrolle durch RAR/RXR Heterodimere (Altucci und Gronemeyer 2001)

Falls keine Agonisten wie Retinat am RXR/RAR Rezeptor gebunden sind, erfolgt eine Aktivierung der Histoneacetylase (HDAC). Dieses Enzym bewirkt über eine Deacetylierung der Histone eine Kondensierung der DNA und somit findet keine Transkription statt. Bindet ein Agonist an den RXR/RAR-Rezeptor, erfolgt eine allosterische Konformationsänderung in der ligandenbindenden Domäne (LBD), wodurch sich das Apo-LBD in das Holo-LBD umwandelt. Dadurch kommt es zur Destabilisierung der Bindung der Repressoren am RXR/RAR-Rezeptor und Koaktivatoren (CoA) können sich anlagern. Diese rekrutieren die Histonacetylase (HAT), die durch Acetylierung der Histone eine Dekondensation des Chromatins bewirkt. Damit ist die Voraussetzung für die Transkription geschaffen. Ein weiterer Komplex bestehend aus einem Mediatorprotein, einem Schilddrüsenhormon-assoziierten Protein und einem Vitamin-Rezeptorinteraktionsprotein (SMCC/TRAP/DRIP Komplex) führt dazu, dass sich die basale Transkriptionsrate erhöht.

## 2.2.2 Klinische Bedeutung der Retinate

Die Apoptose wird durch verschiedene Signaltransduktionswege eingeleitet. Eine wichtige Ursache für die Entstehung von Tumoren liegt in einer Störung der Apoptose. Für die Einleitung des programmierten Zelltods spielen bestimmte interne und externe Faktoren wie Retinate eine wichtige Rolle.



**Abbildung 2.3:** *Beeinflussung der Tumorgenese durch Retinate*

Dargestellt sind unterschiedliche Angriffspunkte der Retinate, die die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Tumorgenese beeinflussen. (basierend auf dem Übersichtsartikel von Altucci und Gronemeyer (2001))

Retinate sind außerdem in der Lage, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung zu beeinflussen (Abbildung 2.3). Anhand verschiedener Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zelllinien abstammend vom Tumorgewebe unter Retinatzugabe zu differenzieren begannen und die Zellen sich langsamer teilten (Zhang und Duvic 2003, Matthay et al. 1999). Dies ist in der Klinik bei der Behandlung verschiedener Tumoren von Bedeutung. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über Tumoren, bei denen Retinat als Zusatz einer Chemotherapie oder als Prävention eingesetzt wird.



Retinat	Rezeptortyp	Tumorart	Anwendung	Erfolg
all-trans	RAR	Promyeloische Leukämie	Therapie	+++
		Leukoplakie	Vorbeugung	+++
		Zervixkarzinom	Vorbeugung	++
		Prostatakarzinom	Therapie	0
9-cis	RAR/RXR	Kaposisarkom	Therapie	+++
		Brustkarzinom	Therapie	++
		Nierenzellkarzinom	Therapie	0
13-cis	RAR/RXR	Leukoplakie	Therapie	+++
		Neuroblastom	Therapie	+++
		Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Therapie	0
		Prostatakarzinom	Therapie	+

**Tabelle 2.1:** Retinate und ihr therapeutischer Einsatz

+++ sehr gut, ++ gut, + wenig, 0 kein Effekt (Altucci und Gronemeyer 2001)

Bei einigen Tumoren, bei denen Retinat bereits als Adjuvans zur Chemotherapie verwendet wird, können sehr gute Ergebnisse wie zum Beispiel bei der Promyeloischen Leukämie (Fenaux et al. 2001, Naeem et al. 2006), bei Neuroblastomen (Matthay et al. 1999) und beim Kaposisarkom (Mitsuyasu 2000, Aboulafia et al. 2003) erzielt werden. Ebenfalls wird Retinat zur Tumorprävention beim Zervixkarzinom (Meyskens et al. 1994, Abu et al. 2005) und bei der Leukoplakie (Kraemer et al. 1988) eingesetzt. Beim Prostatakarzinom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und beim Nierenzellkarzinom konnte durch Retinat keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit bzw. Verbesserung der Lebensqualität der Patienten erreicht werden (Lippman et al. 2001, Kelly et al. 2000, Miller et al. 2000, Schrader et al. 2004).

### 2.2.3 Beeinflussung der PI3-Kinase durch Retinate

Für die Signaltransduktion besitzen Phospholipide als Signalmediatoren eine sehr große Bedeutung (Foster et al. 2003). Die chemische Struktur dieser Phospholipide kann durch verschiedene Enzyme beeinflusst werden. Hierzu zählt die Gruppe der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) (Foster et al. 2003).

Diese Enzymgruppe phosphoryliert die Position 3 des Inositolringes der Phosphatidylinositide und als Ergebnis entstehen verschiedene Phosphatidylinositid-Phosphate. Diese

Substrate erfüllen wichtige Funktionen in der Zelle wie zum Beispiel den Proteintransport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen (Fry 1994). Außerdem werden weitere Enzymkaskaden durch Phosphatidylinositid-Phosphate aktiviert, die wichtig für Proliferations- und Differenzierungsvorgänge, einhergehend mit der Regulation des Zellzyklus und der Proteinbiosynthese sind. Es konnte gezeigt werden, dass 3-phosphorylierte Phosphoinositide ursprünglich in vergleichbar hohen Konzentrationen in Tumorzellen und Mitoseaktivierten Zellen vorhanden sind, so dass man eine Funktion der PI3-Kinasen in Tumorigenese und in mitotischen Signaltransduktionen annimmt (Sasaki et al. 2000, Fry 2001).

Die Phosphoinositid-3-Kinasen werden in drei Klassen eingeteilt. Die Enzyme der Klasse I sind in der Lage, alle Phosphatidylinositole als Substrat zu verwenden. Bevorzugt wird jedoch PI-4,5-P<sub>2</sub> umgesetzt, so dass als Hauptprodukt PI-3,4,5-P<sub>3</sub> entsteht, das weitere intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Der Lokalisationsort für diese auch als Lipidkinaseaktivität beschriebene Funktion ist die Zellmembran. Ebenfalls ist für die PI3-Kinasen der Klasse I eine intrinsische Proteinkinaseaktivität beschrieben, die zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen führt. Die MAP-Kinasen werden durch die PI3-Kinasen vorwiegend im Zytosol beeinflusst. (Foster et al. 2003, Fry 1994).

Die Vertreter der Klasse II können nur PI-4-P und PI an Position 3 des Inositolringes phosphorylieren und die der Klasse III sind nur in der Lage PI umzusetzen. Für die Klasse III ist ebenfalls eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen (Foster et al. 2003).

## 2.3 Ionenkanäle

Zellen sind von Membranen eingeschlossene Funktionsräume. In den extra- und intrazellulären Räumen, die durch eine Zellmembran getrennt werden, befinden sich wässrige Salzlösungen mit Ionen als Ladungsträgern in unterschiedlichen Konzentrationen. Kationen und Anionen werden ständig durch die Zellmembran geleitet, was die Grundlage für die Regulation der elektrischen Erregbarkeit und der osmotischen Bilanz der Zellen ist. Da diese Zellmembran aus einer doppelten Lipidschicht aufgebaut ist, erfolgt der Austausch von Ionen entsprechend ihrer elektrochemischen Gradienten durch Ionenkanäle und Transporter, oder unter Energieaufwand durch Pumpen entgegen ihrer elektrochemischen Triebkraft.

Ionenkanäle sind porenbildende Proteine, die über eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen und über sehr komplexe Steuerungsmechanismen verfügen (Hille 1986, Jentsch et al. 2002). Sie können entsprechend ihrer Spezifität für verschiedene Kationen und An-

ionen sowie über ihr Öffnungsverhalten eingeteilt werden. Die Steuerung des Öffnungsverhaltens von Ionenkanälen kann durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel durch Änderung der Spannung an der Zellmembran, Ligandenbindung, mechanische Deformation des Ionenkanals oder Änderung des pH-Wertes, erfolgen (Klinke und Silbernagel 1996).

### **2.3.1 Kaliumkanäle**

Kaliumkanäle sind in einer sehr großen Vielfalt in der zytoplasmatischen Membran vertreten. Bis jetzt konnten über 20 verschiedene Typen von Kaliumkanälen identifiziert werden. Sie kommen sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen sowie in Tumorzellen vor und besitzen hinsichtlich ihrer Expression verschiedenste Funktionen wie zum Beispiel die Regulation des Membranpotentials, die Regulation der Zellgröße über Beeinflussung der Zellosmolarität, die Zellproliferation und die Apoptose.

Veränderungen in der Zusammensetzung oder Dichte der Kaliumkanäle in der Zellmembran können tiefgreifende pathophysiologische Konsequenzen mit sich bringen, wie sie zum Beispiel beim Diabetes mellitus, bei Erregungsausbreitungs- und Rückbildungsstörungen am Herzen oder bei Tumorerkrankungen vorkommen (Miller 2000). Deshalb ist es von großem Interesse, Eigenschaften von Kaliumkanälen, wie zum Beispiel Struktur und Schaltverhalten oder pharmakologische Möglichkeiten zur Beeinflussung der Kanäle zu erforschen. Außerdem versucht man die Funktion der Kaliumkanäle in Tumorzellen näher zu untersuchen, um hier mögliche Ansatzpunkte für Therapien zu finden.

Insbesondere ist die Bedeutung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen für die Zellproliferation und Tumorgenese sehr gut untersucht. Bereits 1993 konnte ein proliferationshemmender Effekt durch Kaliumkanalblockade an Neuroblastomzellen gezeigt werden (Rouzair-Dubois et al. 1993). In folgender Tabelle 2.2 ist ein kurzer Überblick über verschiedene Kaliumkanäle, die bei der Tumorgenese eine Rolle spielen, gegeben.

Kanalgruppe	Kanaltyp	Vorkommen in Tumoren
Kalziumabhängig	SK1-SK4, BK	Melanom, Astrozytom Brustkarzinom Epiphysentumor, Neuroblastom kleinzelliges Bronchialkarzinom Lymphozytom
Spannungsgesteuert	<i>Shaker</i> -Typ	Brustkarzinom Neuroblastom Prostata- und Zervixkarzinom
EAG-Familie	EAG ERG ELK	Neuroblastom, Hypophysentumor hämatopoetische Neoplasien Astrozytom, Neuroblastom, Gliom Insulinom, Lymphom
Einwärtsgleichrichter	Kir	Melanom
ATP-sensitiver Kaliumstrom	ATP	Insulinom, Medulloblastom

**Tabelle 2.2:** Überblick über Kaliumkanäle in Tumoren (Wang 2004)

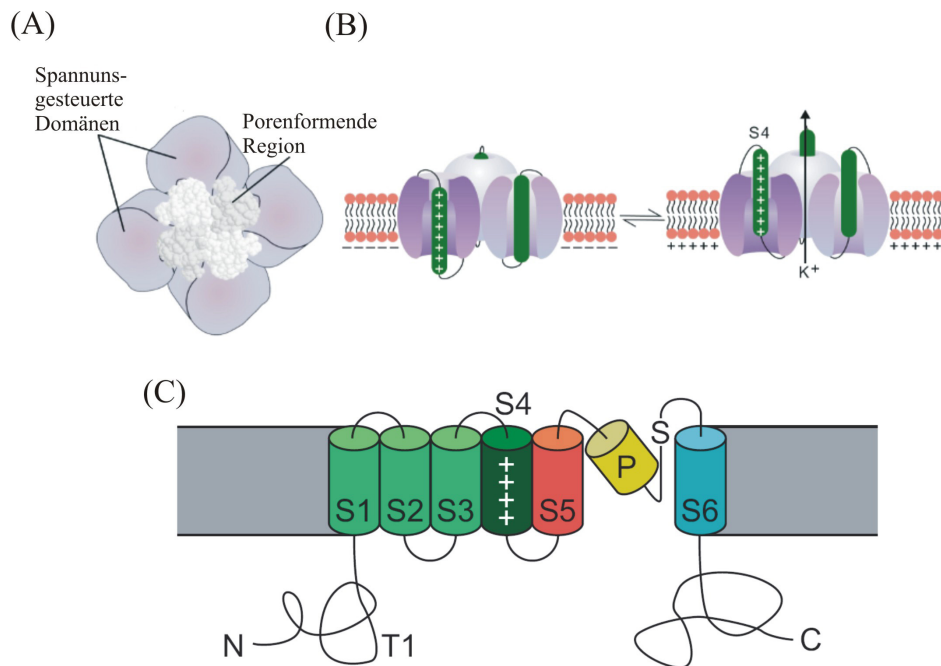
### 2.3.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Anhand struktureller Gemeinsamkeiten und der Membrantopologie der einzelnen Untereinheiten des Kanals unterscheidet man vier große Gruppen von Kaliumkanälen. Die Einteilung der Kaliumkanäle erfolgt nach der Topologie und der Anzahl der Poren. Es gibt Kaliumkanäle mit 6 transmembranalen Einheiten und einer Pore (6TM-1P), mit 6 transmembranalen Einheiten und zwei Poren (6TM-2P), mit 2 transmembranalen Einheiten und einer Pore (2TM-1P) und mit 2 transmembranalen Einheiten und zwei Poren (2TM-2P).

Allen Gruppen gemeinsam ist die so genannte Signatursequenz, die zwischen den beiden transmembranalen *Helices* mit den meisten Carboxylendigungen vorhanden ist. Außerdem sind alle Kanäle Tetramere und bestehen aus verschiedenen Transmembranabschnitten (Miller 2000).

Die Gruppen der Kaliumkanäle, die aus 6 Transmembranabschnitten (TM) aufgebaut sind, werden noch weiter unterteilt in kalziumgesteuerte und in spannungsgesteuerte Kaliumkanäle. Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal besteht aus 4 Untereinheiten (Yellen 2002). Jede Einheit ist aus 6 transmembranalen Segmenten (S1-S6) aufgebaut. Die zentrale Pore mit der Funktion eines spezifischen Filters für Kaliumionen wird von dem

Segmenten S5 und S6 gebildet. Hier befindet sich auch die Signatursequenz, die man bei allen Kaliumkanälen vorfindet. Die ersten 4 Segmente bilden einen Komplex, der das Öffnen und Schließen der Pore modulieren kann. Die ersten drei dieser Segmente sind fast vollständig über ihre gesamte Länge helikal geformt und befinden sich aufgrund ihrer hydrophoben Aminosäuren nahezu komplett in der Zellmembran. Das S4-Segment hingegen trägt positiv geladene Aminosäuren, die in jeder dritten Position aufeinander folgen. Dieses Segment wird auch als Spannungssensor bezeichnet und hat eine besondere Bedeutung bei der Erfassung des Membranpotentials (Larsson et al. 1996).



**Abbildung 2.4:** Membrantopologie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

(A) Modell der Struktur des Kanals von der extrazellulären Seite der Zellmembran betrachtet (Li-Smerin et al. 2000). (B) Funktionelle Darstellung der Auswärtsbewegung des spannungssensitiven Transmembransegmentes S4, wodurch eine Öffnung des Kaliumkanals erfolgt (Yang et al. 1996). (C) Schematische Darstellung der Membrantopologie von spannungsgesteuerten Kanälen. Die transmembranen *Helices* sind mit S1 bis S6 bezeichnet. P - Pore, S - Signatursequenz; *N-Terminus* und *C-Terminus* liegen intrazellulär (Moczydlowski 1998).

### 2.3.3 Der EAG-Kanal

Der Ausfall dieses Kanals durch Mutation führte bei *Drosophila melanogaster*-Fliegen unter Zugabe von Äther zu rhythmischen Zuckungen. Dieses Phänomen wurde als „*Ether à go-go*“ (EAG) bezeichnet.

EAG-Kaliumkanäle konnten zuerst von der *Drosophila melanogaster* (dEAG (Warmke et al. 1991) und später aus Rattengehirn (rEAG (Ludwig et al. 1994)), aus Mäusegehirn (mEAG (Warmke und Ganetzky 1994)) und aus der Netzhaut von Rindern (bEAG (Frings et al. 1998)) geklont werden. Im Menschen konnten diese EAG-Kanäle (hEAG) in Neuroblastomzellen (Meyer und Heinemann 1998) elektrophysiologisch gemessen werden und aus Myoblasten geklont werden (Occhiodoro et al. 1998).

EAG-Kanäle mit ähnlichem Öffnungsverhalten werden durch zwei unabhängige Gene (EAG1 und EAG2) codiert (Ju und Wray 2002). Der EAG-Kanal gehört zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Abbildung 2.5 zeigt eine Gruppierung von EAG-Kanälen, die auf der Grundlage von Sequenzvergleichen erfolgt. Nach heutigem Kenntnisstand umfasst die EAG-Familie insgesamt 8 Kanäle: 2 Isoformen von EAG sowie je drei Kanaluntereinheiten der Unterfamilien ERG und ELK (Warmke und Ganetzky 1994, Ganetzky et al. 1999).

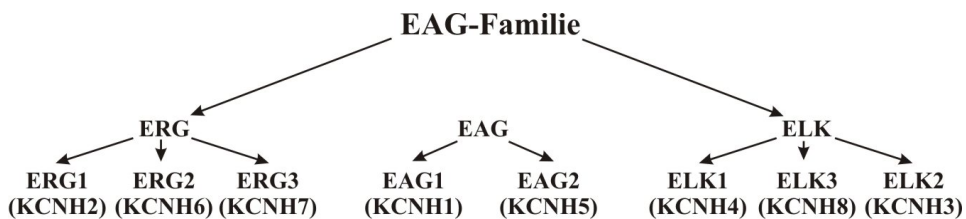
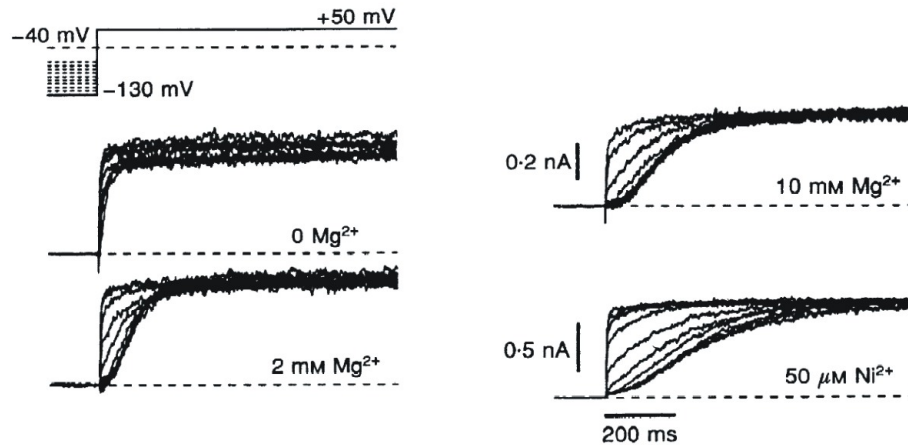


Abbildung 2.5: *EAG-Familie*

Darstellung der einzelnen Gruppen der EAG-Kanäle auf der Grundlage von Sequenzvergleichen.

Eine charakteristische Eigenschaft von EAG-Kanälen ist, dass ihre Aktivierungskinetik vom Vorpuls und der extrazellulären Konzentration von divalenten Ionen abhängig ist. Erste Untersuchungen hierzu wurden von Ludwig et al. (1994) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Depolarisation der Zellmembran die Aktivierung des EAG-Kanals bei einem Vorpuls von -80 mV relativ schnell erfolgt, während aber bei einem negativeren Vorpuls von -130 mV die Aktivierungskinetik von EAG deutlich herabgesetzt ist und die Kanalaktivierung einen langsamen, typisch sigmoiden Verlauf zeigt. Dieser Wechsel zwischen dem langsamen und schnellen Schaltmodus wird auch als Cole-Moore Effekt bezeichnet. Außerdem konnte zwei Jahre später von Terlau et al. (1996)

beobachtet werden, dass dieser Effekt durch die Anwesenheit von divalenten Kationen in der Extrazellulärflüssigkeit stark begünstigt wird. Allerdings haben  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fast keinen Einfluss auf das Aktivierungsverhalten, während  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen stärker wirken (Terlau et al. 1996).



**Abbildung 2.6:** Die Aktivierungskinetik von EAG ist vom Haltepotential und der extrazellulären Magnesiumkonzentration abhängig

Dargestellt sind die EAG-Ströme in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y bei einer Depolarisation auf +50 mV in Abhängigkeit vom Membranpotential und der Konzentration an extrazellulären divalenten Ionen. Das Membranpotential wurde in einer Breite auf -130 mV bis -40 mV in 10 mV Schritten erhöht und als extrazelluläre Ionen wurden Magnesium- und Nickelionen in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Die langsamsten Aktivierungskurven korrespondieren mit einem Vorpuls auf -130 mV während die schnellsten bei einem Vorpuls auf -40 mV vorzufinden sind (Meyer und Heinemann 1998).

Ein deutlicher Effekt ist bereits bei einer Konzentration von 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  zu erkennen, die der natürlichen Konzentration im Extrazellulärraum entspricht, so dass man auf eine Beeinflussung des EAG-Kanals bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen schließen kann. Des Weiteren wird die Regulation des EAG-Kanals durch intrazelluläres Kalzium beeinflusst. Stansfeld et al. (1996) entdeckten, dass eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration den rEAG-Kanal reversibel hemmt, so dass er unabhängig vom Membranpotential verschlossen ist. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert des intrazellulären Kalziums liegt bei 50 nM, so dass dieser Kanal bereits sehr empfindlich auf physiologische Schwankungen des Kalziums reagiert. Meyer und Heinemann konnten 1998 ebenfalls diese Beobachtungen an der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y machen, wobei diese einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von ca. 100 nM feststellten. Auch hier konnte sowohl mittels muscarinischer Stimulation mit ACh als auch direkter Kalziumbeladung der Zelle über die *Patch*pipette eine vollständige

Hemmung des Kanals erreicht werden. Von Schönherr et al (2000) konnte gezeigt werden, dass die durch Kalzium bewirkte Reduktion des EAG-Stroms auf eine Bindung von durch Kalzium aktiviertem *Calmodulin* an eine *C-terminale* Bindungsdomäne erfolgt.

### 2.3.4 Physiologische Funktion der EAG-Kanäle

Bisher ist nur relativ wenig über die physiologische Funktion des EAG-Stroms bekannt. Eine Expression von EAG findet man hauptsächlich im neuronalen Gewebe wie Gehirn, Rückenmark und Ganglien des sympathischen Nervensystems. In zahlreichen anderen Geweben, wie zum Beispiel Skelettmuskel oder inneren Organen konnte keine Expression gefunden werden. Es ist also anzunehmen, dass EAG eine wichtige Rolle in Neuronen spielt (Terlau et al. 1996). Außerdem konnten Occhiodoro et al. (1998) eine transiente Expression von EAG bei der Differenzierung von Myoblasten beobachten. Hier könnte eine Funktion von EAG für die Beeinflussung des Membranpotentials diskutiert werden, da sich das Membranpotential in Myoblasten auf etwa -10 mV von etwa -70 mV erhöht, bevor sie differenzieren. Der Einfluss von EAG auf das Ruhepotential könnte auch für die Entstehung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen. Hier weisen neuere Befunde auf pathophysiologische Funktionen des Kanals hin.

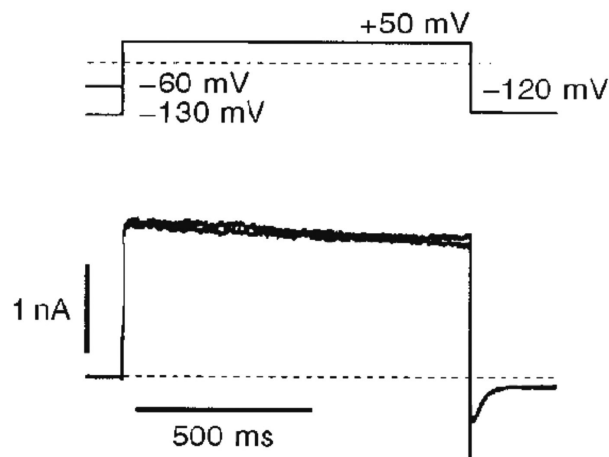
Es konnte die Transkription des EAG-Kanals in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Pardo et al. 1999). Pardo et al. (1999) hat die onkologische Bedeutung des EAG-Kanals näher untersucht und konnte mit seinen Experimenten an einer Ovarienkarzinomzelllinie demonstrieren, dass eine Hemmung der Expression des EAG-Kanals signifikant die Proliferation der Zellen herabsetzt und eine erhöhte Expression von EAG einen Proliferationsanstieg zur Folge hat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit EAG transfizierte Zellen, die in eine immunsupprimierte Maus injiziert worden sind, das Fortschreiten des Tumors begünstigen. Von Gavrilova-Ruch et al. (2002) wurde beschrieben, dass EAG eine wichtige Rolle für den Zellzyklus spielt, und es konnten Hinweise für wichtige Funktionen von EAG für die Proliferation in IGR1 Melanomzellen gefunden werden, da durch eine Blockade des EAG-Kanals mittels Imipramin die Proliferation in diesem Zellsystem deutlich reduziert werden konnte.

Alle diese genannten Befunde hinsichtlich des Einflusses von EAG auf die Zellproliferation und Expression dieses Kanals in Tumoren weisen auf sein onkologisches Potential hin.



### 2.3.5 Die verzögerten Gleichrichter-Kanäle

Diese Kanäle repräsentieren eine Klasse von Kaliumkanälen mit verschiedenem molekularem Aufbau. Zu dieser Klasse von Kaliumkanälen gehört der Kv3.1 Kanal, der in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y vorkommt. Dieser Kanal gehört ebenfalls zur Klasse der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Im Gegensatz zum EAG-Kanal ist seine Aktivierung jedoch nicht vom Vorpuls abhängig.



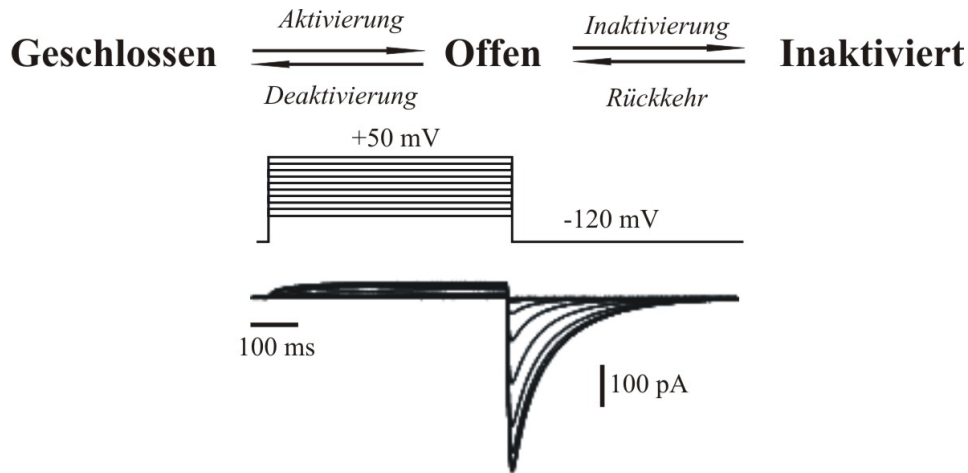
**Abbildung 2.7:** Die Aktivierungskinetik des verzögerten Gleichrichterstroms ist unabhängig vom Haltepotential

Dargestellt ist der verzögerte Gleichrichterstrom in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y bei einer Depolarisation auf + 50mV in Abhängigkeit vom Membranpotential, welches -60 mV bzw. -130 mV betrug. Zwischen diesen beiden Vorpulsen gibt es keine Unterschiede in der Aktivierungskinetik des Kaliumstroms bei Depolarisation der Zellmembran auf + 50 mV (Meyer und Heinemann 1998).

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese Kanäle eine Rolle in der Proliferation von Tumorzellen spielen (Abdul et al. 2003, Fieber et al. 2003). Blocker der verzögerten Gleichrichter-Kanäle, wie zum Beispiel Tetraethylammonium und Tamoxifen oder Diltiazem, blockieren diese Kanäle und setzen die Proliferation in verschiedenen Tumorzelllinien herab, wie zum Beispiel in Neuroblastomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Melanomen oder Lymphozytomen (Rouzaire-Dubois und Dubois 1990, Pancrazio et al. 1991, Fieber et al. 2003).

### 2.3.6 ERG-Kanäle

Der funktionelle Öffnungsmechanismus von ERG unterscheidet sich grundlegend vom Aktivierungsverhalten von EAG. Während einer Membrandepolarisation erzeugt dieser Kanal nur geringe Kaliumauswärtsströme und bleibt in der nachfolgenden Repolarisation sehr lang offen (Trudeau et al. 1995). Dieses ungewöhnliche Schaltverhalten kann damit erklärt werden, dass ein sehr schneller Inaktivierungsmechanismus vorliegt, der die Auswärtsströme sehr klein hält und nur während der Depolarisation aktiv ist.



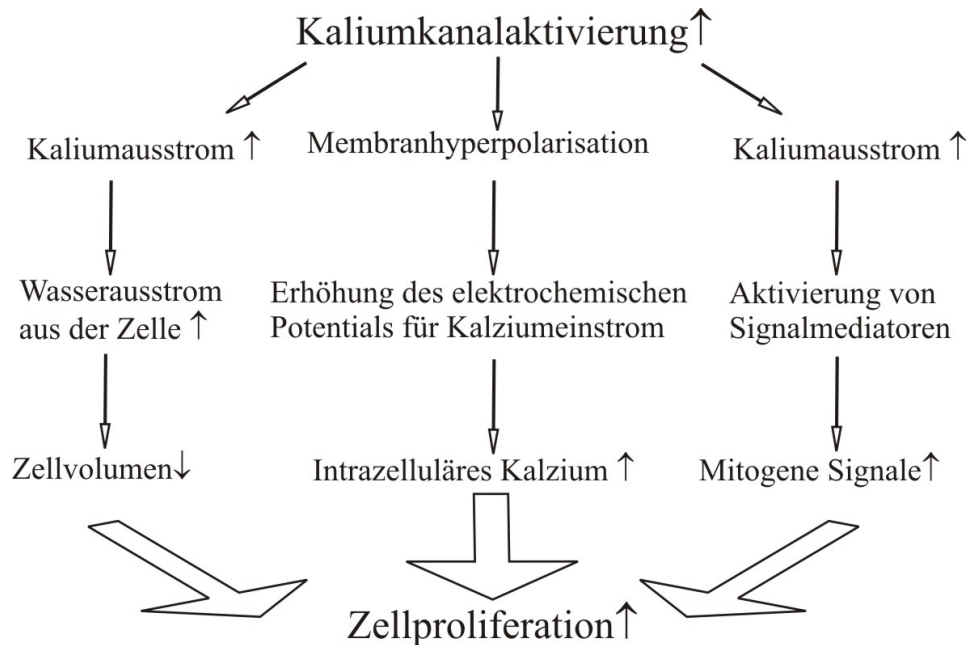
**Abbildung 2.8:** Aktivierung und Inaktivierung von ERG

Man muss annehmen, dass die Rückkehr aus dem inaktivierten Zustand schneller ist als die Deaktivierung und somit lange *tail* Ströme ermöglicht (Schönherr et al. 2000).

Physiologisch kommen ERG-Kanäle zum Beispiel in Zellen des *Glomus caroticus* (Overholt et al. 2000), *lactrotrophen* Zellen (Schafer et al. 1999), transient in Zellen der Neuralleiste (Arcangeli et al. 1997) und dem Herzen (Curran et al. 1995) vor. Im Herzen führt eine Mutation von ERG zum so genannten *Long-QT* Syndrom, das unter anderem von Curran et al. (1995) beschrieben wurde. Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine Herzrhythmusstörung auf der Grundlage der Verlängerung der QT-Zeit, die einen plötzlichen Herzstillstand zur Folge haben kann. Außerdem konnte die Expression von ERG in vielen verschiedenen Tumorzellen gefunden werden, während im gesunden Gewebe, von dem der Tumor seinen histologischen Ursprung hat, keine ERG-Kanäle gefunden werden konnten (Wang et al. 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ERG bei der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielen könnte.

## 2.4 Mechanismen zur Regulation der Zellproliferation

Die Zellproliferation kann durch Kaliumkanäle über verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Abbildung 2.9 gibt einen Überblick über mögliche Wege.



**Abbildung 2.9:** Kaliumkanäle beeinflussen die Zellproliferation.

Darstellung möglicher Mechanismen durch die Kaliumkanäle die Zellproliferation in Tumoren fördern.

↑ Erhöhung ↓ Erniedrigung

### 2.4.1 Rolle des Membranpotentials bei der Tumorgenese

Das Membranpotential, das durch Kaliumkanäle reguliert werden kann, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Bereits in den 70er Jahren hat man festgestellt, dass es Unterschiede im Membranpotential zwischen normalem Gewebe und Tumorzellen gibt; Tumorzellen haben ein niedrigeres Ruhepotential als gesunde Zellen selben histologischen Ursprungs (Redmann et al. 1972). Diese Beobachtung konnte durch mehrere Studien bestätigt werden (Binggeli und Cameron 1980, Marino et al. 1994). Durch weniger negative Membranpotentiale können spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktiviert werden, was einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Folge hat. Möglicherweise kann man sich durch diese intrazelluläre Kalziumerhöhung die Erhöhung der Prolife-

ration erklären, da Kalzium verschiedene Botenstoffe und Hormone in Zellen aktiveren kann, durch die der Zellzyklus beeinflusst wird.

Außerdem wurde von Lang et al. (1991) beschrieben, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder Bradykinin, eine Oszillation des Membranpotentials bewirken, die zu einer vorübergehenden Membranhyperpolarisation führt. Diese Membranschwankungen können für die Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen.

## 2.4.2 Rolle des Kalziumeinstroms bei der Tumorgenese

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen als intrazelluläre Botenstoffe für die Regulation verschiedener Hormonkaskaden durch Interaktion mit Signalproteinen eine sehr wichtige Rolle und können somit Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen. Kalziumeinstrom durch Kalziumkanäle und die anschließende intrazelluläre Kalziummobilisierung aus dem *glatten endoplasmatischen Retikulum* begünstigt das Tumorwachstum (Lee et al. 1994). Umgekehrt kann durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten wie Verapamil die Proliferation in verschiedenen Tumorzelllinien gehemmt werden, wie zum Beispiel in der H35 Zelllinie abstammend vom hepatozellulären Karzinom (Zhou et al. 2003) und der DLD1 Zelllinie abstammend vom Dickdarmkarzinom (Yao und Kwan 1999).

Eine Aktivierung der Kaliumkanäle führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und somit zu einer Erhöhung des elektrochemischen Gradienten für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Lepple-Wienhues et al. (1996) hatte an der Melanomzelllinie SK-MEL-28 gezeigt, dass eine Membrandepolarisation das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  herabsetzt, während es durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran erhöht wird.

Yao und Kwan et al. (1999) haben den Zusammenhang zwischen der Aktivität von Kaliumkanälen und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Karzinomzellen DLD-1, die von Dickdarmtumoren abstammen, untersucht. Sie fanden heraus, dass bereits  $50 \mu\text{M}$  Tetrapentylammonium (Kaliumkanalblocker) oder  $100 \mu\text{M}$  Verapamil (Kalziumkanalblocker) den Kalziumeinstrom von außen verhindern. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivität von Kaliumkanälen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Dickdarmkarzinomzellen hat und somit die Zellproliferation verändern kann.

## 2.4.3 Rolle des Zellvolumens bei der Tumorgenese

Rouzaire-Dubois et al. (1998) hatten gezeigt, dass Kaliumkanäle die Aktivität von Zellzyklusproteinen über das Zellvolumen beeinflussen können. Sie demonstrierten, dass Ka-

liumkanalblocker wie Tetraethylammonium und  $\text{Cs}^+$ -Ionen das Zellvolumen erhöhen und dabei die Proliferationsrate erniedrigen. Die Proliferation wird ab einer Erhöhung des Zellvolumens um 25% vollständig verhindert. Ein vermehrtes Öffnen der Kaliumkanäle führt zu einem erhöhten Kaliumausstrom aus der Zelle und damit zu einem erhöhten Wasserausstrom, so dass das Zellvolumen abnimmt.

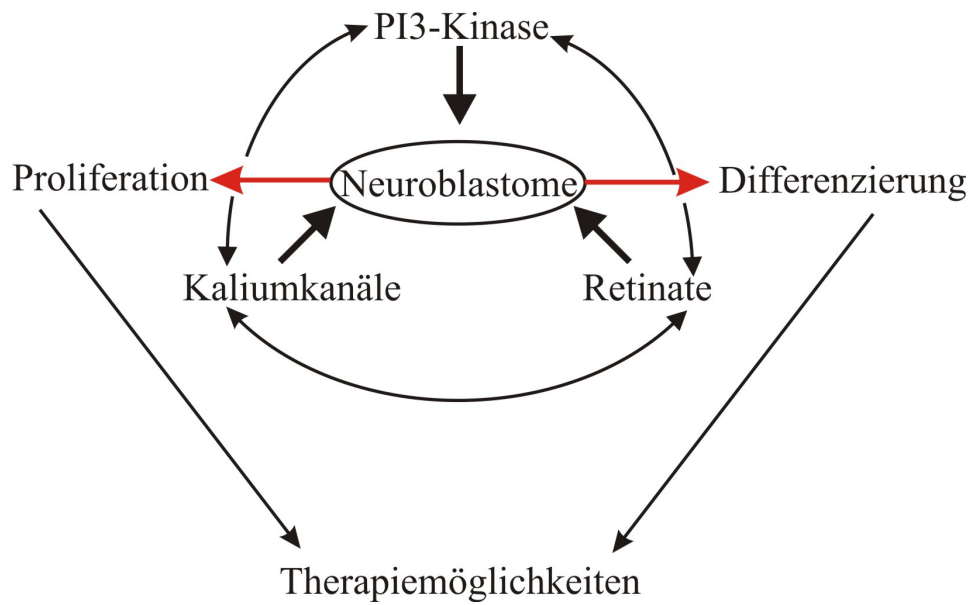
## 3 Ziele der Arbeit

Momentan ist von besonderem Interesse, ob Kaliumkanäle bei der Proliferation von Neuroblastomen eine wichtige Rolle spielen und sich dadurch eventuell neue therapeutische Wege eröffnen könnten. Mit dieser vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Zusammenhänge zwischen der Retinat-induzierten Zelldifferenzierung und Kaliumkanälen in Neuroblastomen bestehen.

Bisher ist bekannt, dass die Zellproliferation und Zelldifferenzierung in Neuroblastomzellen durch Retinate, Kaliumkanäle und PI3-Kinasen beeinflusst werden können. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob Kaliumkanäle durch Retinate reguliert werden können, und ob über diesen Mechanismus die Zelldifferenzierung und Zellproliferation von Neuroblastomzellen reguliert werden können.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die PI3-Kinase bei der Regulation von Kaliumkanälen in Neuroblastomzellen durch Retinate eine Rolle spielt.

Als Untersuchungsmodell für die Experimente wurden verschiedene Neuroblastomzelllinien verwendet.



**Abbildung 3.1:** *Schwerpunkte der Arbeit*

Gibt es Zusammenhänge zwischen der PI3-Kinase, Retinaten und Kaliumkanälen? Wie können diese die Zellproliferation und Zelldifferenzierung in Neuroblastomen beeinflussen? Eröffnen sich eventuell neue therapeutische Möglichkeiten?

# 4 Materialien und Methoden

## 4.1 Zellkulturen

### 4.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die Experimente wurden die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y, SK-N-LO, SK-N-FI, SK-N-MC, SK-PN-DW und die Melanomzelllinie IGR1 verwendet. Die Neuroblastomzelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Astrid Voigt zur Verfügung gestellt (Abteilung Pädiatrie des Klinikums Jena, Deutschland). Außerdem wurden stabile mit hEAG1 transfizierte Zellklone der SH-SY5Y Zelllinie verwendet. Diese Klone wurden von Dr. Kristina Schönherr hergestellt (MZB, Prof. Heinemann, Jena, Deutschland). Alle Zelllinien, ausgenommen der SK-N-FI und SK-N-LO Zelllinie, wurden in „Dulbecco’s Minimal Eagles Medium“ (Abkürzung: DMEM, PAA Laboratoires GmbH, Pasching, Österreich) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) unter einem atmosphärischen  $CO_2$  Anteil von 5% bei 37 °C kultiviert. Außerdem wurde anstelle des fetalen Kälberserums ein spezielles durch einen Aktivkohlefilter behandeltes Serum verwendet (FBS „Charcoal filtered“, CAMBREX, Verviers, Belgien). Die Zelllinien SK-N-FI und SK-N-LO wuchsen in einem Medium bestehend aus 50% DMEM und 50% „Ham’s F-12“ Medium (PAA Laboratoires GmbH, Pasching, Österreich) unter Zusatz von 10% FKS an. Wenn die Zellen zu ca. 80% konfluent angewachsen waren, wurden sie vom Boden der Kulturflasche mit 2 ml Trypsin (PAA Laboratoires GmbH, Pasching, Österreich) abgelöst, in PBS-Puffer (PBS(1x), 8,83 g/l NaCl, 1,26 g/l  $Na_2HPO_4^-$ , 0,302  $Na_2HPO_4$ , in ddH<sub>2</sub>O gelöst) und auf kleine Petrischalen (Durchmesser 35 mm, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Nach ca. 1-4 Tagen waren sie zu 50% konfluent angewachsen und konnten für die elektrophysiologischen Messungen oder Transfektion verwendet werden. Die Passagenanzahl zum Zeitpunkt der *Ganzzell-Patch-Clamp*-Messungen lag zwischen 3 und 15.



Außerdem wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Es wurden 13-cis-Retinat, all-trans-Retinat (beide Retinate von PAA Laboratoires GmbH, Pasching, Österreich), LY2942002 (Alexis, San Diego, CA, USA) und AS041164 (Serono, Genf, Schweiz) verwendet.

### 4.1.2 Transiente Transfektion

Für die Transfektion von SH-SY5Y Zellen mittels PI3-Kinase wurde der *Polyfect transfection reagent*-Kit (Quiagen, Valencia, Kalifornien, USA) benutzt. Das Prinzip dieser Transfektionsmethode besteht darin, dass sich durch die polykationischen Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäuren und Liposomen bilden, die in der Lage sind, die Zellmembran endozytotisch zu passieren.

Für eine 35 mm Petrieschale wurde folgendes Transfektionsprotokoll verwendet:

100  $\mu$ l serumfreies Medium (DMEM), 1  $\mu$ g PI3-Kinase-DNA, 5  $\mu$ l *Polyfect* und 0.5  $\mu$ g Marker-DNA für CD8 (Jurman et al. 1994) wurden in einem Eppendorf-Tube gemischt. Nach einer anschließenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer Zugabe von 600  $\mu$ l Medium mit 10% FKS, wurden die Zellen auf die Kulturschalen ausgesät. Das Medium wurde nach 12-16 Stunden gewechselt, und nach weiteren 24 Stunden konnten die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden. Die Markierung der transfizierten Zellen erfolgte durch Metallkügelchen mit markierten Antikörpern gegen CD8 (Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland).

Es wurde für die Transfektion Plasmid-DNA (pcDNA3) der natürlichen funktionsfähigen PI3-Kinase  $\gamma$  und einer inaktiven mutierten PI3-Kinase  $\gamma$  verwendet. Die inaktive Form der PI3-Kinase ist eine K832R-Mutante, daher an Position 832 des Proteins wurde die Aminosäure K (Lysin) gegen die Aminosäure R (Arginin) ausgetauscht. Alle Plasmide (pcDNA3) mit PI3-Kinase wurden von Dr. Tzvetanka Bondeva freundlicherweise zur Verfügung gestellt (MZ, Prof. Wetzker, Jena, Deutschland).

## 4.2 Elektrophysiologische Messungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ganzzell-Ableitungen (engl. *whole cell patch*) benutzt (Neher et al. 1978, Hamill et al. 1981). Der Messplatz war durch einen Faradayschen Käfig gegen elektrische Störfelder abgeschirmt und schwingungsarm gelagert. Über ein *Peltier*-Element (Lorenz, Messgerätebau, Lindau, Deutschland) konnte die Tempe-

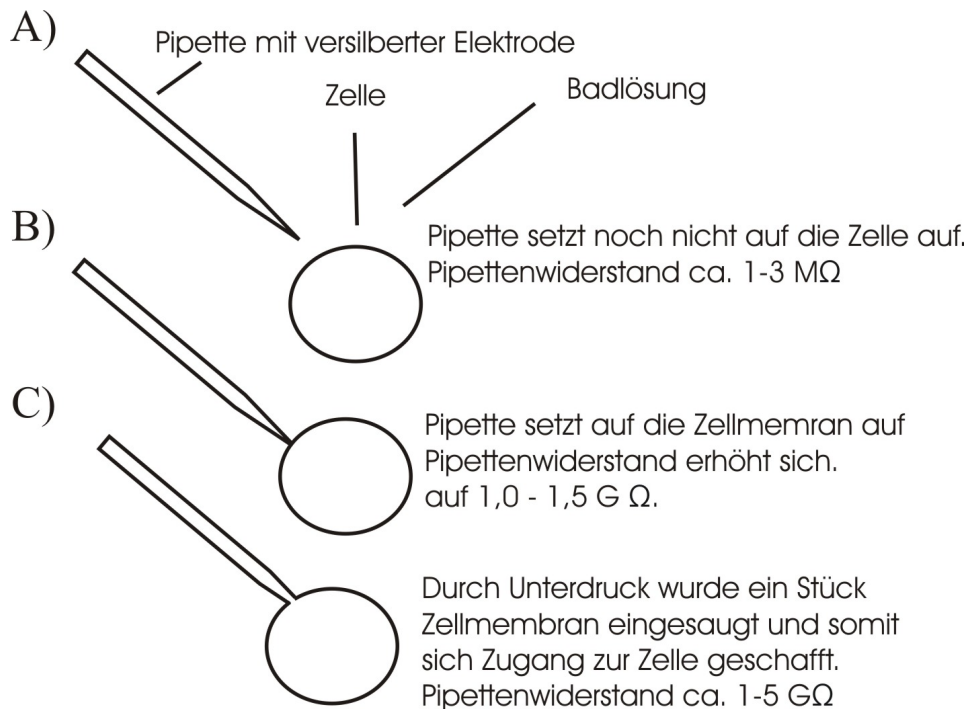
ratur der Badlösung konstant auf 20-23 °C gehalten werden, was für die Aktivität des EAG-Kanals von Bedeutung war.

Es wurden *Patch*-Pipetten mit einem Pipettenwiderstand zwischen 1,2 M $\Omega$  und 3 M $\Omega$  aus Kimble-Kimex-8.5-Glas (WPI, Sarasota, Florida, USA) mit Hilfe eines *Micropipette Puller* Model P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, Kalifornien, USA) gezogen. Anschließend wurden die Spitzen poliert, indem sie nahe an einen heißen Platin-Iridium-Draht herangefahren wurden. Danach konnten die Pipetten mit der jeweils benötigten Pipettenlösung gefüllt und über einen Ag/AgCl-Draht an einem Vorverstärker angeschlossen werden.

Anschließend wurde die Pipettenspitze vorsichtig unter einem leichten Überdruck von ca. 30 Pa unmittelbar über die Zellmembran platziert und langsam unter Kontrolle des Pipettenwiderstandes bis zum Aufsetzen auf die Zellmembran nach unten bewegt. Sichtbar wurde dies durch eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes. Es wurde der Überdruck weggenommen und ein Unterdruck von ca. -200 Pa angelegt und die Membranspannung auf ca. -60 mV bis -100 mV verringert, wodurch eine feste Adhäsion der Pipettenspitze auf der Zellmembran entstand. Der Pipettenwiderstand war in diesem Fall größer als 1 G $\Omega$ . Diese Adhäsion der *Patch*-Pipette an der Zellmembran wird auch als *Gigaseal* bezeichnet.

Um in den Ganzzell-Modus (engl. *whole cell patch*) zu gelangen, wurde durch einen kurzen Saugstoss das Membranstück unter der Pipettenöffnung in die Pipette eingesaugt, ohne die Membran-Pipetten-Abdichtung zu beschädigen. Somit konnte eine offene Verbindung zwischen der Pipette und der Zelle geschaffen werden, wodurch die Pipettenlösung in die Zelle diffundierte. Um einen Ionenaustausch zwischen dem Zellinneren und der Pipettenlösung zu erreichen, wurde ungefähr 3 Minuten gewartet, bevor die elektrophysiologischen Messungen begonnen werden konnten. Nach dieser Zeit war die Membran-Pipetten-Abdichtung meist sehr stabil und der Zugangswiderstand lag meistens zwischen 1 und 5 G $\Omega$  (Abbildung 4.1).

Um Spannungsfehler zu minimieren, erfolgte eine Kompensation des Zugangswiderstandes um mehr als 70%. Das Ausgangspotential wurde jedes Mal abgeglichen, bevor eine Membran-Pipetten-Abdichtung hergestellt wurde. Die Stromantwort auf definierte Spannungssprünge wurde über einen Verstärker (EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht) und einen AD/DA- Wandler an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet. Die Generierung der Spannungen, die an der Zellmembran anlagen, wurde mit den Programmen Pulse (HEKA Elektronik) und Patch-Master (HEKA Elektronik) durchgeführt. Das Hal-



**Abbildung 4.1:** Schritte bis zum Ganzzellpatch

Die Pipette wurde langsam auf die Zelle hinzubewegt. Ein Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran konnte durch die Erhöhung des Pipettenwiderstands registriert werden. War dieser größer 1 GΩ konnte durch einen Unterdruck an der Pipettenspitze ein Stück Membran eingesaugt werden und somit ein Zugang zur Zelle geschaffen werden.

tepotential lag bei -60 mV. Anschließend wurden verschiedene Spannungssprünge angelegt, abhängig vom jeweiligen Spannungsprotokoll.

Leck- und Kapazitätsströme wurden mit der P/n Methode korrigiert (Heinemann 1995). In den meisten Fällen wurden die Daten mit einem Tiefpassfilter bei 5 kHz gefiltert und mit 20 kHz aufgenommen. Für die nicht stationäre Rauschanalyse wurde der Strom mit 40 kHz abgetastet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen PulseFit, Pulsetools (HEKA Elektronik), Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) und Excel (Microsoft Corporation, WA, USA). Die Daten werden, falls nicht anders erwähnt, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, wobei n die Anzahl unabhängiger Experimente angibt.

Um akut Substanzen in die Badlösung zu applizieren, wurde die Badlösung mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt und dabei kontinuierlich mit einer Pipette die entsprechende Lösung dazugegeben. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, um letztendlich einen kompletten Austausch der Badlösung zu erreichen.

Die intrazelluläre Lösung, die in der Pipette vorlag, beinhaltete folgende Substanzen gelöst in destilliertem Wasser:

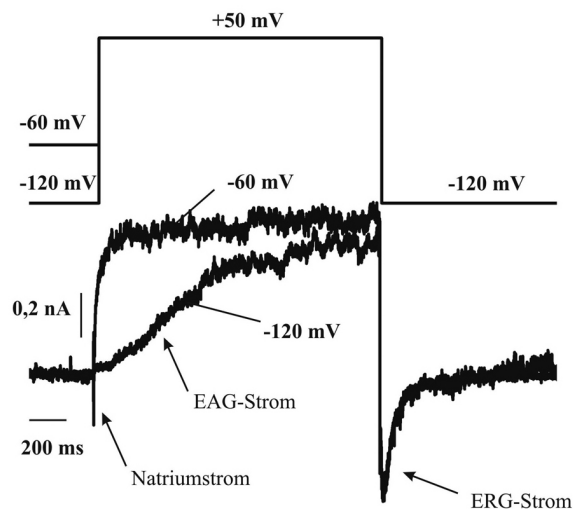
1. 130 mM KCl, 2.56 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4

Die extrazellulären Lösungen (Badlösungen) beinhalteten folgende Substanzen gelöst in destilliertem Wasser:

1. 145 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4
2. 110 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4

### 4.2.1 Strommessungen

Über die Zellmembran wurden verschiedene Spannungen angelegt und dabei die dazugehörigen Stromkurven aufgezeichnet. Um EAG-Strom in Zellen zu messen, wurde die Zellmembran unter zwei verschiedenen Vorpulsen von -60 mV und -120 mV auf +50 mV depolarisiert. Diese am häufigsten verwendeten Pulse und die dazugehörigen Stromkurven sind in Abbildung 4.2 dargestellt.



**Abbildung 4.2:** Darstellung der Kalium- und Natriumströme bei Depolarisation auf +50 mV von den Haltepotentialen -60 mV und -120 mV

Am Beginn ist ein kurzer Natriumeinstrom sichtbar, gefolgt vom EAG-Ausstrom. In der Repolarisationsphase ist der ERG-Strom als einwärtsgerichteter Strom zu erkennen.

Das Fitten von Kurven erfolgte mit dem Programm Igor Pro. In Gleichung 3.1 ist eine Exponentialfunktion abgebildet, wobei in *base* kleine und in *max* hohe Werte der *X-wave*

eingesetzt wurden.  $X_0$  ist der X-Wert, bei der Y den Wert von  $(base + max)/2$  annimmt. Der Anstieg der Funktion wird durch den Wert  $rate$  bestimmt.

$$f(x) = base + \frac{max}{1 + \exp\left(\frac{x_0 - x}{rate}\right)} \quad (3.1)$$

In Gleichung 3.2 ist eine weitere Exponentialfunktion dargestellt, mit der Kurven gefittet wurden.

$$f(x) = Y_0 + A \exp(-Bx) \quad (3.2)$$

## 4.3 Morphologische Analyse der Zellen

### 4.3.1 Fixierung der Zellen

Um die Deckgläschen auf den Objektträger zu fixieren, wurde ein Mowiol-Einbettungsmedium (Hoechst, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Für die Herstellung wurden 2 g Mowiol in 20 ml PBS-Lösung unter leichter Erwärmung 16 Stunden gerührt und anschließend 10 ml Glyzerin hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde weitere 16 Stunden gerührt. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Lösung bei 4000 rpm für 15 min bei Raumtemperatur, und es wurden 30 mg des Antibleichmittels Dabco (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan) 33480 (FLUKA, Buchs, Schweiz) hinzugefügt. Das fertige Mowiol-Einbettungsmedium wurde bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, um eine Aushärtung zu verhindern.

### 4.3.2 Fotografieren der Zellen mittels Autofluoreszenzmikroskopie

Die Fotografien erfolgten mittels Autofluoreszenzmikroskopie, wobei unspezifische Proteine in den Zellen fluoreszierten. Das von der Lichtquelle ausgesandte Licht wurde durch einen Filter geleitet, so dass die Anregungswellenlänge ungefähr 470 nm war. Die Emissionswellenlänge der Zellen betrug 575 nm. Als Lichtmikroskop kam das Axiophot-Mikroskop (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) mit aufgebauter Kamera vom Typ Hamamatsu C 4742-95 zum Einsatz. Die Aufnahme der digitalen Bilder und die Messung der Dendritenlängen erfolgte mit Hilfe des Openlab 3.1.5 Programms (Improvision Systems, USA). Diese Daten wurden mit Photoshop 7.0 (Adobe, USA) und Excel weiterverarbeitet.

### **4.3.3 Fotografieren der Zellen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie**

Es wurde das *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM) 510 (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Zusätzlich konnte das Bild mittels des Lichtmikroskops Axiovert 100 M vor-eingestellt werden. Die Wellenlänge des Lasers betrug 488 nm und die maximale Stärke war auf 15 mW eingestellt.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Charakterisierung von Kalium- und Natriumströmen in Neuroblastomzellen

Zunächst war von Interesse, Zellen von verschiedenen Neuroblastomzelllinien mittels Ganzzellmessung auf unterschiedliche Ionenströme zu untersuchen. Es ist gelungen, drei unterschiedliche Typen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle zu messen, wobei es sich bei zwei Kanälen um auswärtsgleichrichtende Kanäle und bei einem um einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal handelte. Zu den auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen zählen der schnell aktivierende verzögerte Gleichrichterkanal und der wesentlich langsamer aktivierende EAG-Kanal. Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, kann man den EAG-Strom vom verzögerten Gleichrichterstrom anhand seiner Aktivierungskinetik unterscheiden. Der EAG-Kanal aktiviert wesentlich langsamer als der verzögerte Gleichrichter und kann sicher durch seine einzigartige elektrophysiologische Eigenschaft, dem so genannten Cole-Moore Effekt identifiziert werden (Terlau et al. 1996, Meyer und Heinemann 1998). In Anwesenheit von extrazellulären  $Mg^{2+}$ -Ionen kann die Aktivierungskinetik durch eine Herabsetzung des Haltepotentials der Zellmembran verlangsamt werden. In Abbildung 5.1 A sind Stromkurven von Zellen der Neuroblastomzelllinie SK-N-FI dargestellt, die mittels Depolarisation der Zellmembran ausgehend von -100 mV in 10 mV Schritten auf +100 mV aufgenommen worden sind. Zu erkennen sind Zellen mit EAG-Strom (oberes Bild), mit verzögertem Gleichrichterstrom (unteres Bild) und beiden Strömen gleichzeitig (mittleres Bild). EAG-Kanäle zeigen eine langsamere Aktivierung, als verzögerte Gleichrichterkanäle bei einer Depolarisation der Zellmembran. Dies wird in Abbildung 5.1 D verdeutlicht, in der die Zeit, die ab dem Depolarisationspuls benötigt wird, um 80% des maximalen Auswärtsstromes zu erreichen, dargestellt ist. Bei einem Depolarisationspuls auf +50 mV, wie er in den folgenden Experimenten meistens verwendet wurde, war diese Zeit bei Zellen, die den EAG-Kanal hatten, ca. 16 ms und bei Zellen

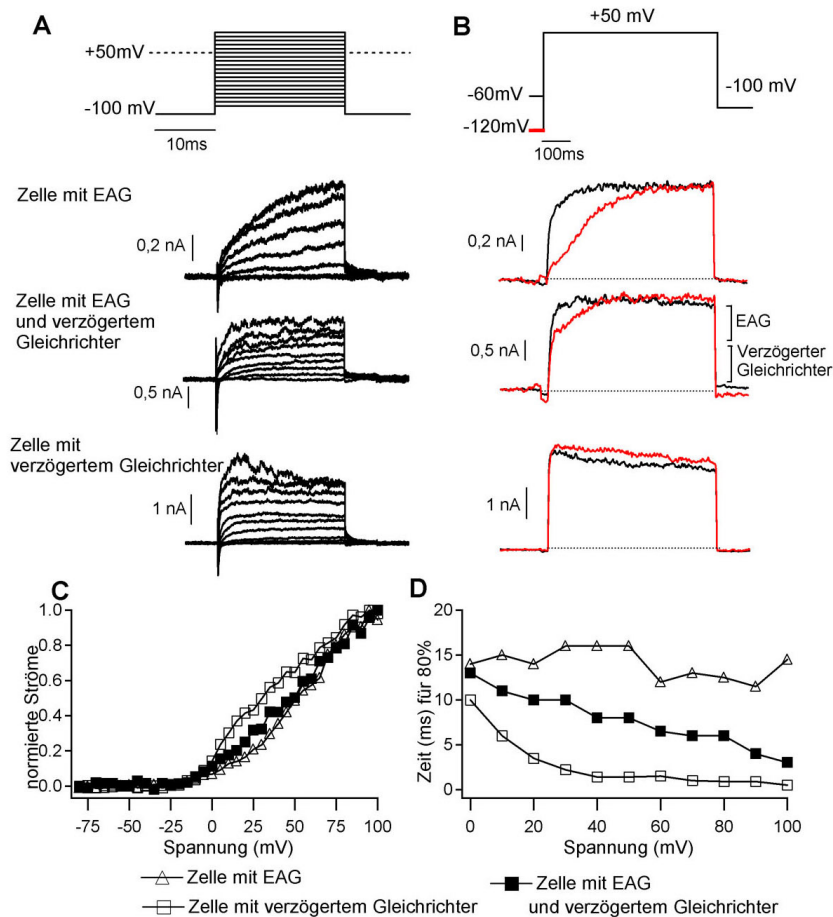
mit verzögertem Gleichrichter ca. 1,4 ms. Zellen, die den EAG-Kanal und verzögerten Gleichrichterkanal besaßen, lagen mit ca. 8 ms zwischen den beiden anderen Typen. Das Aktivierungspotential für beide spannungsgesteuerten Kaliumkanäle liegt ungefähr im gleichen Bereich, und deutliche Auswärtsströme sind ab ca. -10 mV (Abbildung 5.1 C) zu erkennen.

Außerdem ist in Abbildung 5.1 A und B ersichtlich, dass EAG-Ströme während einer lang andauernden Depolarisation (ca. 2 s) keine Inaktivierung zeigen, während verzögerte Gleichrichterströme eine langsame Inaktivierung aufweisen.

Weiterhin ist der EAG-Strom vom Vorpuls abhängig, was in Abbildung 5.1 B dargestellt ist. Die EAG-Ströme zeigen eine typische sigmoide Aktivierungsphase, wenn der Vorpuls auf -120 mV verringert wurde im Gegensatz zur schnelleren Aktivierung bei einem Vorpuls auf -60 mV. Mit Hilfe dieser einzigartigen Aktivierungskinetik konnte man in Zellen, die sowohl EAG als auch verzögerten Gleichrichter besaßen, den EAG-Strom ermitteln (Abbildung 5.1 B mittleres Bild).

Jedoch konnte man mit diesen Pulsprotokollen aus Abbildung 5.1 nicht EAG1-Kanäle von EAG2-Kanälen unterscheiden, da beide ein ähnliches Öffnungsverhalten besitzen. Da EAG1 in Neuroblastomzellen immer ein deutlicheres RT-PCR Signal zeigte (durchgeführt von Dr. Kristina Schönherr, MZB, Prof. Heinemann, Jena, Deutschland), ist anzunehmen, dass die gemessenen EAG-Ströme auf EAG1 zurückzuführen sind.



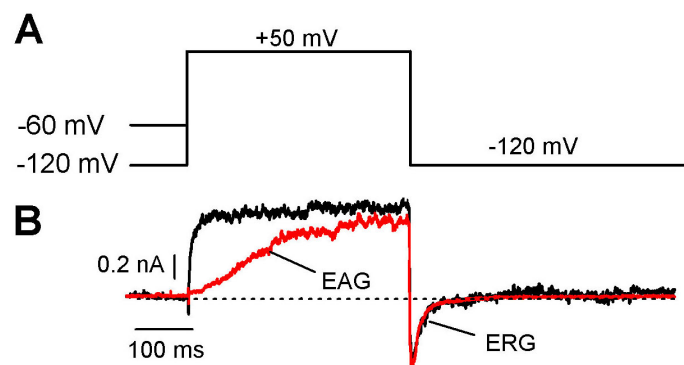


**Abbildung 5.1:** *Abhängigkeit des EAG-Stromes und des verzögerten Gleichrichterstromes von der Spannung.*

**A und B:** Beispielstromkurven von drei verschiedenen SK-N-FI Zellen mittels Ganzzellmessungen, die mit Hilfe der dargestellten Pulsprotokolle aufgenommen wurden. EAG-Ströme können von verzögerten Gleichrichterströmen durch die langsamere Aktivierungszeit und das Fehlen einer Inaktivierung bei langandauernder Depolarisation unterschieden werden. Der EAG-Kanal aktiviert bei einem Vorpuls auf -120 mV im Gegensatz zu einem Vorpuls auf -60 mV langsamer, wodurch es möglich ist, den EAG-Strom in Zellen mit EAG-Kanälen und verzögerten Gleichrichterkanälen abzugrenzen (mittleres Bild B). Die roten Stromkurven wurden bei einer Vordepolarisation auf -120 mV und die schwarzen bei -60 mV aufgenommen. Der Nullwert der Ordinatenachse ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Höhe der Ströme wurde mit diesen Protokollen 50 ms nach Depolarisation bestimmt.

**C** Die Ströme aus **A**, die am Ende einer Depolarisation aufgenommen worden sind, sind als Funktion zur Membranspannung aufgetragen. Zusätzlich ist in **D** die Zeit dargestellt, um 80% des maximalen Stromes nach einer Depolarisation zu erreichen.

Außerdem konnten ERG-Kanäle als einwärtsgerichteter Kaliumstrom in Neuroblastomzellen gemessen werden. Den ERG-Strom kann man in der Repolarisationsphase der Zellmembran auf -120 mV als einen lang andauernden einwärtsgerichteten Strom (engl. *tail current*) nach der Depolarisation erkennen (Abbildung 5.2 B). Um diesen Kaliumstrom elektrophysiologisch zu erfassen, besaß die Standard-Badlösung anstelle 5 mM KCl 40 mM KCl. Diese Daten wurden mit Hilfe des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.2 A aufgenommen, wo der ERG-Strom nach der Repolarisation von + 50 mV auf -120 mV als langsamer Einwärtsstrom zu erkennen ist (Abbildung 5.2 B). Dieses Pulsprotokoll unterscheidet sich vom Standardpulsprotokoll, mit dem EAG und verzögerter Gleichrichter aufgenommen wurden (Abbildung 5.1 A) durch eine länger andauernde Repolarisation der Zellmembran auf -120 mV. In Abbildung 5.2 B erkennt man während der Depolarisation ebenfalls den auswärtsgerichteten EAG-Strom.

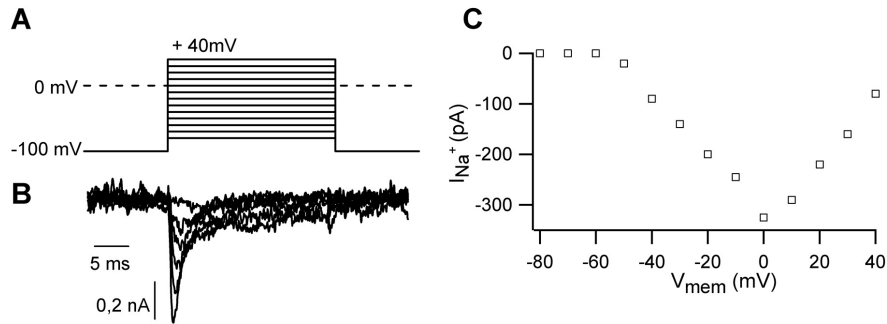


**Abbildung 5.2:** *ERG-Ströme in Neuroblastomzellen*

Mit Hilfe des Pulsprotokolles aus **A** wurde der ERG-Strom aufgenommen. Den ERG-Strom kann man in der Repolarisationsphase der Zellmembran auf -120 mV als einen lang andauernden einwärtsgerichteten Strom nach der Depolarisation erkennen (**B**). Während der Depolarisation ist außerdem der EAG-Strom zu sehen.

Weiterhin sind Neuroblastomzellen durch das Vorhandensein von spannungsgesteuerten Natriumkanälen charakterisiert (Toselli et al. 1996). Diese Kanäle beginnen bei einer Membranspannung von ungefähr -50 mV zu öffnen und erreichen bei circa 0 mV ihren maximalen Einwärtsstrom (Abbildung 5.3).

In den Experimenten hier wurden hauptsächlich spannungsgesteuerte Kaliumkanäle untersucht. Es wurde zunächst versucht, in verschiedenen Neuroblastomzelllinien den EAG-Strom und den verzögerten Gleichrichterstrom mit Hilfe des in Abbildung 5.4 A dargestellten Pulsprotokolls zu messen.



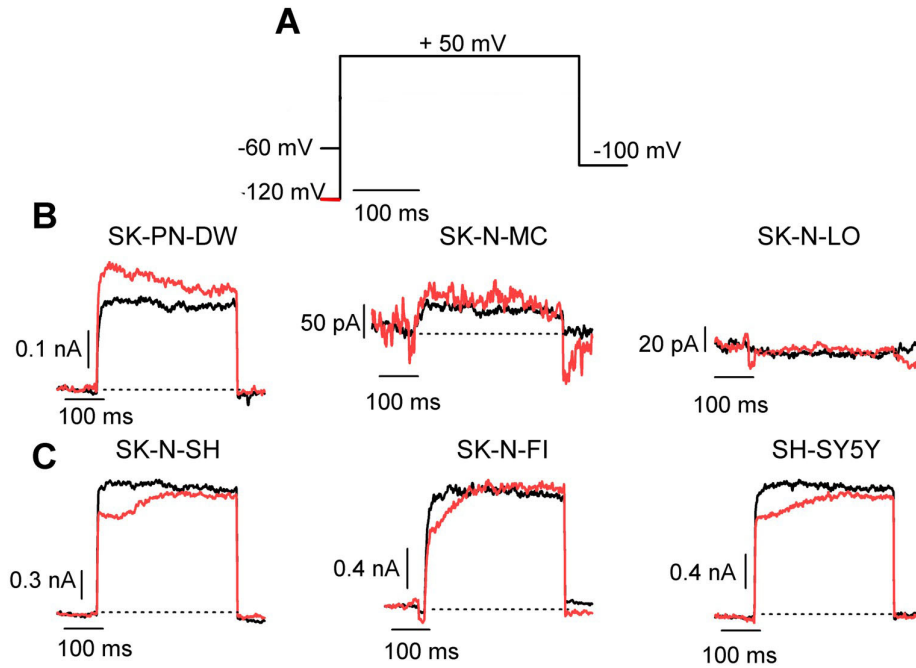
**Abbildung 5.3:** Spannungsgesteuerte Natriumkanäle in Neuroblastomzellen

**A** zeigt das Pulsprotokoll, mit dem die Stromkurven der Natriumkanäle in **B** aufgenommen worden sind, wobei in **B** nur Stromkurven bis 0 mV dargestellt sind. In **C** erkennt man die Höhe des einwärtsgerichteten Natriumstromes, der ungefähr bei einer Membranspannung von 0 mV seinen maximalen Einwärtsstrom erreicht. Dieser Strom kurz nach der Depolarisation (bis zu 5 ms) ist den schnell aktivierenden Natriumkanälen zu zuschreiben und kann somit von später aktivierenden Kaliumkanälen separiert werden.

Diese Zelllinien kann man anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes in verschiedene Typen unterteilen (Voigt et al. 2000). Die Linien SH-SY5Y, SK-N-SH und SK-N-FI gehören zum neuronalen Typ (*neuronal type* oder *N-type*), SK-N-MC und SK-N-LO Zellen zum Schwannschen Typ (*Schwann cell-like type* oder *S-type*) und die SK-PN-DW Zelllinie zeigt Charakteristika der beiden oben genannten Gruppen und wird als mittlerer Typ (*intermediate type* oder *I-type*) bezeichnet.

In den Zelllinien vom neuronalen Typ (SH-SY5Y, SK-N-FI und SK-N-SH) konnten Zellen mit EAG-Strom, mit verzögertem Gleichrichterstrom und beiden Strömen gleichzeitig detektiert werden. Bei diesen Zelllinien lag der Anteil der Zellen mit EAG-Strom zwischen 50 und 65%. Eine Zelle galt als EAG-positiv, wenn der Anteil des EAG-Stromes am Gesamtstrom mindestens 5% war. Die angegebenen Mittelwerte der Ströme in den folgenden Abbildungen setzen sich aus den in den Zellen gemessenen Strömen dividiert durch die Gesamtzahl der gemessenen Zellen zusammen. Zellen, die keine Ströme besaßen, wurden in die Bildung der Mittelwerte mit einbezogen. In den Zelllinien SK-PN-DW und SK-N-MC war kein EAG-Strom nachweisbar, sondern nur verzögerter Gleichrichterstrom. Eine Sonderstellung nahm die Zelllinie SK-N-LO ein, da bei den Messungen nur in 2 Zellen von 14 verzögerter Gleichrichterstrom nachweisbar war und sonst keine Ströme elektrophysiologisch detektiert wurden (Abbildung 5.5 A und B und Tabelle 5.1).

In Abbildung 5.5 C ist weiterhin die Zellkapazität dargestellt, die mit der Zellgröße korreliert. Diese ist bei den Zelllinien verschieden und erstreckt sich in einem Bereich von 9 bis 22 pF. Da die Ströme mittels der Ganzzellmessmethode gemessen worden



**Abbildung 5.4:** Spannungsgesteuerte Kaliumströme in verschiedenen Neuroblastomzelllinien

A zeigt das Pulsprotokoll, mit dem die Stromkurven der Kaliumströme aufgenommen wurden. In B sind drei unterschiedliche Stromkurven von S-Typ und I-Typ Zellen (genaue Einteilung in Tabelle 5.1) dargestellt. In C erkennt man Stromkurven von verschiedenen Neuroblastomzelllinien, die dem neuronalen Typ zugeordnet sind. Deutlich sind in C EAG-Ströme zu erkennen (Eigenschaften von EAG werden in Abbildung 5.1 erklärt). Die roten Stromkurven wurden bei einer Vordepolarisation auf -120 mV und die schwarzen bei -60 mV aufgenommen. Bei den dargestellten Stromkurven handelt es sich um Kaliumströme, da die Natriumkanäle bei dieser Depolarisationsdauer inaktiviert sind.

sind, wurden die Ströme jeweils über die vollständige Zellmembran aufgenommen, und somit ist die Höhe der gemessenen Ströme von der Zellgröße abhängig. Aus diesem Grund werden die gemessenen Ströme, wie in der Abbildung 5.5 D, bei den folgenden Diagrammen immer im Verhältnis zur Zellkapazität (Stromdichte) angegeben.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass sich die Zellen vom neuronalen Typ von den anderen beiden Typen deutlich unterscheiden, da diese Zellen den EAG-Kanal exprimieren und EAG-Strom gemessen werden konnte. Allerdings weisen die unterschiedlichen Zelllinien auch Ähnlichkeiten auf, da fünf der sechs Zelllinien den verzögerten Gleichrichterstrom besitzen. Da in den folgenden Versuchen der EAG-Strom näher betrachtet werden sollte, wurden die Experimente mit zwei Zelllinien vom neuronalen Typ, den SK-N-FI und SH-SY5Y Linien, fortgeführt.

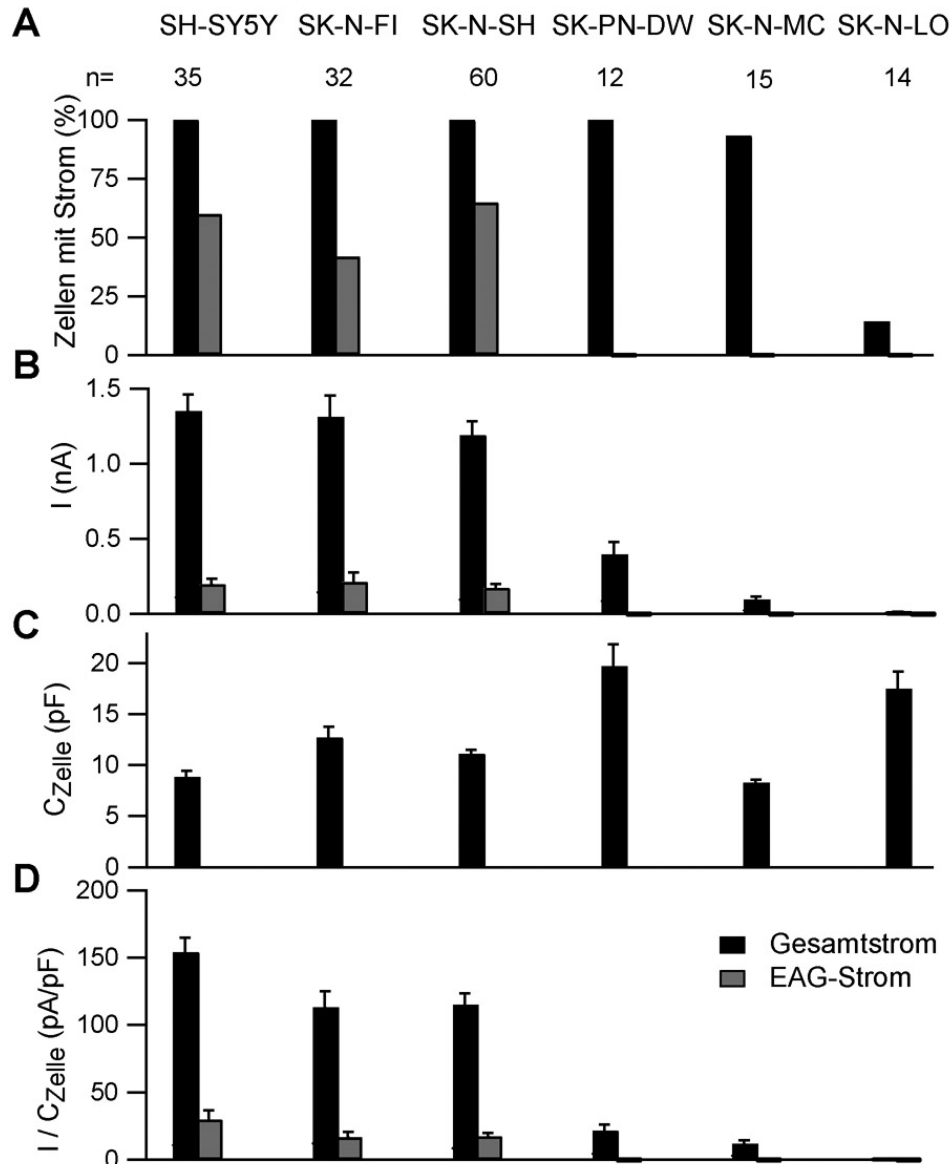
Morphologischer Typ	Zelllinie	Verzögerter Gleichrichter	EAG
N-Typ	SH-SY5Y	vorhanden	vorhanden
	SK-N-FI	vorhanden	vorhanden
	SK-N-SH	vorhanden	vorhanden
S-Typ	SK-N-MC	vorhanden	nicht vorhanden
	SK-N-LO	wenig vorhanden	nicht vorhanden
I-Typ	SK-PN-DW	vorhanden	nicht vorhanden

**Tabelle 5.1:** Überblick über Kaliumströme in verschiedenen Neuroblastomzelllinien

Einen wichtigen Einfluss auf die Kalium- und Natriumströme in Neuroblastomzellen hat die Kultivierungszeit der Zellen, da während der Differenzierung von SH-SY5Y Zellen Veränderungen der Kaliumströme und Natriumströme auftreten (Tosetti et al. 1998, Toselli et al. 1996). Deswegen wurden Zellen der SH-SY5Y Linie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Aussäen untersucht. In Abbildung 5.6 sind Zellen dargestellt, die nach einem, drei und 6 Tagen nach dem Aussäen elektrophysiologisch gemessen wurden. Diese besitzen jeweils verzögerten Gleichrichterstrom, EAG-Strom oder ERG-Strom. Alle gemessenen Zellen besaßen ERG-Strom, und dieser hat sich nach 5 Tagen Wachstum fast verdoppelt (Abbildung 5.6 B und C, Tabelle 5.2). Ebenfalls zeigte der verzögerte Gleichrichter nach diesem Zeitraum eine Erhöhung der Stromzunahme um circa Faktor zwei (Abbildung 5.6 B und C, Tabelle 5.2).

Gegensätzlich dazu verhielt sich die Veränderung des EAG-Stroms. Der EAG-Strom verzeichnete eine geringe Abnahme der Stromamplitude in den ersten 72 Stunden, und die Höhe der Stromdichte blieb nach weiteren 5 Tagen Zellwachstum ungefähr bei diesem Wert (Abbildung 5.6 B und C, Tabelle 5.2).

Während der Zelldifferenzierung mit zunehmender Kultivierungsdauer erfolgt in Neuroblastomzellen der SH-SY5Y Zelllinie eine Erhöhung der Natriumstromdichte (Toselli et al. 1996). Mit den Experimenten hier kann nach einem Wachstumszeitraum von 6 Tagen eine Zunahme der Natriumströme um Faktor 1,3 in SH-SY5Y Zellen gezeigt werden (Abbildung 5.6 A). Weiterhin ist in Abbildung 5.6 A eine kleine, aber signifikante Zunahme des Ruhemembranpotentials von  $25,1 \pm 0,5$  mV auf  $23,3 \pm 0,7$  mV innerhalb von 6 Tagen zu erkennen. Die Zellkapazitäten und damit die Zellgrößen zeigten über den beobachteten Zeitraum keine Tendenz zur Veränderung (Abbildung 5.6 A).

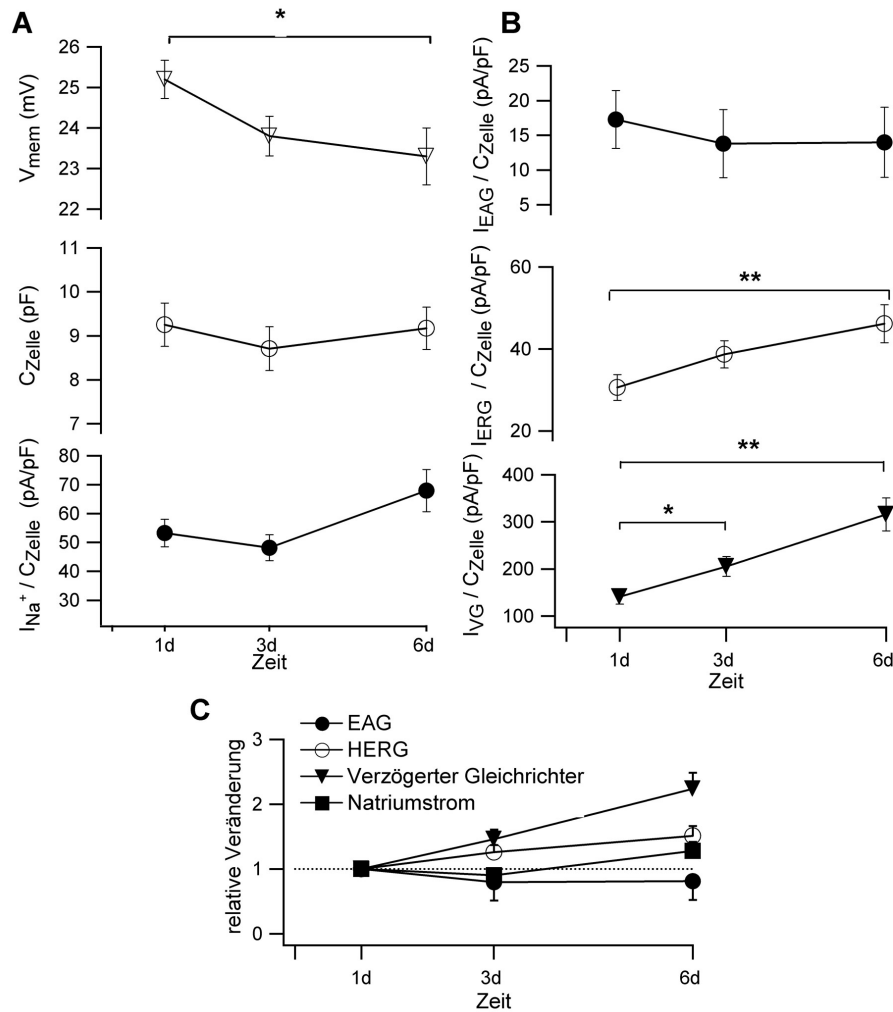


**Abbildung 5.5:** Vorkommen von EAG und verzögertem Gleichrichter in verschiedenen Neuroblastomzelllinien

**A** Dargestellt sind Zellen mit verzögertem Gleichrichterstrom bzw. EAG-Strom bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen. Angabe erfolgt in Prozent. Die Höhe des EAG-Stroms in Bezug auf den gesamten auswärtsgerichteten Kaliumstrom ist in **B** dargestellt. Dieser Gesamtstrom setzt sich aus EAG und verzögertem Gleichrichter zusammen.

**C** Es werden die unterschiedlichen Zellkapazitäten gezeigt, die mit der Zellgröße korrelieren. Im Diagramm **D** erkennt man die Stromhöhe in Bezug auf die Zellkapazität, um damit eine Aussage über die Stromdichte in den Zellen machen zu können. Die Ströme wurden mit Hilfe des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.1 B aufgenommen.

Die Anzahl der unabhängigen Zellmessungen ist mit n angegeben, und die SEM ist als Fehlerbalken dargestellt.



**Abbildung 5.6:** Veränderung von spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumströmen mit zunehmender Kultivierungszeit

Es sind Zellen der Neuroblastozelllinie SH-SY5Y mit einem Alter bezogen auf den Ausaatzeitpunkt von einem, drei und 6 Tagen dargestellt. **A** zeigt die Veränderung des Membranpotentials, der Zellkapazität und der Natriumströme über diesen Kultivierungszeitraum. Die Natriumströme ( $I_{Na}$ ) wurden mit Hilfe des Pulsprotokolles aus Abbildung 5.3 aufgenommen.

**B** stellt den Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Kaliumströme (EAG ( $I_{EAG}$ ), ERG ( $I_{ERG}$ ), Verzögerter Gleichrichter ( $I_{VG}$ )) dar. Die Daten wurden mit Hilfe des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.2 aufgenommen. In **C** ist die relative Veränderung der Kaliumströme und des Natriumstroms zu erkennen. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) Für alle Experimente gilt  $n=30$  und SEM als Fehlerbalken.

	Messzeitpunkt 1d	Messzeitpunkt 3d	Messzeitpunkt 6d
EAG	17,3±4,1 pA/pF	13,8±4,9 pA/pF (p=0,57)	14,0±5,1 pA/pF (p=0,61)
ERG	30,6±3,1 pA/pF	38,7±3,4 pA/pF (p=0,08)	46,2±4,7 pA/pF (p=0,007)
VG	141±16 pA/pF	205±21 pA/pF (p=0,016)	316±35 pA/pF (p=0,0004)
Natrium	53,3±4,7 pA/pF	48,2±4,5 pA/pF (p=0,43)	68,0±7,3 pA/pF (p=0,11)
Vmem	25,1±0,5 mV	23,8±0,5 mV (p=0,05)	23,3±0,7 mV (p=0,03)
C <sub>Zelle</sub>	9,3±0,5 pF	8,7±0,5 pF	9,2±0,5 pF

**Tabelle 5.2:** *Tabellarischer Überblick über die Messwerte von Abbildung 5.6*

Die Signifikanz (p) ist immer im Vergleich zu der Messreihe von einem Tag (Messpunkt 1d) angegeben.

Letztendlich kann man zu dem Schluss kommen, dass Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Aussaat gemessen wurden, unterschiedliche Ionenströme aufwiesen. Es war wichtig, diesen Einfluss für weitere Experimente zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen stets feste Zeitschemata verwendet, daher erfolgten die Messungen 24, 48 oder 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen.

## 5.2 Auswirkungen von Retinat auf spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumströme

Der EAG-Strom kann unter Retinatzugabe in SH-SY5Y Zellen reduziert werden (Meyer und Heinemann 1998). Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden Zellen der SH-SY5Y Zelllinie ausgewählt und mit zwei verschiedenen Retinaten (13-cis- und all-trans-Retinat) über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Die Auswirkung auf den EAG-Strom ist in Abbildung 5.7 D dargestellt. Beide Retinate führten nach 24 Stunden zu einer deutlichen Reduktion des EAG-Stroms, und nach 48 Stunden konnte man fast keinen EAG-Strom in den Zellen mehr vorfinden. Die weiteren Experimente wurden mit 13-cis-Retinat durchgeführt, da dieses Retinat in der Klinik aktuell bei Neuroblastomen therapeutisch eingesetzt wird (Matthay et al. 1999).

Weiterhin ergab sich die Frage, ob 13-cis-Retinat auch auf andere Neuroblastomzelllinien eine Wirkung hat. Als weitere Zelllinie wurde die Neuroblastomzelllinie SK-N-FI ausgewählt, die wie die SH-SY5Y Zelllinie eine deutliche Reduzierung des EAG-Stromes nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Retinatinkubation aufwies. In ähnlicher Weise verhielt sich der Anteil der Zellen mit EAG-Strom, der nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger



Retinatinkubation sowohl bei den SH-SY5Y Zellen als auch bei den SK-N-FI Zellen von ungefähr 60% bzw. 42% auf unter 10% abfiel.

Als Vergleich zu den Neuroblastomzellen wurde die Melanomzelllinie IGR1, die ebenfalls EAG besitzt, mit Retinat behandelt. In dieser Zelllinie lässt sich EAG nicht durch Retinat herunterregulieren. Es kann gezeigt werden, dass der Anteil der EAG-positiven Zellen bei der Melanomzelllinie IGR1 konstant zwischen 90 und 100% blieb und auch die mittlere Amplitude der EAG-Stromdichte keine Veränderung auf Retinat zeigte.

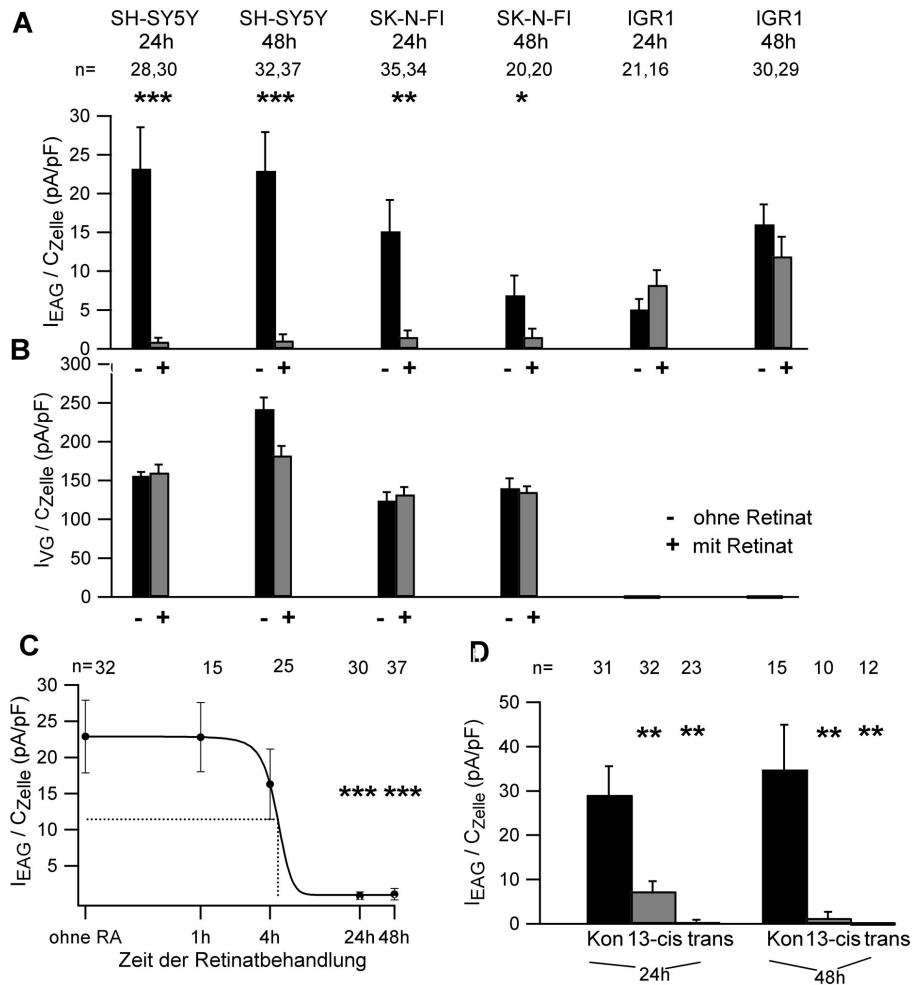
Um die Zeitdauer zu erfassen, nach der Retinat an den Zellen erste Effekte zeigt, wurde 13-cis-Retinat über verschiedene Zeiträume appliziert. Die durchschnittlichen EAG-Ströme, die in den Zellen gemessen wurden, sind über der Zeitdauer der Retinatbehandlung in Abbildung 5.7 C aufgetragen. Nach 4 Stunden erkennt man den ersten deutlichen Retinateffekt, und nach einem Zeitraum von 24 Stunden war der EAG-Strom nahezu vollständig reduziert. Die Messwerte wurden mit Hilfe einer Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstante (Gleichung 3.1) gefittet.

Aus dieser Kurve kann man den Zeitwert abschätzen, nach dem der EAG-Strom unter 13-cis-Retinatzugabe in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf ca. 50% reduziert worden ist. Dieser Wert liegt ungefähr bei 5 Stunden.

Der verzögerte Gleichrichterstrom zeigt eine schwächere Antwort auf die Retinatbehandlung (Meyer und Heinemann 1998). Es ist in Abbildung 5.7 B ersichtlich, dass eine 13-cis-Retinatbehandlung der Zellen über 24 oder 48 Stunden keine eindeutige Veränderung am verzögerten Gleichrichterstrom zur Folge hatte.

Wie bereits beschrieben, ist der EAG-Strom unter Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat in den SH-SY5Y Zellen nach circa 5 Stunden auf die Hälfte reduziert worden. Diese Zeitdauer lässt vermuten, dass Retinat keinen direkten Einfluss auf den EAG-Kanal hat, sondern wahrscheinlich seine Wirkung an den EAG-Kanälen über indirekte Mechanismen wie zum Beispiel über die Transkription entfaltet. Um jedoch sicher eine direkte Veränderung durch Retinat an EAG-Kanälen auszuschließen, wurde diese Substanz akut während elektrophysiologischer Messungen von SH-SY5Y Zellen appliziert. Es konnte keine Veränderung des EAG-Stromes festgestellt werden. In Zellen, die anstelle des EAG-Stromes verzögerten Gleichrichterstrom besaßen, hatte die akute Zugabe ebenfalls keinen Einfluss auf die Stromhöhe (Abbildung 5.8).

Wie schon weiter oben dargestellt ist, verändern sich spannungsgesteuerte Kaliumkanäle durch Inkubation mit 13-cis-Retinat. Eine Veränderung von Kaliumkanälen kann eine Erhöhung oder Herabsenkung des Ruhemembranpotentials zur Folge haben. Aus diesem Grund wurden die Ruhemembranpotentiale von Zellen der SH-SY5Y Linie untersucht,



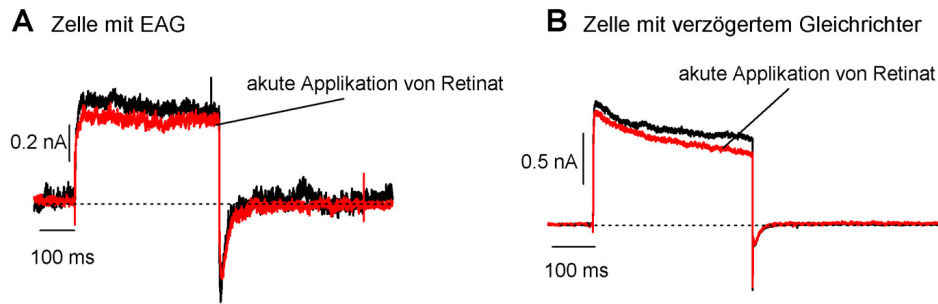
**Abbildung 5.7:** Absenkung des EAG-Stroms in SH-SY5Y und SK-N-FI Zellen unter Retinatzugabe ( $1\mu M$ )

Die Kaliumströme wurden mit dem Pulsprotokoll aus Abbildung 5.2 aufgenommen. Der Effekt von Retinat auf den mittleren EAG-Strom ( $I_{EAG}$ ) nach 24 bzw. 48 Stunden ist in **A** dargestellt.

**B** zeigt die Veränderung des verzögerten Gleichrichters ( $I_{VG}$ ) unter Retinat.

In **C** ist der mittlere EAG-Strom von 5 Experimenten mit 13-cis-Retinat, das über verschiedene Zeiträume (1h, 4h, 24h, 48h) appliziert wurde, dargestellt. Die einzelnen Werte wurden mittels der Gleichung 3.1 verbunden. Der Wert der Zeitdauer der Retinatzugabe, bei der der EAG-Strom auf 50% reduziert wird, liegt bei ca. 5 Stunden und ist durch die gestrichelten Linien eingezeichnet.

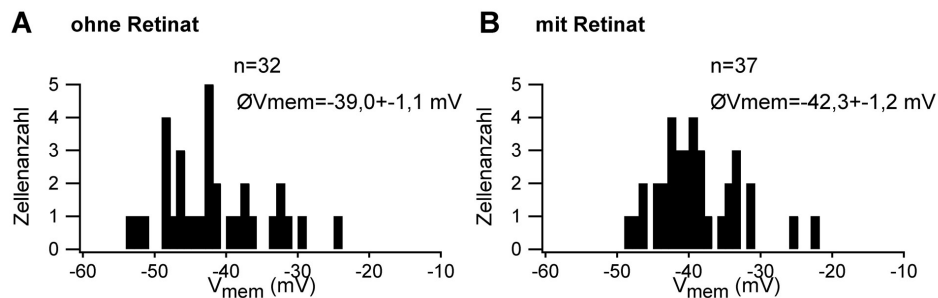
In **D** wird die Wirkung von all-trans- und 13-cis-Retinat auf den EAG-Strom verglichen. Kon: keine Inkubation, 13-cis: 13-cis-Retinat, trans: all-trans-Retinat. SEM wurde als Fehlerbalken angegeben. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



**Abbildung 5.8:** Akute Applikation von Retinat

Die akute Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  13-cis-Retinat zu SH-SY5Y Zellen hat keinen Einfluss auf die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Diese Stromkurven wurden mittels des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.2 aufgenommen. Es werden jedoch nur die Stromkurven bei einem Vorpuls auf  $-60 \text{ mV}$  dargestellt. In **A** sind die Stromkurven von SH-SY5Y Zellen dargestellt, die nur EAG-Strom besitzen, und in **B** werden die Stromkurven von Zellen gezeigt, die nur verzögerten Gleichrichterstrom hatten. In beiden Abbildungen ist der ERG-Strom nach der Depolarisationsphase als einwärtsgerichteter Kaliumstrom zu erkennen. Die abgebildeten Stromkurven unter akuter Retinatapplikation (rot) wurden 5 Minuten nach Austausch der kompletten Badlösung aufgenommen. Die schwarze Kurve wurde vor dem Austausch der Badlösung aufgenommen.

die mit bzw. ohne 13-cis-Retinat kultiviert worden sind. Hier konnte man eine geringe, aber signifikante ( $p=0,044$ ;  $n>30$ ) Erniedrigung des Membranpotentials von  $-39 \pm 1,1 \text{ mV}$  auf  $-42,3 \pm 1,2 \text{ mV}$  feststellen. Die Verteilung der Zellen hinsichtlich ihres Membranpotentials ist in Abbildung 5.9 ersichtlich.



**Abbildung 5.9:** Verringerung des Ruhemembranpotentials in SH-SY5Y Zellen unter 48-stündiger 13-cis-Retinatinkubation ( $1 \mu\text{M}$ ).

Dargestellt ist eine Häufigkeitsverteilung der Membranpotentiale von SH-SY5Y Zellen ohne (**A**) und mit (**B**) Retinatzugabe über 48 Stunden. Außerdem sind die Mittelwerte der Membranpotentiale angegeben ( $\text{ØV}_{\text{mem}}$ ), die sich mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  voneinander unterscheiden. Der Fehler hinsichtlich des Mittelwertes der Membranpotentiale ist als SEM angegeben.

Weiterhin war von Interesse, ob Retinat auch auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle einen Einfluss hat. Für diesen Versuch wurden ebenfalls Zellen der SH-SY5Y Zelllinie verwendet, die mit bzw. ohne Retinat kultiviert worden sind. Nach einer 48-stündigen Retinatzugabe erhöhte sich die Natriumstromdichte um Faktor 1.35 von  $53,5 \pm 11,4$  pA/pF auf  $72,4 \pm 8,73$  pA/pF ( $p=0,065$ ,  $n=19$ ).

Zusammenfassend kann man erkennen, dass durch Retinat nach 24 bzw. 48 Stunden in Neuroblastomzellen der EAG-Strom fast vollständig verschwindet, wobei 13-cis-Retinat und all-trans-Retinat eine ähnliche Wirkung aufweisen. Die Zeitdauer von 5 Stunden, bis 50% des EAG-Stromes reduziert sind, und der fehlende Effekt bei direkter Retinapplikation auf den EAG-Strom lassen vermuten, dass Retinat über einen indirekten Mechanismus den EAG-Kanal beeinflusst. Dabei könnte es sich um die Regulation der Transkription des EAG-Kanals handeln. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurden stabile Zellklone der SH-SY5Y Zelllinie hergestellt, die mit einem Expressionsplasmid für EAG transfiziert wurden.

### **5.3 Retinateffekt auf stabile mit hEAG1 transfizierte Zellklone der Zelllinie SH-SY5Y**

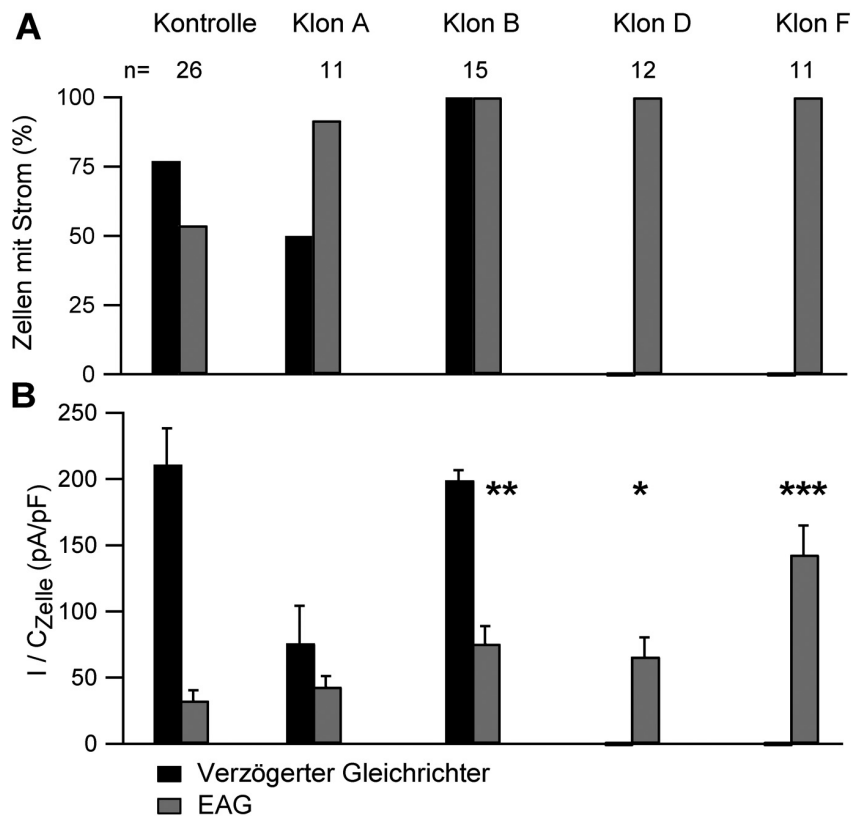
Aus den Zellen der SH-SY5Y Zelllinie mit dem zusätzlich eingebrachten, nicht regulierbaren EAG-Vektor wurden einzelne Zellen ausgewählt und zu Einzelzellklonen mittels des Antibiotikums G418 selektiert, die mit verschiedenen Buchstaben bezeichnet sind. Um zu prüfen, ob diese Zellklone auch tatsächlich mehr EAG-Strom als die Wildtypzellen besitzen, wurde zunächst die Höhe des EAG-Stromes (bezogen auf die Zellkapazität) bestimmt, und man konnte feststellen, dass die mittlere Dichte des EAG-Stroms in den Zellklonen deutlich höher war, als bei der nichttransfizierten Kontrolle. Beim Klon B, D und F hatten alle gemessenen Zellen EAG-Strom, und beim Klon D und F war kein verzögerter Gleichrichterstrom vorhanden (Abbildung 5.10 A). Ähnlich verhielt sich die Höhe der einzelnen Stromdichten, die in Abbildung 5.10 B abgebildet ist. 3 von 4 Zellklonen hatten deutlich mehr EAG-Strom (Tabelle 5.3 und Abbildung 5.10).

Um der Frage weiter nachzugehen, ob der Einfluss von Retinat auf EAG durch Transkriptionsregulation erfolgt, war es von Interesse, zu überprüfen, ob durch Retinat der EAG-Strom in den Zellklonen mit dem konstitutiven Promotor (CMV-Promotor) für EAG abgeschwächt werden kann. Es wurden Zellklone und Kontrollen mit  $1 \mu\text{M}$  Retinat über 48 Stunden behandelt und anschließend der EAG-Strom gemessen.

Kontrolle	32,8±7,83 pA/pF
Klon A	43,1±8,05 pA/pF
Klon B	75,5±13,2 pA/pF
Klon D	68,5±14,4 pA/pF
Klon F	143±22,1 pA/pF

**Tabelle 5.3:** *EAG-Stromdichten der mit hEAG1 transfizierten Klone und der Kontrolle (SH-SY5Y)*

Die einzelnen Messwerte sind in Abbildung 5.10 graphisch dargestellt. Die Bestimmung der Ströme erfolgte mittels des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.1.



**Abbildung 5.10:** *Zellklone, die mit hEAG1 transfiziert wurden, besitzen mehr EAG-Strom und weniger verzögerten Gleichrichterstrom als die Kontrolle.*

In **A** ist der Anteil der Zellen mit EAG-Strom oder verzögertem Gleichrichterstrom dargestellt. In **B** erkennt man die Stromdichten der einzelnen Zellklone im Vergleich zur Kontrolle. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$

Als Kontrollen wurden nichttransfizierte Wildtypzellen und ein stabiler Zellklon verwendet, der mit einem Vektor transfiziert ist, der das *enhanced green fluorescence protein*

(EGFP) kodiert. Des Weiteren wurde zusätzlich zu den mit hEAG1 transfizierten Einzelzellklonen (A,B,F) ein Mischklon (MK) gemessen, der aus mit hEAG1 transfizierten und nicht transfizierten Zellen bestand.

Die Höhe der EAG-Stromdichten zeigten eine große Variabilität, wenn die Zellen ohne Retinat kultiviert worden sind. Allerdings wird, wie bereits in Abbildung 5.10 A dargestellt, deutlich, dass die mit hEAG1 transfizierten Zellklone größere EAG-Stromdichten haben als die Wildtypkontrolle. Interessanterweise besitzt jedoch ebenfalls die Zelllinie, die mit dem Kontrollvektor EGFP transfiziert worden ist, eine deutlich höhere EAG-Stromdichte als die Wildtypzellen. Dies verdeutlicht die Variabilität des EAG-Stroms in Neuroblastomzellen. Dass die Zellklone A, B, F und der Mischklon tatsächlich mit hEAG1 transfiziert sind, wird in Abbildung 5.11 B erkennbar, die das Verhältnis der Zellen mit EAG-Strom zur Gesamtzahl der gemessenen Zellen darstellt. Der Anteil der EAG-positiven Zellen liegt für beide Kontrollen (Wildtyp und EGFP-Klon) zwischen 60 und 70% während mindestens 90% der mit hEAG1 transfizierten Zellen den für EAG typischen Cole-Moore Effekt zeigen.

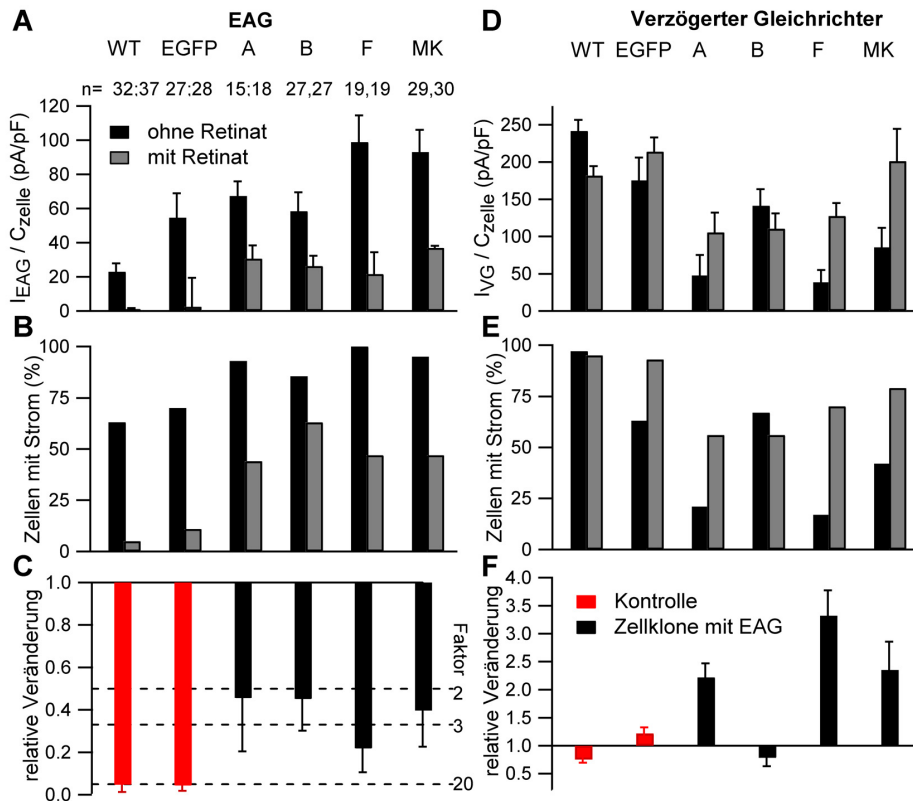
Wie bereits beschrieben, führt eine Behandlung mit Retinat über einen Zeitraum von 48 Stunden bei SH-SY5Y Zellen zu einem nahezu vollständigen Verlust des EAG-Stromes (Abbildung 5.7 A ). Es gelang, dieses Ergebnis erneut zu bestätigen, da sowohl in den Wildtypkontrollen als auch in den mit EGFP transfizierten stabilen Kontrollklonen die EAG-Stromdichte unter Retinatzugabe deutlich abgesunken war (Abbildung 5.11 A). Ähnlich ist auch der Anteil der EAG-positiven Zellen (Abbildung 5.11 B) auf unter 5% gesunken.

Anders verhielten sich die mit dem zusätzlichen EAG-Gen transfizierten Zellklone. Zwar führte eine Behandlung dieser Zellen mit Retinat ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der EAG-Stromdichte, allerdings konnte dieser Strom nicht vollständig ausgeschaltet werden, sondern wurde nur auf ca. 40% des Ausgangswertes reduziert. Ebenfalls verringerte sich der Anteil der EAG-positiven Zellen auf ungefähr die Hälfte (Abbildung 5.11).

Weiterhin ist in den Figuren 5.11 D und E zu erkennen, dass sowohl die Höhe des verzögerten Gleichrichterstromes (bezogen auf die Zellkapazität) als auch die Anzahl der Zellen mit verzögertem Gleichrichterstrom bei den mit hEAG1 transfizierten Zellen deutlich niedriger ist als bei den beiden Kontrollen. Im Gegensatz zum EAG-Strom ließ sich dieser Strom durch Retinat nicht beeinflussen.

Zusammenfassend erkennt man, dass bei den mit hEAG1 transfizierten stabilen Zellklonen nur ein Teil des EAG-Stromes durch Retinatinokubation reduziert werden konnte.

Bei diesem Teil handelt es sich um den endogenen EAG-Strom, der durch Retinat regulierbar war, während der zusätzlich durch Transfektion eingebrachte EAG-Strom von Retinat nicht beeinflusst werden konnte.



**Abbildung 5.11:** *EAG-Ströme in mit hEAG1 transfizierten SH-SY5Y Zellen können nicht durch Retinat vollständig herunterreguliert werden.*

Die mit hEAG1 transfizierten stabilen Zellklone, die mit EGFP transfizierte Kontrolle und die Wildtypzellen wurden in 1  $\mu$ M 13-cis-Retinat für 48 Stunden inkubiert. Es wird die Höhe der mittleren EAG-Stromdichte (**A**) und des verzögerten Gleichrichters (**D**) in behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt. Der Anteil der EAG-positiven Zellen und der Zellen mit verzögertem Gleichrichter ist in **B** und **E** zu sehen. Im Diagramm **C** und **F** erkennt man die relative Veränderung des verzögerten Gleichrichterstromes und des EAG-Stromes in den mit hEAG1 transfizierten Zellen (schwarz) und in den beiden Kontrollen (rot). Der EAG-Strom verringert sich um ca. Faktor 3 in den mit hEAG1 transfizierten Zellklonen und um ca. Faktor 20 in den Kontrollen. Im Gegensatz zum verzögerten Gleichrichter, wo sowohl Zellklone (schwarz) als auch Kontrollen (rot) nach oben und unten abweichen. Das Pulsprotokoll ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

SEM als Fehlerbalken. A,B,F: Einzelzellklone; MK: Mischzellklon; WT: Wildtyp; EGFP: EGFP-Kontrollklon, Legende für A,B,D und E in A abgebildet, Legende für C und F in F dargestellt



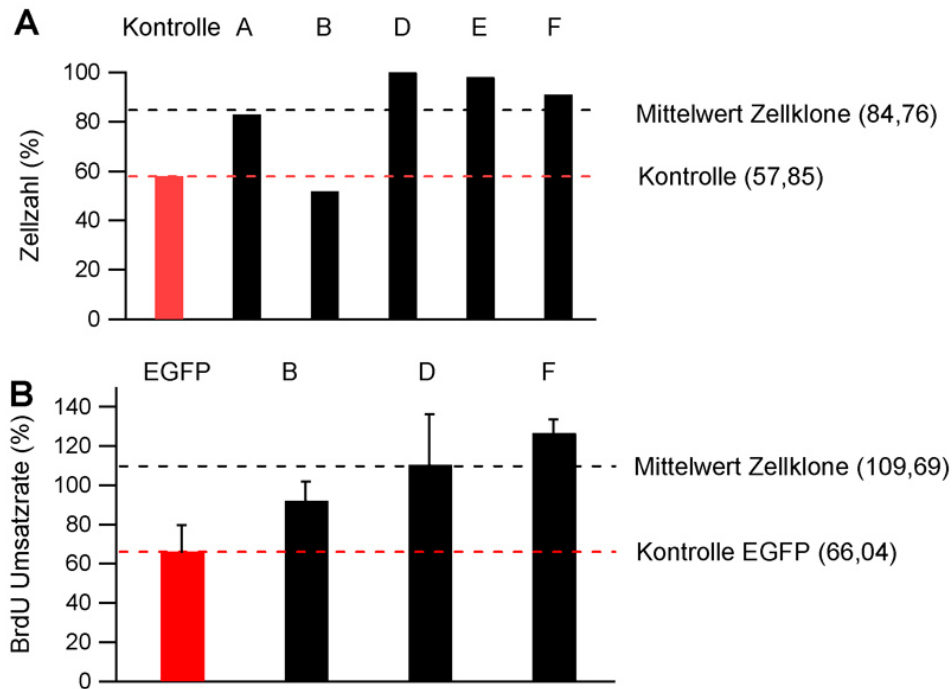
Daraus lässt sich schließen, dass die Transkriptionskontrolle wichtig für die Regulation von EAG durch Retinat ist. Um diese Ergebnisse besser zu verdeutlichen, wurde der mRNA Gehalt von EAG nach Zugabe von Retinat in SH-SY5Y Zellen untersucht. Diese Arbeiten wurden von Dr. Kristina Schönherr (MZB, Prof. Heinemann, Jena, Deutschland) durchgeführt. Mittels *Realtime*-PCR (Tajima et al. (2006)) konnten sehr gut DNA-Fragmente von EAG1 amplifiziert werden. Es wurde die relative Veränderung der mRNA von EAG1 in SH-SY5Y Zellen nach Applikation von 1  $\mu$ M 13-cis-Retinat für 24 oder 72 Stunden bestimmt. Die mRNA in behandelten Zellen wurde um Faktor 2,2 nach 24 Stunden und um Faktor 4 nach 72 Stunden Wachstum in Retinat reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Reduktion der mRNA für EAG1 ist ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation von EAG durch Retinat.

Um die Zellklone näher zu charakterisieren, wurde die Proliferation der mit EAG transfizierten stabilen Zellklone untersucht. Es war von Bedeutung, herauszufinden, ob sich die Teilungsrate dieser Zellklone von den Wildtypzellen unterscheidet, da EAG ein potentielles Onkogen darstellt (Pardo et al. 1999). Ausgehend von den stabilen Zellklonen, die EAG überexprimieren, wurde untersucht, ob die Herunterregulation von EAG relevant für einen Einfluss von Retinat auf die Proliferation ist. Die Proliferationsrate konnte durch einen Zellzähler und mittels *BrdU*-Umsatzrate, die die DNA-Synthese als direkten Ausdruck der proliferativen Aktivität misst, bestimmt werden. Diese Experimente wurden von Dr. Kristina Schönherr durchgeführt (Tajima et al. (2006)), und es konnten folgende Ergebnisse festgestellt werden.

Die Ursprungszelllinie und verschiedene stabil transfizierte EAG-Zellklone wurden in Anwesenheit von 1  $\mu$ M 13-cis-Retinat für 48 bzw. 72 Stunden kultiviert. Wie in Abbildung 5.12 A zu erkennen ist, erreichte die Kontrolle nur ca. 60% der Zelldichte bezogen auf den Zellklon D, der die höchste Zelldichte hatte. Einen ähnlich niedrigen Wert findet man beim Zellklon B. Allerdings erreichten vier unabhängige Zellklone mindestens über 80% und der Mittelwert aller Zellklone lag mit ca. 85% deutlich über dem der Kontrolle. Außerdem konnte in Abbildung 5.11 A gezeigt werden, dass ein großer Teil des EAG-Stromes im Zellklon B durch Retinat reduziert werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse konnten mittels des *BrdU-Assays* festgestellt werden. In diesem Experiment wurde der mit EGFP transfizierte Zellklon als Kontrolle benutzt. Unter 72-stündiger Retinatzugabe konnte man eine deutliche Reduktion der Proliferationsrate der Kontrolle auf ca. 66% feststellen, während die Zellklone im Mittelwert sogar eine Erhöhung der DNA-Synthese auf durchschnittlich ca. 110% zeigten und damit schneller

proliferierten. Klon B zeigt im Gegensatz zu Klon D und F keine Zunahme oder Abnahme der Proliferationsrate.



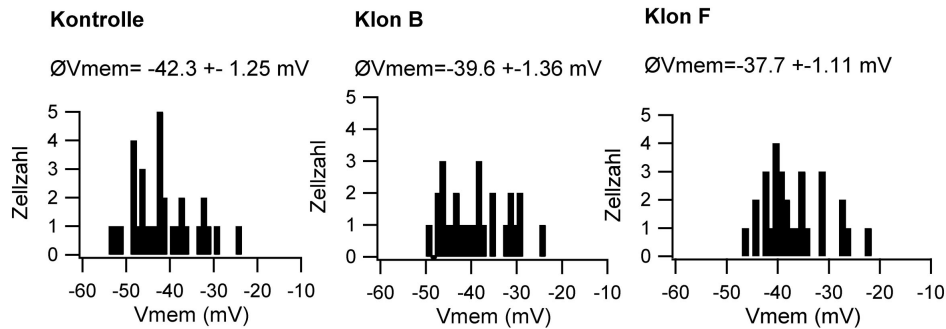
**Abbildung 5.12:** Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat auf die Proliferation von SH-SY5Y Zellen und von mit EAG transfizierten stabilen Zellklonen

In **A** ist die relative Anzahl der Zellen dargestellt, die für 24 Stunden in 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat kultiviert wurden, verglichen mit nicht behandelten Zellen. A, B, D, E, und F sind unabhängige stabile mit EAG transfizierte Zellklone. Diese Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

**B** zeigt die relative *BrdU*-Umsatzrate der angegebenen Zellklone, die für 72 Stunden mit 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat inkubiert wurden, verglichen mit nicht behandelten Zellen. Diese Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten. SEM als Fehlerbalken. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Kristina Schönherr (MZB, Prof. Heinemann, Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Um die Zellklone näher zu charakterisieren, wurde die Höhe der Ruhemembranpotentiale der Zellklone im Vergleich zur Wildtypkontrolle untersucht. Wie bereits dargestellt, hat die zusätzliche Transfektion von EAG eine Veränderung der Kaliumströme zur Folge, die wiederum das Ruhemembranpotential der Zellen beeinflussen können. Außerdem besitzen Tumorzellen im Vergleich zum gesunden Gewebe häufig ein niedrigeres Membranpotential (Binggeli und Cameron 1980) und da postuliert wird, dass EAG ein Onkogen (Pardo et al. 1999) darstellt, könnte man eine Veränderung des Membranpotentials vermuten. Allerdings tendiert ein vermehrtes Vorkommen von Kaliumkanälen dazu, dass

sich das Ruhemembranpotential von Zellen erniedrigt. Hier kann gezeigt werden, dass mit hEAG1 transfizierten Zellen ein positiveres Membranpotential hatten, als die Wildtypkontrolle (Abbildung 5.13). Bei der Kontrolle lag das mittlere Membranpotential bei  $-42,3 \pm 1,25$  mV, während die Klone B und F im Vergleich zur Kontrolle ein Ruhepotential von  $-39,6 \pm 1,36$  mV ( $p=0,12$ ) bzw.  $-37,7 \pm 1,11$  mV ( $p=0,006$ ) aufwiesen.



**Abbildung 5.13:** *Mit hEAG1 transfizierte Zellklone besitzen ein positiveres Membranpotential.*

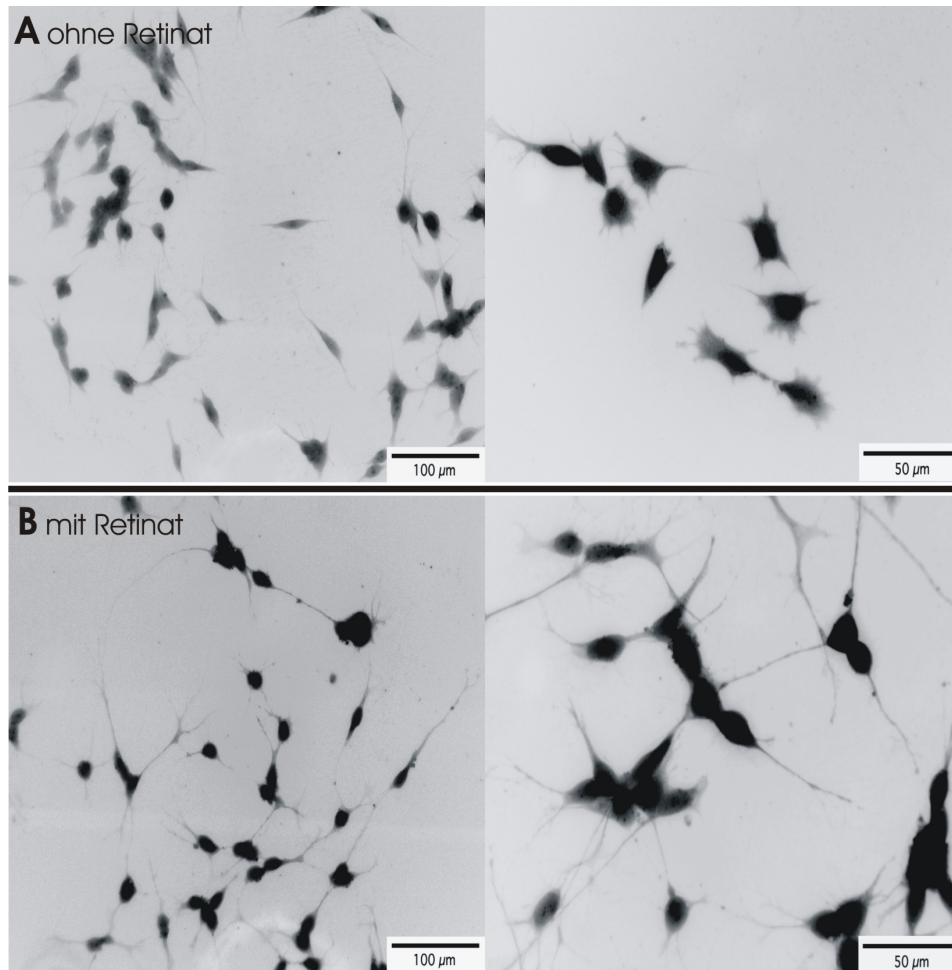
Dargestellt ist eine Häufigkeitsverteilung der Ruhemembranpotentiale ( $V_{mem}$ ) von SH-SY5Y Zellen. Außerdem sind die mittleren Ruhemembranpotentiale ( $\bar{V}_{mem}$ ) mit SEM als Fehler angegeben. Für alle Abbildungen ist  $n > 25$ .

## 5.4 Retinate und ihre Wirkung auf die Zelldifferenzierung

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Zellklone mit dem konstitutiven Promotor für EAG schneller als die Wildtypzellen proliferierten, so dass sich die Frage eröffnete, ob Retinat einen ähnlichen Effekt in den Zellklonen auf die Zelldifferenzierung hat. Da durch Retinat der EAG-Strom verloren geht und eine Zelldifferenzierung eingeleitet werden kann, war von Interesse, ob der EAG-Verlust eine Nebenerscheinung der Differenzierung ist, oder ob dieser Strom die Differenzierung kontrollieren kann. Man kann vermuten, dass aufgrund der zusätzlich exprimierten EAG-Kanäle sich das onkogene Potential der Zellen erhöhen würde und diese somit unter Retinat eine geringere Differenzierung zeigen. Die Zelldifferenzierung konnte mit den folgenden Methoden erfasst werden:

Man kann über morphologische Veränderungen der Zellen, daher durch Messung der Neuriten- bzw. Dendritenlängen und über die Veränderung der Natriumströme Aussagen über die Zelldifferenzierung treffen (Toselli et al. 1996, Lopez-Carballo et al. 2002).

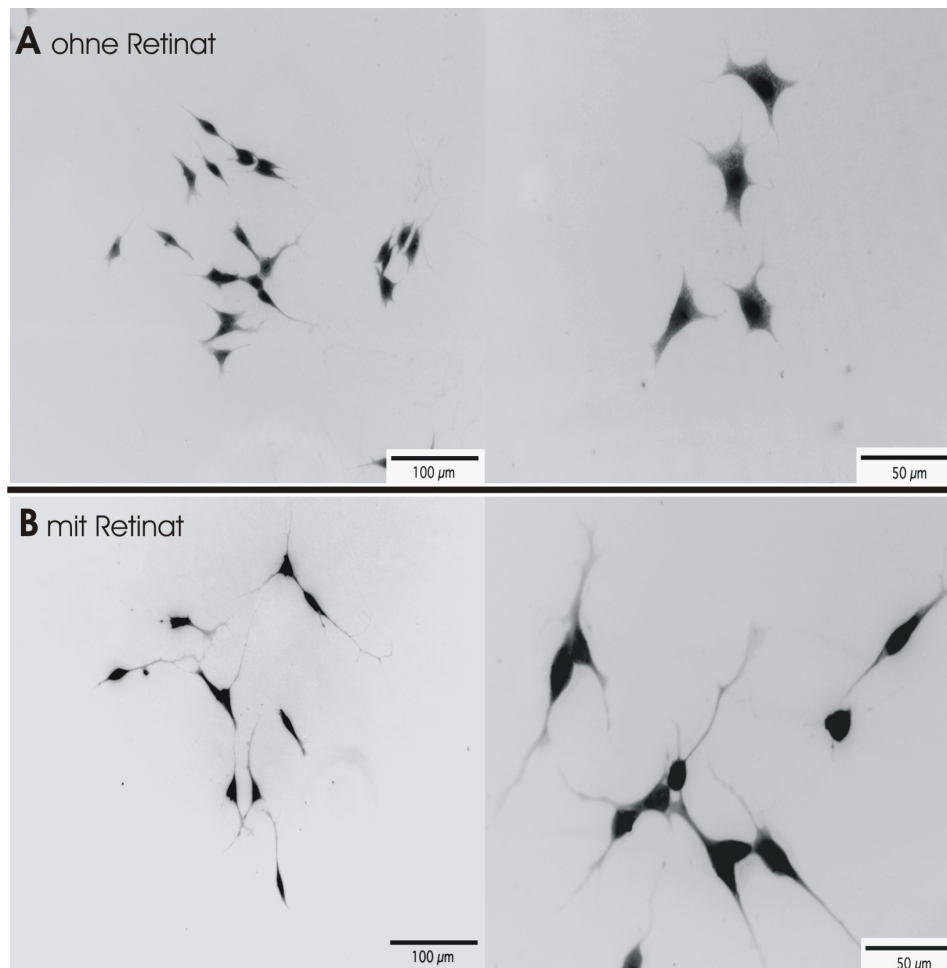
Abbildung 5.14 zeigt Bilder von SH-SY5Y Wildtypzellen nach 72 Stunden Kultivierung mit bzw. ohne Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat für 48 Stunden. Deutlich ist zu erkennen, dass die nicht behandelten Zellen kürzere Zellfortsätze besitzen, während bei den mit Retinat behandelten Zellen die Neuriten- und Dendritenlängen deutlich zugenommen haben. Der gleiche Befund lässt sich auch bei den mit EAG transfizierten Zellklonen finden. In Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16 sind Bilder vom Einzelzellklon A und von einem Mischzellklon jeweils mit und ohne Retinatbehandlung dargestellt.



**Abbildung 5.14:** *Morphologische Differenzierung der Wildtypzellen SH-SY5Y nach 48-stündiger Retinatzugabe.*

**A** zeigt Zellen ohne Retinat und **B** Zellen, die für 48 Stunden mit 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat inkubiert wurden. Die Kultivierungsdauer betrug insgesamt 3 Tage.

Um diesen Effekt von Retinat auf die Zelldifferenzierung besser zu verstehen und objektiv zu erfassen, wurde die Länge der Zellfortsätze als Hinweis auf die Differenzierung bestimmt. Dabei wurden die Fortsätze einzelner fotografiertes Zellen ausgemessen

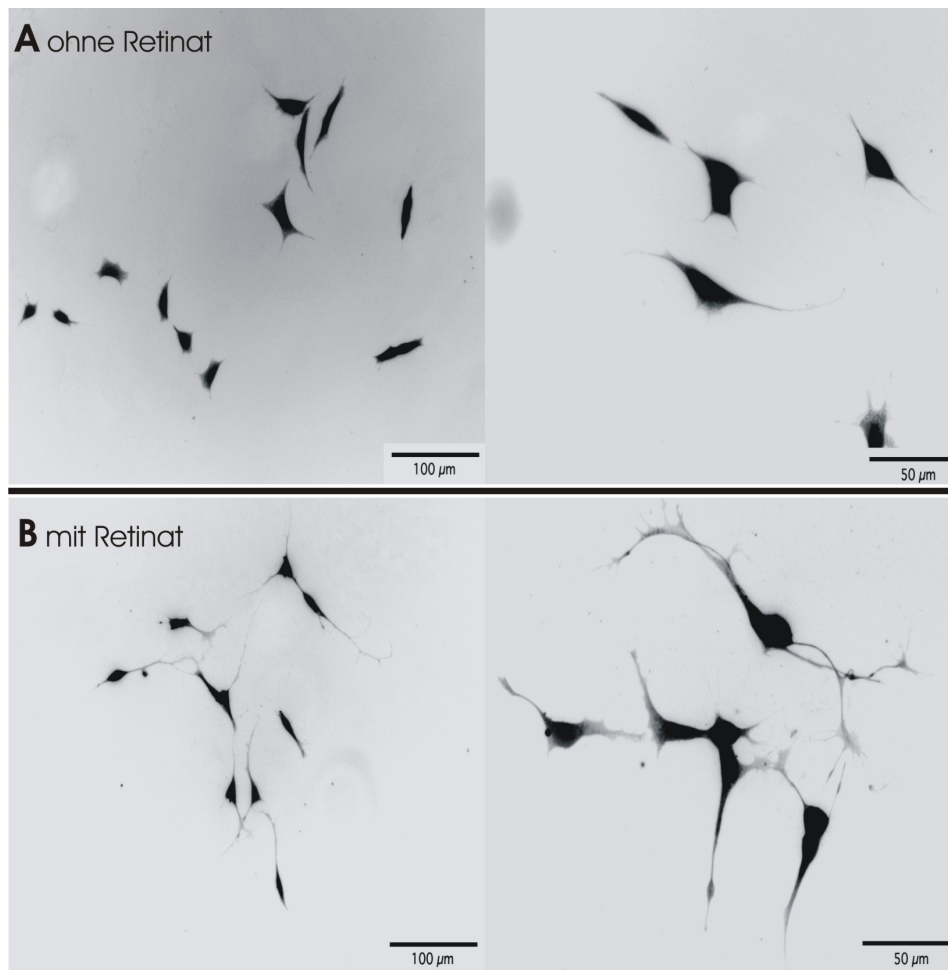


**Abbildung 5.15:** *Morphologische Differenzierung des mit hEAG1 transfizierten Einzelzellklons A nach 48-stündiger Retinatzugabe.*

**A** zeigt Zellen ohne Retinat und **B** Zellen, die für 48 Stunden mit  $1\mu\text{M}$  13-cis-Retinat inkubiert wurden. Die Kultivierungsdauer betrug insgesamt 3 Tage.

und anschließend die Mittelwerte berechnet. In Abbildung 5.17 A und B sieht man die Veränderung der mittleren Dendriten- und Neuritenlängen der mit EAG transfizierten Zellklone A, B und des Mischklons. Als Kontrolle wurden die Wildtypzellen der SH-SY5Y Zelllinie verwendet. Interessanterweise variieren die Längen der Zellfortsätze der Kontrolle und der einzelnen Zellklone sehr stark, was man einer natürlichen Breite der Dendriten- und Neuritenlängen zuschreiben kann, da sich die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden.

Der Effekt von Retinat auf die Länge der Zellfortsätze ist jedoch bei allen Zellen gleich. Sowohl bei den mit EAG transfizierten Zellen, als auch bei der Kontrolle ist nach einer Retinatzugabe eine deutliche Verlängerung der Zellfortsätze zu erkennen, so dass eine



**Abbildung 5.16:** *Morphologische Differenzierung des mit EAG transfizierten Mischzellklons nach 48-stündiger Retinatzugabe.*

**A** zeigt Zellen ohne Retinat und **B** Zellen, die für 48 Stunden mit  $1\mu\text{M}$  13-cis-Retinat inkubiert wurden. Die Kultivierungsdauer betrug insgesamt 3 Tage.

relative Längenzunahme der Zellfortsätze zwischen Faktor 1,6 und 2,0 erreicht wurde (Abbildung 5.17 B). Man kann also keinen Unterschied zwischen den Wildtypzellen und den mit EAG transfizierten Zellklonen feststellen. Um noch präziser den Effekt auf die Zelldifferenzierung von Retinat zu quantifizieren, wurde der Natriumstrom gemessen. Je differenzierter Neuroblastomzellen sind, desto mehr Fortsätze besitzen diese, in denen sich Natriumkanäle befinden, so dass man eine Erhöhung des Natriumstroms bei zunehmender Differenzierung erwarten müsste (Toselli et al. 1996). Die Vermutung konnte bestätigt werden, da sowohl in der Kontrolle als auch in den mit EAG transfizierten Zellen die Natriumstromdichte eine Erhöhung um Faktor 1.5 bis 2 zeigte (Abbildung

	ZFS -RA ( $\mu\text{m}$ )	ZFS +RA ( $\mu\text{m}$ )	$I_{Na}$ -RA (pA/pF)	$I_{Na}$ +RA (pA/pF)
Kon	167,1 $\pm$ 9,9	261,4 $\pm$ 16,2 (p<0,001)	53,5 $\pm$ 11,4	72,4 $\pm$ 8,73 (p=0,06)
A	226,8 $\pm$ 15,4	445,0 $\pm$ 19,7 (p<0,001)	31,7 $\pm$ 3,8	61,3 $\pm$ 7,1 (p=0,001)
B	268,0 $\pm$ 31,9	367,2 $\pm$ 25,4 (p=0,01)	55,2 $\pm$ 5,4	82,4 $\pm$ 9,6 (p=0,01)
MK	69,8 $\pm$ 4,7	137,0 $\pm$ 9,7 (p<0,001)	55,1 $\pm$ 8,3	83,3 $\pm$ 15,8 (p=0,12)

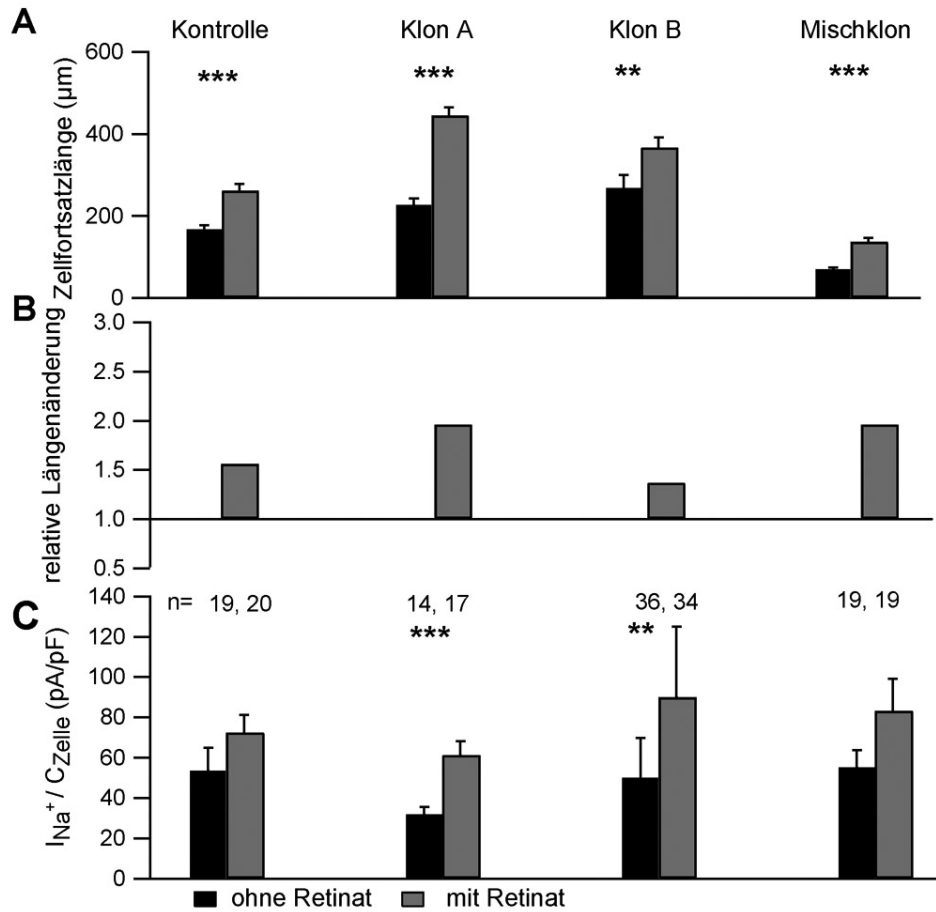
**Tabelle 5.4:** *Zunehmende Zellfortsätze und Natriumströme in SH-SY5Y Zellen unter 13-cis-Retinatinkubation (1 $\mu$ M)*

Die einzelnen Messwerte sind in Abbildung 5.17 graphisch dargestellt. Diese wurden mittels des Pulsprotokolles aus Abbildung 5.3 ermittelt.

-RA: ohne Retinat, +RA: 13-cis-Retinatinkubation für 48 h, ZFS: Zellfortsätze,  $I_{Na}$  Natriumstrom, A,B: Einzelzellklone, MK: Mischzellklon, Kon: Wildtypkontrolle

5.17 C). Beispielstromkurven und das dazugehörige Pulsprotokoll für die Aufnahme von Natriumströmen ist in Abbildung 5.3 abgebildet.

Ähnlich wie die Längen der Zellfortsätze schwanken die Natriumströme sehr stark zwischen den einzelnen Zellklonen und der Kontrolle. Dies ist ebenfalls einer natürlichen Variation zu zuschreiben, da die Zellen jeweils in unterschiedlichen Zellzyklusphasen waren und unterschiedlich lange Neuriten und Dendriten besaßen. Auffallend ist auch die geringere Zunahme des Natriumstroms unter Retinatbehandlung bei Zellen, die relativ hohe Natriumströme besaßen wie die Kontrolle oder der Mischklon, da sich diese Zellen zum Zeitpunkt der Retinatzugabe höchst wahrscheinlich schon in einem weiter differenzierten Stadium als Klon A und B befanden. Somit ist der Differenzierungseffekt von Retinat nicht mehr so stark gewesen.



**Abbildung 5.17:** Zunahme der Zellfortsatzlängen und der Natriumströme unter Retinatbehandlung bei den mit hEAG1 transfizierten Zellklonen und bei der Wildtypkontrolle

In **A** erkennt man die Erhöhung der Länge der Fortsätze der Zellen unter 48-stündiger Retinatbehandlung im Vergleich zur Kontrolle ohne Retinatzugabe. Die relative Veränderung der Dendriten- und Neuritenlängen ist in **B** dargestellt. Eine Unterscheidung der Neuriten von den Dendriten war mit dieser Methode nicht möglich. Die Natriumströme der Zellklone und der Kontrolle sind in **C** abgebildet und wurden mit Hilfe des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.3 aufgenommen. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Abschließend erkennt man, dass die mit hEAG1 transfizierten Klone sich hinsichtlich der Dendriten- und Neuriteninduktion unter Retinatininkubation gleich den Wildtypzellen verhalten, was bedeutet, dass EAG die Proliferation beeinflusst, aber dieser Strom auf die Differenzierung nur einen geringen Effekt zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass undifferenzierte Zellen ohne Fortsätze genauso viel EAG-Strom besitzen müssten, wie differenzierte Zellen. Einen ersten Hinweis hatte schon das Experiment aus Abbildung



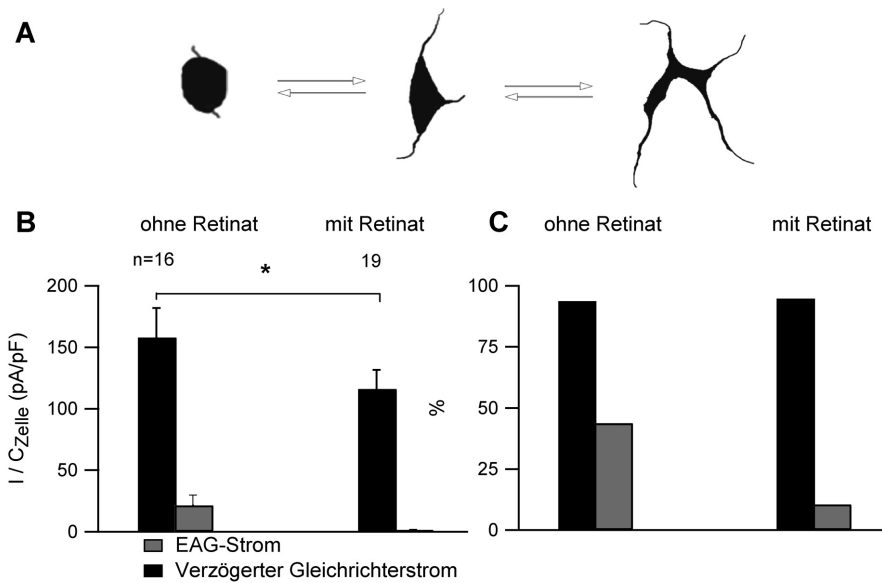
5.6 gegeben, da EAG nach 5 Tagen Zellenwachstum und Differenzierung nicht deutlich abgenommen hatte.

Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zellen in DMEM Medium anstelle von Zugabe des fetalen Kälberserums mit einem Zusatz eines durch einen speziellen Aktivkohlefilter gereinigten Serums kultiviert. Dieser Aktivkohlefilter besitzt eine sehr große Oberflächenstruktur, an der sich Proteine oder Glykoside ablagern. Dadurch können Wachstumsfaktoren, die wichtig für die Zelldifferenzierung sind, nahezu vollständig aus dem Serum entfernt werden. Zellen, die im Aktivkohle-gereinigten Medium angewachsen sind, befinden sich also in einem undifferenzierten Ausgangszustand. In Abbildung 5.18 A auf dem linken Bild ist eine Zelle in diesem Zustand skizziert. Weiter rechts erkennt man Zellen in weiter differenzierten Zellstadien (mittleres und rechtes Bild), wie sie sich zum Beispiel unter Zugabe von Wachstumsfaktoren, die im fetalem Kälberserum enthalten sind, befinden können. In Abbildung 5.19 sind die Fotos von SH-SY5Y Zellen dargestellt, die mit diesem speziell gereinigten Serum kultiviert worden sind, im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen, die unter Zusatz von fetalem Kälberserum angewachsen waren. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen mit dem gereinigten Serum geringerer differenziert sind und keine bzw. nur wenige Fortsätze besitzen.

Diese Zellen wurden elektrophysiologisch untersucht, und man konnte verzögerten Gleichrichterstrom und EAG-Strom messen. Die Stromhöhen (bezogen auf die Zellkapazitäten) unterschieden sich dabei nicht wesentlich von den SH-SY5Y Zellen, die im normalen Kälberserum kultiviert worden sind (Abbildung 5.18 B und C).

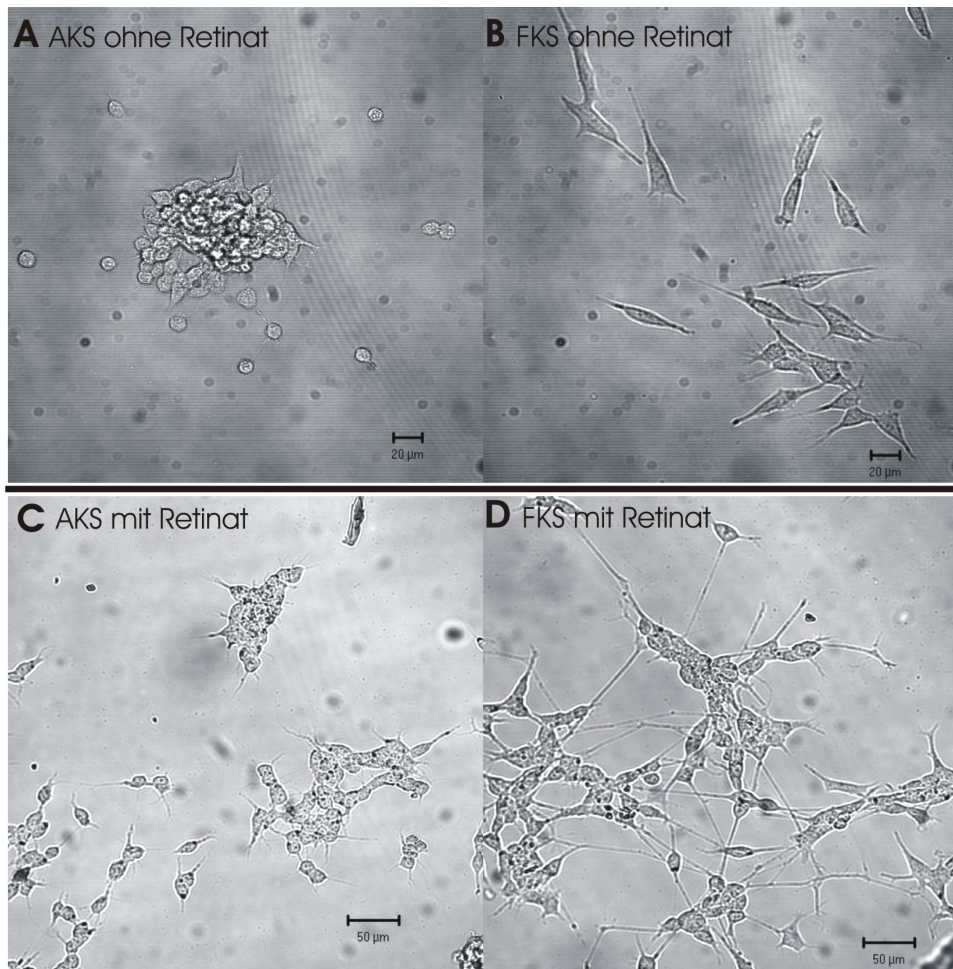
Man kann also vermuten, dass die Kaliumströme nicht mit der Zelldifferenzierung korrelieren und die leichte Differenzierung der Zellen im normalen fetalen Kälberserum keinen Einfluss auf diese Ströme hatte. Dieser Befund korrespondiert mit dem vorhergehenden Experiment, wo die Differenzierung der Zellklone unter Retinat untersucht worden ist. Wie bereits erwähnt, konnte in diesen Zellklonen, trotz des nicht ausschaltbaren EAG-Stromes eine Zelldifferenzierung durch Retinat induziert werden.

Weiterhin ergab sich die Frage, ob Retinat in der Lage ist, die Zelldifferenzierung einzuleiten, wenn keine externen Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Unter Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  13-cis-Retinat für 48 Stunden konnte eine Differenzierung von SH-SY5Y Zellen erreicht werden, die unter Zusatz des speziell gereinigten Serum kultiviert worden sind (Abbildung 5.19 B). Daraus lässt sich schließen, dass die durch Retinat induzierte Differenzierung von anderen Wachstumsfaktoren relativ unabhängig ist.



**Abbildung 5.18:** *EAG-Strom von SH-SY5Y Zellen in Nährmedium mit einem Serum ohne Wachstumsfaktoren*

**A** zeigt die schematische Darstellung der einzelnen Differenzierungsstadien von SH-SY5Y Zellen. Ganz links ist die undifferenzierte Form ohne Fortsätze als Modell dargestellt, wie sie bei SH-SY5Y Zellen vorkam, die ohne externe Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. **B** zeigt die Reduktion des EAG-Stroms unter Retinatzugabe für 48 Stunden. Sowohl die Stromdichte von EAG, als auch die Anzahl der EAG-positiven Zellen (**C**) nehmen unter  $1 \mu\text{M}$  13-cis-Retinat deutlich ab. \*  $p < 0,05$ .



**Abbildung 5.19:** *Differenzierung der SH-SY5Y Zellen im Wachstumsfaktor-freien Medium*

In **A** sind SH-SY5Y Zellen dargestellt, die 24 Stunden in DMEM Medium mit Zusatz von Aktivkohle-gereinigtem Serum und in **B** mit Zusatz von FKS kultiviert worden sind. Die Zellen mit Aktivkohle-gereinigtem Serum (**C**) und die Zellen mit FKS (**D**) wurden für 48 Stunden mit 1  $\mu$ M 13-cis-Retinat inkubiert.

## 5.5 Involvierung der PI3-Kinase in der Regulation von EAG

Die Signalwege, die durch Retinat zu einer Veränderung der Kaliumkanäle führen, sind noch nicht bekannt. Deswegen wurde der Frage nachgegangen, ob zwischen der Regulation von EAG durch Retinat und der durch Retinat induzierten Zelldifferenzierung ein Zusammenhang besteht. Die durch Retinat induzierte Ausdifferenzierung von SH-SY5Y Zellen, gekennzeichnet durch ein vermehrtes Neuritenwachstum, ist von der PI3-Kinase Aktivität abhängig (Lopez-Carballo et al. 2002). Außerdem konnte von Dr. Michael Grün (MZ, Jena, Prof. Wetzker, Deutschland) nach einer 5-tägigen Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  all-trans-Retinat in der RT-PCR ein deutliches Signal für mRNA der PI3-Kinase  $\gamma$  detektiert werden, während ohne Retinatzugabe keine Bande zu erkennen war.

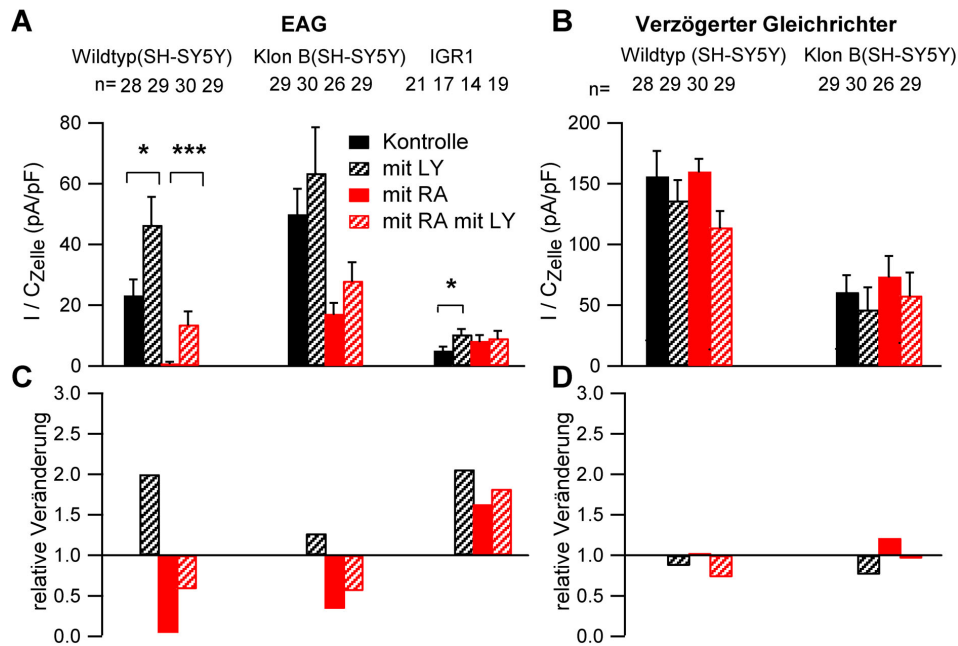
Aus diesem Grund wurde der Effekt des spezifischen PI3-Kinase Inhibitors LY 294002 auf die durch Retinat induzierte Reduktion von EAG-Strömen untersucht. Es stellte sich die Frage, ob eventuell ein Zusammenhang zwischen EAG-Kanälen, Retinaten und den PI3-Kinasen bestehen könnte.

Abbildung 5.20 A zeigt die mittleren EAG-Ströme von SH-SY5Y Zellen, die mit 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat für 24 Stunden behandelt worden sind, mit und ohne Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  LY 294002. Wie bereits zuvor beschrieben, führt Retinat nahezu zu einem kompletten Verlust des EAG-Stromes nach 24 Stunden. Wenn allerdings zusätzlich zum Retinat die Zellen mit LY 294002 inkubiert waren, war der Effekt von Retinat auf den EAG-Strom deutlich geringer.

Die mittlere EAG-Stromdichte bei SH-SY5Y Zellen reduzierte sich unter 24-stündiger Inkubation von 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat und zusätzlicher Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  LY 294002 von  $46,4 \pm 9,2$  pA/pF auf  $13,4 \pm 4,4$  pA/pF im Gegensatz zur Kontrolle, die ohne Zugabe von LY 294002 den EAG-Strom nahezu vollständig verloren hat. Außerdem hatten Zellen, die für 24 Stunden mit LY 294002 behandelt wurden, ungefähr um Faktor zwei mehr EAG-Strom, als die Kontrollzellen (Abbildung 5.20 A). Diese beschriebenen Ergebnisse reflektieren sich auch im Anteil der EAG-positiven Zellen. LY 294002 erhöhte den Anteil der EAG-positiven Zellen von 60% auf 80% und reduzierte den Effekt von Retinat deutlich, da unter zusätzlicher Zugabe von LY 294002 noch 41% der mit Retinat-behandelten Zellen EAG-Strom hatten. Zellen, die nur mit Retinat behandelt wurden, besaßen nach 24 Stunden nur noch einen Anteil von 13% von Zellen mit EAG-Strom (Daten nicht grafisch dargestellt).

Die Messung des mit hEAG1 transfizierten Zellklones B weist die gleiche Tendenz zur Veränderung des EAG-Stroms unter LY 294002 Applikation auf, jedoch fällt die Stromerhöhung durch LY 294002 geringer aus (Abbildung 5.20 A). Weiterhin ist in Abbildung 5.20 A die Melanomzelllinie IGR1 auf die Wirkung von LY 294002 untersucht worden. Wie bereits beschrieben, hat diese Zelllinie keine Reduktion des EAG-Stromes unter Retinatzugabe gezeigt (Abbildung 5.7). Ziel dieses Experimentes war es, festzustellen, ob LY 294002 auf den EAG-Strom in Zellen, in denen dieser nicht durch Retinat beeinflusst werden kann, eine Wirkung zeigen würde. Unter 24-stündiger Inkubation mit  $10\mu\text{M}$  LY 294002 konnte man in IGR1 Zellen eine signifikante ( $p < 0,02$ ) Erhöhung der EAG-Stromdichte um den Faktor zwei feststellen. Allerdings hatten auch IGR1 Zellen, die nur mit 13-cis-Retinat behandelt worden sind, mehr EAG-Strom, als die unbehandelten Kontrollen.

Der verzögerte Gleichrichterstrom zeigt in SH-SY5Y Zellen keine eindeutige Tendenz zur Veränderung unter Retinat bzw. LY 294002 Zugabe (Abbildung 5.20 B). In den IGR1 Zellen konnte kein verzögerter Gleichrichter elektrophysiologisch gemessen werden.



**Abbildung 5.20:** Die Reduktion des EAG-Stroms in SH-SY5Y Zellen ist von der PI3-Kinaseaktivität abhängig.

SH-SY5Y (Wildtypzellen und der mit hEAG1 stabil transfizierte Zellklon B) und IGR1 Zellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  13-cis-Retinat mit bzw. ohne Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  LY 294002 für 24 h kultiviert. In **A** und **B** sind der EAG-Strom und der verzögerte Gleichrichterstrom dargestellt, in **C** und **D** sind die relativen Veränderungen der beiden Ströme zu erkennen. Die Fehlerbalken sind als SEM angegeben. Die Ströme wurden mittels des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.2 aufgenommen. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Diese oben genannten Resultate weisen darauf hin, dass die PI3-Kinasen nicht nur eine morphologische Veränderung der Zellen bewirken können, sondern auch für die Regulation von Kaliumströmen eine wichtige Rolle spielen. Aber vielleicht hat LY 294002 auch einen direkten Effekt auf den EAG-Kanal, und die beschriebenen Wirkungen auf den EAG-Strom werden nicht über eine Hemmung der PI3-Kinasen vermittelt. Um dies zu untersuchen, wurde LY 294002 akut während einer Messung zu SH-SY5Y Zellen appliziert und dabei die Höhe der spannungsgesteuerten Kaliumströme bestimmt. Hierfür wurde das Pulsprotokoll aus Abbildung 5.2 verwendet, mit dem man EAG, verzögerten Gleichrichter und ERG elektrophysiologisch messen konnte. Insgesamt wurden 5 SH-SY5Y Zellen mit EAG, ERG bzw. verzögertem Gleichrichter gemessen, und einige repräsentative Stromkurven sind in Abbildung 5.21 A und B abgebildet. Interessanterweise konnte man einen direkten Effekt von LY 294002 an diesen spannungsgesteuerten

Kaliumkanälen feststellen. Die akute Applikation von LY 294002 wurde mit 1  $\mu\text{M}$  durchgeführt, da bei 10  $\mu\text{M}$  sofort alle EAG-Kanäle blockiert wurden.

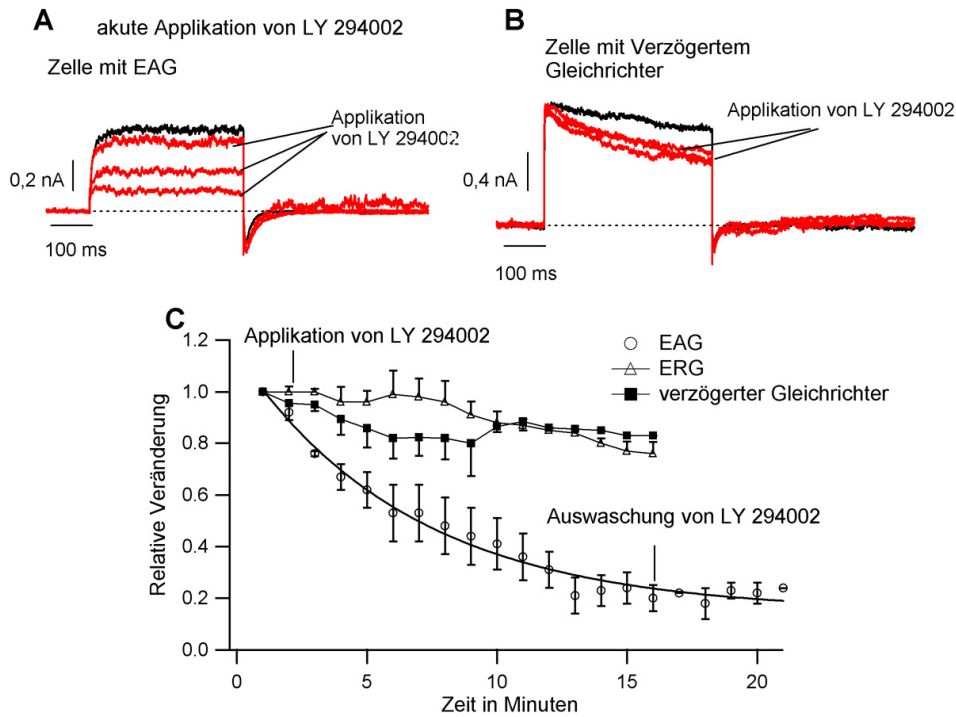
Abbildung 5.21 zeigt die Veränderung der Kaliumströme bei SH-SY5Y Zellen, denen akut 1  $\mu\text{M}$  LY 294002 während der Messung zugegeben worden ist. Dargestellt sind aus dem Pulsprotokoll aus Abbildung 5.2 die Stromkurven mit einer Vordepolarisation von -60 mV. Der EAG-Strom wurde durch die akute Applikation von 1  $\mu\text{M}$  LY 294002 deutlich abgeschwächt, während der verzögerte Gleichrichterstrom und der ERG-Strom nur einen geringen Verlust der Stromamplitude aufwiesen (Abbildung 5.21).

Weiterhin wurde der zeitliche Zusammenhang zwischen der Herabsetzung des EAG-Stroms, des ERG-Stroms und des verzögerten Gleichrichterstroms unter Zugabe von LY 294002 in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  untersucht. In Abbildung 5.21 C erkennt man die relative Veränderung der drei Kaliumströme nach Beginn der LY 294002 Zugabe. Der verzögerte Gleichrichterstrom und der ERG-Strom verringern sich auf ca. 80% des Ausgangswerts nach einer Zeitdauer von 15 Minuten. Die Absenkung des EAG-Stromes ist deutlicher. Dieser beträgt nach 15 Minuten nur noch 20% des Ausgangswertes. Ab der 15. Minute wurde die Lösung mit 1  $\mu\text{M}$  LY 294002 wieder gegen die Standard-Extrazellulärlösung ausgetauscht. Man konnte jedoch keine erneute Erhöhung des EAG-Stromes feststellen. Die Zeit, nach der 50% der EAG-Kanäle unter Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  LY 294002 blockiert waren, konnte ungefähr mit 5,5 Minuten ermittelt werden.

Die Beeinflussung der Kaliumströme durch LY 294002 bei akuter Applikation könnte man auf eine Anlagerung der Substanz an die Kanäle aufgrund ihres ausgeprägten lipophilen Charakters zurückführen (Abbildung 5.22). Aus diesem Grund wurden mit LY 294002 inkubierte Zellen vor den Messungen mehrfach mit der Badlösung gespült, um LY 294002 gründlich auszuwaschen.

Dass der PI3-Kinase Inhibitor LY 294002 nicht durch eine direkte Wirkung am EAG-Kanal einen stromerhöhenden Effekt auf EAG hat, unterstreicht die Hypothese, dass PI3-Kinasen an der Regulation von EAG beteiligt sein könnten. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurde ein weiterer Inhibitor der PI3-Kinasen appliziert. Dabei handelte es sich um die Substanz AS 041164, die spezifisch die Isoform  $\gamma$  der PI3-Kinasen blockiert.

Diese Substanz wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  für einen Zeitraum von 6 Stunden den SH-SY5Y Zellen hinzugegeben, und anschließend sind EAG und verzögerter Gleichrichter bestimmt worden. Man wählte den Zeitraum von 6 Stunden, da eine Veränderung des EAG-Stroms nach dieser kurzen Zeit am ehesten durch PI3-Kinasen und nicht durch transkriptionelle Vorgänge beeinflusst wird. Durch dieses Experiment



**Abbildung 5.21:** Blockade des EAG-Kanals mittels akuter Applikation von  $1 \mu\text{M}$  LY 294002

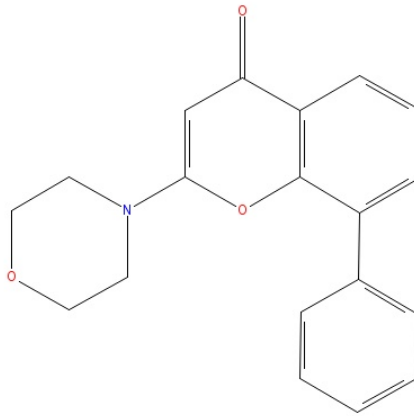
Das Pulsprotokoll, mit denen die Stromkurven aufgenommen wurden, ist in 5.2 dargestellt, jedoch sind nur die Stromkurven bei einem Vorpuls auf  $-60 \text{ mV}$  abgebildet. **A** zeigt den Effekt von LY 294002 auf Zellen mit EAG (100% EAG) und **B** auf Zellen mit verzögertem Gleichrichter (100% verzögerter Gleichrichter). Die Stromkurven (rot) wurden ca. 5 bis 8 Minuten nach Austausch der Badlösung aufgezeichnet. Die schwarze Kurve wurde vor dem Austausch der Badlösung aufgenommen. ERG-Strom ist nach der Depolarisation als einwärtsgerichteter Strom in beiden Abbildungen zu erkennen.

**C** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Veränderung von verzögertem Gleichrichter, ERG und EAG bei akuter Applikation von LY 294002. Die Applikation dieser Substanz erfolgte nach einer Minute. Nach 15 Minuten wurde LY 294002 wieder ausgewaschen, indem die extrazelluläre Lösung durch die Standardlösung ausgetauscht wurde. Die Kurve wurde mittels der Gleichung 3.2 gefittet.

SEM als Fehlerbalken dargestellt. In **C** war die Anzahl der unabhängigen Experimente jeweils 3-5.

konnten die oben genannten Ergebnisse des Versuches mit LY 294002 bekräftigt werden. Unter Zugabe von AS 041164 erhöhte sich der Anteil der Zellen mit EAG-Strom von ca. 50% auf etwa 90%. Im Einklang mit diesem Ergebnis verhielt sich ebenfalls die EAG-Stromdichte, die sich von  $10,5 \pm 3,27 \text{ pA/pF}$  auf  $21,5 \pm 3,03 \text{ pA/pF}$  ( $p=0,015$ ) verdoppelte (Abbildung 5.23 C). Die Anzahl der Zellen mit verzögertem Gleichrichterstrom





**Abbildung 5.22:** *Strukturformel von LY 294002*

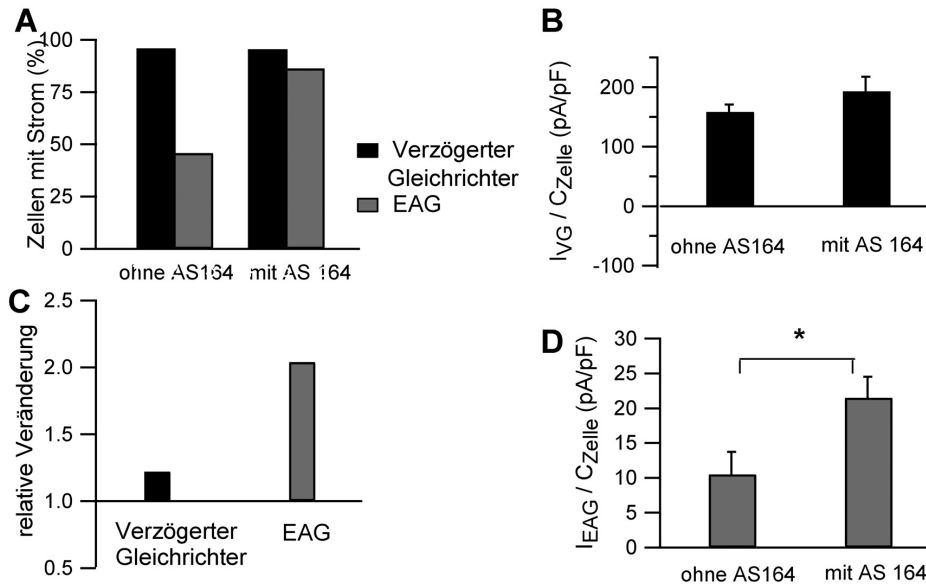
Der PI3-Kinase Inhibitor LY 294002 ist aus mehreren hydrophoben Ringsystemen aufgebaut und besitzt damit einen ausgeprägten lipophilen Charakter.

blieb unbeeinflusst bei 100% (Abbildung 5.23 A), und dieser Strom verzeichnete auch nur eine geringe Zunahme unter AS 041164 Inkubation (Abbildung 5.23 B).

Wie bereits bei der Substanz LY 294002 beschrieben, wurde AS 041164 akut zu SH-SY5Y Zellen hinzugegeben, um einen eventuellen direkten Einfluss dieser Substanz auf Kaliumkanäle festzustellen. Wie in Abbildung 5.24 dargestellt, unterscheidet sich AS 041164 von LY 294002 hinsichtlich einer akuten Wirkung auf Kaliumkanäle, da AS 041164 keinen direkten Effekt zeigt.

Zusammenfassend kann man erkennen, dass durch Inkubation über mehrere Stunden der SH-SY5Y Zellen mit zwei unterschiedlichen Substanzen, die beide die PI3-Kinasen hemmen, eine Erhöhung des EAG-Stromes erreicht werden kann. Man kann vermuten, dass diese Zunahme nicht auf einen akuten Effekt am Kanal zurückzuführen ist, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Veränderung des EAG-Stromes über die PI3-Kinasen vermittelt wird.

Falls eine Blockade der PI3-Kinasen zu einem Anstieg des EAG-Stromes führen würde, dann müsste umgekehrt ein erhöhte Expression dieser Enzyme den EAG-Strom reduzieren. Diese Überlegung ist die Grundlage für das folgende Experiment, in dem SH-SY5Y Zellen mit dem PI3-Kinase Gen transfiziert wurden, so dass diese Zellen die PI3-Kinasen überexprimieren.



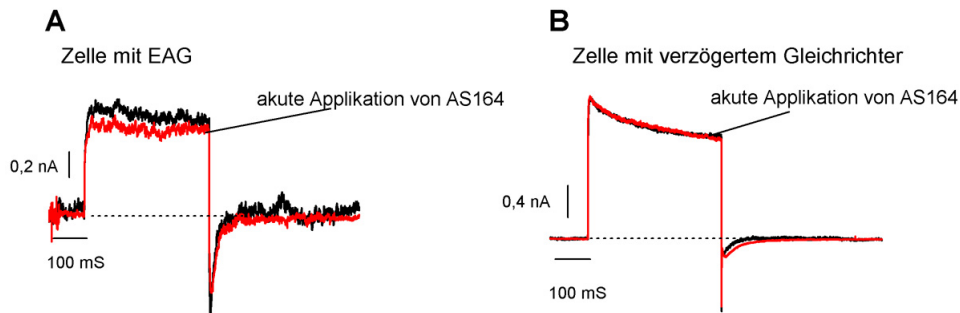
**Abbildung 5.23:** Erhöhung des EAG-Stromes in SH-SY5Y Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  AS 041164.

In **A** ist der Anteil der Zellen mit EAG-Strom bzw. verzögertem Gleichrichterstrom dargestellt. In **B** erkennt man den Einfluss von AS 041164 auf den verzögerten Gleichrichter ( $I_{VG}$ ) und in **D** auf den EAG-Strom ( $I_{EAG}$ ). Abbildung **C** zeigt die relativen Veränderungen der Ströme nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  AS 041164. SEM als Fehlerbalken. Zeitdauer der Inkubation mit AS 041164 betrug 6 Stunden. \*  $p < 0,05$ . Für alle Abbildungen gilt  $n > 20$ .

Es wurden zwei Varianten der PI3-Kinase  $\gamma$  ausgewählt: die natürlich vorkommende Variante und eine Form der PI3-Kinase  $\gamma$ , die mit einem CAAX-Anhang versehen war, der sich aufgrund seiner starken Hydrophobie an die Zellmembran anlagerte. Durch diese Membranbindung besitzt diese Form der PI3-Kinase  $\gamma$  hauptsächlich eine Lipidkinaseaktivität. Der Lokalisationsort der natürlichen PI3-Kinasen liegt vorwiegend im Zytosol, und es ist bekannt, dass diese neben der Lipidkinaseaktivität eine Proteinkinaseaktivität hat.

Es wurden zwei Formen der PI3-Kinase  $\gamma$  mit CAAX Anhang transfiziert: ein funktionsfähiges PI3-Kinase  $\gamma$  Protein mit PI3-Kinase Aktivität und eine K832R-Mutante, die keine PI3-Kinase Aktivität hatte.

SH-SY5Y Zellen, die mit der aktiven Form der PI3-Kinase  $\gamma$  transfiziert wurden, hatten eine mittlere EAG-Stromdichte von  $35,4 \pm 12,9$  pA/pF, während der Mittelwert der EAG-Stromdichte in den mit der inaktiven Form der PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten SH-SY5Y Zellen  $53 \pm 10,2$  pA/pF betrug ( $P = 0,027$ ) (Abbildung 5.25 B). Ebenfalls war der Anteil



**Abbildung 5.24:** Keine Veränderung der Kaliumströme bei akuter Applikation von  $10 \mu\text{M}$  AS 041164

Diese Stromkurven wurden mittels des Pulsprotokolls aus Abbildung 5.2 aufgenommen. Es werden jedoch nur die Stromkurven bei einem Vorpuls von  $-60 \text{ mV}$  dargestellt. In **A** sind SH-SY5Y Zellen mit EAG-Strom und in **B** mit verzögertem Gleichrichterstrom dargestellt. Die abgebildeten Stromkurven (rot) unter akuter AS 041164 Applikation wurden 5 Minuten nach Austausch der kompletten Badlösung aufgenommen. Die schwarze Kurve wurde vor dem Austausch der Badlösung aufgenommen. Außerdem ist der ERG-Strom in der Repolarisationsphase in beiden Abbildungen zu erkennen.

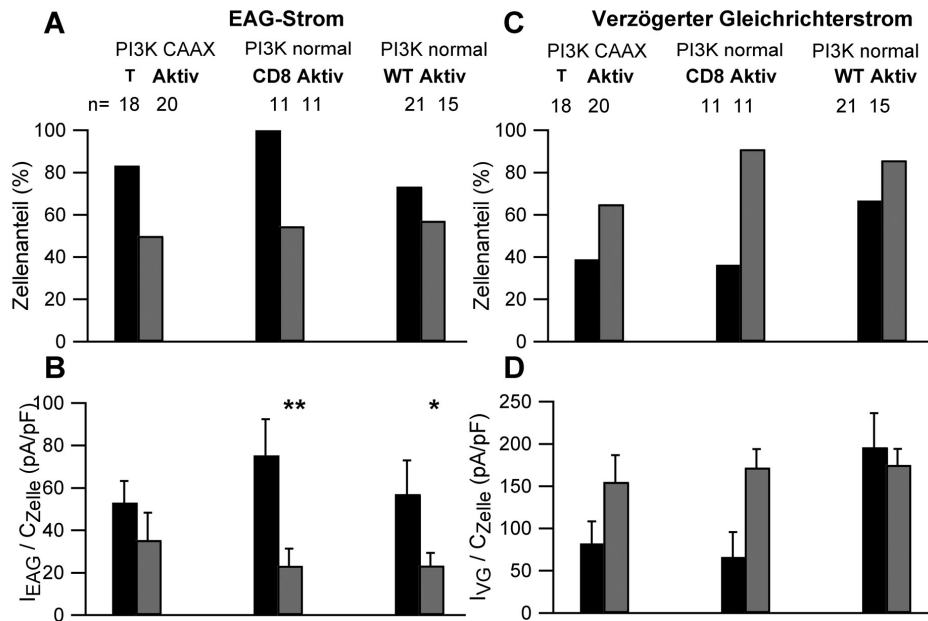
der EAG-positiven Zellen bei den mit der aktiven PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten Zellen deutlich geringer als bei den mit der inaktiven Form der PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten Zellen (Abbildung 5.25 A).

Ähnliche Ergebnisse zeigten Zellen, die mit der natürlichen PI3-Kinase  $\gamma$  transfiziert wurden. Diese Zellen wurden mit zwei verschiedenen Kontrollen verglichen: mit nicht transfizierten Wildtypzellen und mit CD8 transfizierten Zellen. Im Vergleich zur CD8-Kontrollgruppe halbierte sich der Anteil der EAG-positiven Zellen bei den mit PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten Zellen von 100% auf 54,5%, und die EAG-Stromdichte zeigte eine Reduktion von  $75,3 \pm 17,3 \text{ pA/pF}$  auf  $23,2 \pm 8,2$  ( $p=0,01$ ) (Abbildung 5.25 A).

Beim Vergleich der mit natürlicher PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten SH-SY5Y Zellen mit nicht transfizierten Wildtypzellen als Kontrolle, konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Zellen mit EAG von 75% auf 50% beobachtet werden (Abbildung 5.25 A). Ähnlich wie der Anteil der EAG-positiven Zellen verhielt sich die EAG-Stromdichte. Die mittleren EAG-Stromdichten betragen  $23,2 \pm 8,2 \text{ pA/pF}$  bei den mit PI3-Kinase  $\gamma$  transfizierten Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen, die im Mittel  $57,1 \pm 15,9 \text{ pA/pF}$  EAG-Strom besaßen ( $p=0,05$ ) (Abbildung 5.25 B).

Der verzögerte Gleichrichterstrom zeigte keine eindeutige Tendenz zur Veränderung unter der Transfektion mit PI3-Kinase (Abbildung 5.25 C und D).

Mit diesem Experiment konnte man also die Vermutung, dass die PI3-Kinasen die EAG-Stromdichte in SH-SY5Y Zellen beeinflussen können, bestätigen. Durch die Transfektion mit dem PI3-Kinase Gen konnte eine deutliche Reduktion des EAG-Stromes bei allen drei voneinander unabhängigen Versuchen gezeigt werden.



**Abbildung 5.25:** Herunterregulation von EAG-Strom durch Überexpression der PI3-Kinasen in SH-SY5Y Zellen

**A** Dargestellt ist der Anteil der EAG-positiven Zellen, und im Diagramm **B** ist die Höhe der mittleren EAG-Ströme (bezogen auf die Zellkapazität) zu erkennen. Der verzögerte Gleichrichterstrom ist in Abbildung **C** und **D** abgebildet.

Fehlerbalken als SEM. T: inaktive Form (nicht funktionsfähiges PI3-Kinase Protein); Aktiv: funktionsfähiges PI3-Kinase Protein; WT: Wildtyp (nicht transfiziert); CD8: mit CD8 transfiziert, PI3K: PI3-Kinase, normal: natürliche PI3-Kinase ohne CAAX Anhang  
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

# 6 Diskussion

## 6.1 Zusammenhänge zwischen EAG-Kanälen, Proteinkinasen und Retinaten

Es wird angenommen, dass Kaliumkanäle für die Proliferation von Tumorzellen eine sehr wichtige Rolle spielen (Wonderlin und Strobl 1996, Pardo et al. 1999, Kunzelmann 2005). Insbesondere spannungsgesteuerte Kaliumkanäle können die Zellproliferation beeinflussen (O'Grady und Lee 2005, Pardo et al. 2005). Es wird postuliert, dass der zu den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen gehörende EAG-Kanal, der in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y vorkommt, eine wichtige Rolle bei der Tumorpheriferation hat (Pardo et al. 1999). Die SH-SY5Y Zelllinie ist eine Modellzelllinie für die Differenzierung von Neuroblastomen, die zum Beispiel durch Retinat oder andere Signalwege eingeleitet werden kann.

In SH-SY5Y Zellen konnte der EAG-Kanal elektrophysiologisch gemessen werden, und zusätzlich war es möglich, in zwei weiteren Neuroblastomzelllinien (SK-N-FI und SK-N-SH) diesen Strom nachzuweisen. Alle Zelllinien mit EAG besaßen ein den Nervenzellen sehr ähnliches morphologisches Erscheinungsbild (N-Typ, nach Voigt et al. (2002)).

### 6.1.1 Retinate beeinflussen EAG-Kanäle mittels transkriptioneller Kontrolle

Die Tatsache, dass der potentiell onkogen wirkende EAG-Kanal während der durch Retinat induzierten Differenzierung herunterreguliert wird (Meyer und Heinemann 1998), lässt neue Mechanismen für den Effekt von Retinat auf Neuroblastomzellen vermuten. Diese Möglichkeit, dass Kaliumkanäle an diesem Effekt von Retinat beteiligt sind, wurde bislang noch nicht in Betracht gezogen.

Nach einer 48-stündigen Retinatbehandlung war der EAG-Strom fast vollständig ausgeschaltet, während der verzögerte Gleichrichter eine Stromerhöhung auf das 1.3-Fache zeigte (Meyer und Heinemann 1998). Der verzögerte Gleichrichterstrom repräsentiert eine Klasse von Kaliumkanälen, welche sich durch einen unterschiedlichen Aufbau unterteilen lassen. Zu diesen Kanälen zählt in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y der Kv3.1 Kanal (Friederich et al. 2003). Dieser Kanal leitet keine Kaliumionen während eines normalen Ruhemembranpotentials von ungefähr -30 mV in Neuroblastomzellen, sondern der verzögerte Gleichrichter aktiviert erst bei positiveren Membranpotentialen (Meyer und Heinemann 1998). ERG-Kanäle, die ebenfalls diskutiert werden, an der Entstehung von Tumoren mitzuwirken, werden nicht bzw. nur nach sehr langer Behandlung mit Retinat beeinflusst (Meyer und Heinemann 1998, Arcangeli et al. 1999). Deswegen wurde in den Experimenten dieser Arbeit der Einfluss von Retinat auf den EAG-Kanal und den verzögerten Gleichrichterstrom untersucht.

Es war von Interesse, festzustellen, ob die Reduzierung des EAG-Stromes über verschiedene Retinatrezeptoren vermittelt werden kann. Offensichtlich haben 13-cis- und all-trans-Retinat (beide in einer Konzentration von 1  $\mu$ M) den gleichen Effekt auf den EAG-Strom. All-trans-Retinat aktiviert RAR-Rezeptoren, während 13-cis-Retinat sich an RAR- und RXR-Rezeptoren anlagert (Voigt et al. 2000). Man könnte also vermuten, dass über beide Retinatrezeptoren die Reduktion von EAG vermittelt wird. Allerdings lässt dieses Ergebnis offen, über welche Retinatrezeptoren EAG beeinflusst wird, da man beachten sollte, dass ein Teil des 13-cis-Retinats in all-trans-Retinat überführt wird. Aktuell konnte von Armstrong et al. (2005) gezeigt werden, dass die Isomerisierung von 13-cis-Retinat zu all-trans-Retinat in Neuroblastomzellen verantwortlich ist für die gewünschten Effekte von Retinat bei der Behandlung von Neuroblastomen. Da 13-cis-Retinat jedoch häufiger in klinischen Studien verwendet wird (Reynolds et al. 2003, Matthay et al. 1999), wurde diese Substanz für weitere Experimente eingesetzt.

In den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SK-N-FI, die mit 1  $\mu$ M Retinat für jeweils 24 oder 48 Stunden behandelt worden sind, konnte nach 24 oder 48 Stunden nahezu kein EAG-Strom mehr nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde die EAG exprimierende Melanomzelllinie IGR1 verwendet, auf die Retinat keine Wirkung zeigte. Die fehlende Reduktion des EAG-Stromes unter Retinatinkubation ist möglicherweise auf fehlende Retinatrezeptoren zurückzuführen. Tatsächlich gibt es bestimmte Melanomzelllinien, in denen keine Retinatrezeptoren vorkommen (Boehm et al. 2004). Währenddessen konnte Niu et al. (2005) zeigen, dass in bestimmten Melanomzelllinien, wie in der A375 Zelllinie, durch Retinate eine Hemmung der Proliferation induziert werden konnte.

Außerdem konnte durch Applikation von Retinat über verschiedene Zeiträume der Zeitwert abgeschätzt werden, nachdem 13-cis-Retinat in einer Konzentration von 1  $\mu$ M den EAG-Strom auf 50% reduzierte. Dieser Wert ist mit circa 5 Stunden ein Hinweis darauf, dass eine transkriptionelle Kontrolle des EAG-Kanals durch Retinat vorliegen könnte. Retinate können durch Aktivierung von Retinatrezeptoren verschiedenste Funktionen in der Zelle mittels Kontrolle der Transkription von bestimmten Zielgenen beeinflussen (Lefebvre et al. 2005). Bisher konnte jedoch noch keine Transkriptionskontrolle von Kaliumkanälen durch Retinat gezeigt werden.

Um zu untersuchen, ob der EAG-Kanal in Anwesenheit von Retinat durch Transkription reguliert wird, wurden Zellklone mit einem konstitutiven hEAG1-Promotor hergestellt. Obwohl die Stromdichten von EAG in diesen Zellklonen variierten, besaßen alle Klone deutlich mehr EAG-Strom, als die Wildtypkontrolle bzw. als der Kontrollklon, der mit dem EGFP-Vektor transfiziert worden ist, um Veränderungen des EAG-Stromes, die durch eine Transfektion bedingt sind, auszuschließen.

Nach einer 48-stündigen Retinatbehandlung ließ sich bei den mit hEAG1 stabil transfizierten Zellklonen der EAG-Strom nicht vollständig herunterregulieren, im Gegensatz zu den beiden Kontrollen, so dass man auf einen transkriptionellen Regulationsmechanismus schließen kann. Falls die Regulation des EAG-Stromes durch Retinat hauptsächlich durch andere Mechanismen, wie zum Beispiel durch eine Kanalphosphorylierung, bedingt sein würde, dann könnte durch das zusätzlich eingebrachte hEAG1 Gen nicht sichergestellt werden, dass sich permanent funktionelle EAG-Kanäle im Gegenwart von Retinat in der Zellmembran befinden.

Allerdings ist es nicht eindeutig, ob die Reduktion der mRNA von EAG unter Retinainkubation um den Faktor 2 nach 24 Stunden den nahezu vollständigen Verlust des EAG-Stromes erklären kann. Es könnten also noch andere Mechanismen eine wichtige Rolle spielen. Man sollte aber auch bedenken, dass die Menge von funktionellem Protein in der Plasmamembran nicht zwangsläufig zum Gehalt der mRNA Menge korreliert, die das Protein kodiert. Untereinheiten von Kaliumkanälen müssen sich untereinander finden, so dass sie tetramere Strukturen im *endoplasmatischen Retikulum* bilden, damit eine anschließende Translokation in die Zellmembran möglich ist (Deutsch 2002). Folglich könnte bei kritisch niedrigen mRNA Konzentrationen eine zusätzliche Reduktion der Translationsvorlagen die tetramere Formation und damit die Proteintranslokation reduzieren.

## 6.1.2 Beeinflussung der EAG-Kanäle durch PI3-Kinasen

Die geringe Reduktion der mRNA nach 24 Stunden bei gleichzeitigem fast vollständigem Verlust des EAG-Stromes kann allerdings auch ein Hinweis auf Regulationsmechanismen sein, die nach der Transkription erfolgen. Eine Möglichkeit wäre die Beeinflussung des EAG-Kanals durch Proteinkinasen. Zu dieser Enzymgruppe zählen die PI3-Kinasen, die über Phospholipide als Signalmediatoren in der Zelle verschiedenste Vorgänge, unter anderem auch die Funktion von Ionenkanälen, beeinflussen können (Foster et al. 2003). Aktuell konnte von Srivastava et al. (2005) eine Beeinflussung von den kalziumabhängigen Kaliumkanälen KCa3.1 durch PI3-Kinasen gezeigt werden.

Der Zusammenhang zwischen Retinaten und PI3-Kinasen in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurden von Lopez-Carballo et al. (2002) untersucht. Seine Arbeitsgruppe konnte eine Zunahme der PI3-Kinase Aktivität nach Stimulation von SH-SY5Y Zellen mittels Retinat beschreiben. Dr. Michael Grün (MZ, Prof. Wetzker, Jena, Deutschland) konnte in verschiedenen Neuroblastomzelllinien die PI3-Kinase  $\gamma$  mittels RT-PCR detektieren, wobei in SH-SY5Y Zellen diese Isoform nur nach Stimulation mittels Retinat nachweisbar war, während man ohne Retinatzugabe kein Signal erkennen konnte. Möglicherweise besteht zwischen der Reduktion von EAG-Kanälen und der Zunahme der Aktivität der PI3-Kinase durch Retinate ein Zusammenhang.

Es konnte festgestellt werden, dass nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem spezifischen PI3-Kinase-Blocker LY 294002 in SH-SY5Y Zellen sich der EAG-Strom um ungefähr Faktor zwei erhöhte. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Regulation des EAG-Kanals über die bekannten Phospholipidsignalwege beeinflusst werden kann. Außerdem hat dieser spezifische PI3-Kinase Hemmer in Gegenwart von Retinat den Verlust von EAG in SH-SY5Y Zellen verhindert. Ähnliche Veränderungen am EAG-Strom zeigte LY 294002 auch in den mit hEAG1 transfizierten SH-SY5Y Zellen, jedoch fiel der stromerhöhende Effekt geringer aus, so dass man vermuten kann, dass nur der endogene EAG-Strom in den transfizierten Zellen, und nicht der zusätzlich durch die Transfektion eingebrachte EAG-Strom, durch die PI3-Kinase reguliert wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass höchstwahrscheinlich die PI3-Kinase die Transkription der mRNA für EAG beeinflussen kann.

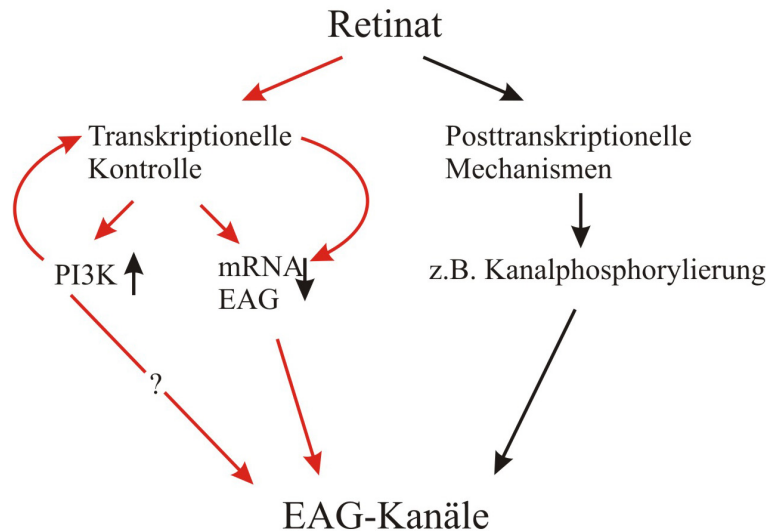
Auch in den Melanomzellen IGR1, die unter Retinatinkubation keine Veränderung des EAG-Stromes zeigten, wurde der EAG-Strom unter Inkubation mit LY 294002 um Faktor zwei erhöht. Jedoch zeigten diese Zellen eine sehr große Variabilität der EAG-Stromdichte, so dass man nicht sicher davon ausgehen kann, dass die Erhöhung des EAG-Stromes auf einen Effekt von LY 294002 zurück zuführen ist.



Ein direkter Effekt von LY 294002 auf den EAG-Kanal, der den EAG-Strom erhöht, liegt wahrscheinlich nicht vor, da bei akuter Applikation dieser Substanz der EAG-Kanal deutlich blockiert wurde. Jedoch konnte man mit den Experimenten in dieser Arbeit nicht ausschließen, dass die Blockade von EAG über Phospholipidsignalwege vermittelt wird, da die Veränderung von Spaltprodukten der PI3-Kinasen nach Zugabe von LY 294002 nicht bestimmt wurde. Allerdings ist bekannt, dass LY 294002 spannungsgesteuerte Kaliumkanäle über direkte Mechanismen an den Kanälen blockieren kann. Es konnte unter anderem von El-Kholy et al. (2003) gezeigt werden, dass Kv1.4 und Kv2.1 Kanäle durch LY 294002 geblockt werden.

Es hatte den Anschein, dass die Isoform  $\gamma$  der PI3-Kinase, die mittels RT-PCR in SH-SY5Y Zellen nachgewiesen wurde, an der Regulation des EAG-Stromes beteiligt sein könnte, so dass der spezifische Hemmer AS 041164 für die PI3-Kinase  $\gamma$  zu den SH-SY5Y Zellen appliziert wurde. Die Erhöhung des EAG-Stromes nach 6-stündiger Inkubation und der fehlende akute Effekt von AS 041164 auf den EAG-Kanal sind deutliche Hinweis darauf, dass der EAG-Strom über die PI3-Kinase  $\gamma$  reguliert werden kann. Jedoch kann man eine Beeinflussung von EAG durch andere Isoformen der PI3-Kinasen nicht ausschließen.

Es ist gezeigt worden, dass SH-SY5Y Zellen, die transient mit PI3-Kinase-DNA transfiziert worden sind, sichtbar weniger EAG-Strom besaßen als die Kontrollen. Wahrscheinlich haben die sich intrazellulär befindenden PI3-Kinasen, für die neben einer Lipidkinaseaktivität auch eine Proteinkinaseaktivität beschrieben ist, einen größeren Einfluss auf die EAG-Kanäle als PI3-Kinasen, die nur eine Lipidkinaseaktivität besitzen, da die sich in der Zellmembran befindende PI3-Kinase  $\gamma$  mit CAAX Anhang eine geringere Beeinflussung der EAG-Ströme als die natürliche PI3-Kinase  $\gamma$  zeigte.



**Abbildung 6.1:** *Mögliche Regulationsmechanismen des EAG-Kanals*

Die roten Pfeile stellen neue Erkenntnisse dar, wie EAG-Kanäle durch Retinate beeinflusst werden können. Die PI3-Kinase scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation von EAG zu spielen. Die Regulation von EAG durch die PI3-Kinase kann über Zwischenschritte ablaufen, die jedoch nicht näher untersucht wurden. Allerdings kann es auch sein, dass die Transkription des EAG-Kanals über die PI3-Kinase reguliert wird.

Schwarz dargestellt sind andere nicht auszuschließende Mechanismen, die nicht näher untersucht werden konnten.

↑ Hochregulation ↓ Herunterregulation

## 6.2 Rolle des EAG-Kanals bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung

Eine weiteres Hauptanliegen dieser Arbeit war, der Frage nachzugehen, ob die bekannte Reduktion von EAG-Kanälen durch Retinate (Meyer und Heinemann 1998) in Verbindung mit den bereits viel früher beschriebenen Effekten von Retinat auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Sidell 1982, Thiele et al. 1985) steht. Diese Frage konnte mit Hilfe der stabilen mit hEAG1 transfizierten Zellklone nachgegangen werden, indem die Proliferation und Differenzierung *in vitro* unter Zugabe von Retinat bestimmt und mit den Wildtypzellen verglichen worden ist. Bei der Herstellung von solchen Zellklonen stellt allerdings die große Variabilität der Proliferationsrate der Zellklone, die oft nach der Selektion beobachtet wird, ein großes Problem dar. Um solche zufälligen Effekte aus-

zuschließen, wurden insgesamt 5 unabhängige stabile Zellklone mit hEAG1 hergestellt. Gemeinsam war allen Klonen, dass sie deutlich mehr EAG-Strom als die Wildtypkontrollen besaßen. Außerdem wurde zusätzlich zur nicht transfizierten Wildtypkontrolle ein stabiler, mit dem EGFP-Vektor transfizierter Zellklon, als weitere Kontrolle verwendet.

### 6.2.1 Einfluss von EAG auf die Zellproliferation

Pardo et al. (1999) konnte zeigen, dass ein Zellklon der Zelllinie CHO (*Chinese Hamster Ovary*), der diese EAG-Kanäle überexprimiert, eine deutlich gesteigerte Zellproliferation hatte und somit auf ein onkogenes Potential für EAG hindeutet. Weiterhin konnte von Gavrilova-Ruch et al. (2002) dargestellt werden, dass durch eine Blockade von EAG-Kanälen mittels Imipramin die Proliferation in IGR1 Melanomzellen deutlich reduziert werden konnte.

Allerdings gibt es auch Hinweise auf physiologische Funktionen von EAG-Kanälen in Neuronen, da in diesen aus verschiedenen Regionen des Gehirns das EAG1 Gen isoliert werden konnten (Jeng et al. 2005). Neuronen verharren im Gegensatz zu Tumorzellen in der G0 Phase im Zellzyklus und sind durch eine Teilungsunfähigkeit gekennzeichnet. Außerdem konnte bei Untersuchungen in Gliomen in Bezug auf die Expression von hEAG1 gefunden werden, dass niedrig maligne Gliome eine hohe Expression von hEAG1 zeigen, während bei hochmalignen Gliomen nur ein schwaches Signal zu erkennen war (Patt et al. 2004). Aus diesen Gründen war von Interesse, das onkogene Potential der mit hEAG1 transfizierten stabilen Zellklone im Vergleich zu den Wildtypzellen zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob EAG in diesem Zellsystem wirklich ein Onkogen darstellt oder physiologische Funktionen besitzt.

Wie bereits Unterschiede bei den EAG-Strömen und bei dem Effekt von Retinat auf diesen Strom deutlich geworden sind, variierte auch die Proliferation der stabilen Zellklone und der Kontrollen. Im Vergleich wird jedoch deutlich, dass alle mit EAG transfizierten Zellklone weniger empfindlich auf den proliferationsverlangsamenden Effekt von Retinat waren, als die beiden Kontrollen (Wildtyp und EGFP transfizierte Zellen). Interessanterweise ist beim Zellklon B mit der langsamsten Proliferation unter Retinatzugabe auch der größte Teil des EAG-Stromes unter Retinat reduziert worden. Man kann also annehmen, dass EAG in den SH-SY5Y tatsächlich ein onkogenes Potential besitzt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Arbeit von Pardo et al. (1999), wobei allerdings die Experimente nur von einem mit EAG transfizierten Zellklon der CHO Zelllinie ausgingen. Dadurch bestand das Risiko, dass diese Proliferationssteigerung nur ein zufälliger Effekt war.

In dieser Arbeit konnte an mehreren unabhängigen, stabilen mit hEAG1 transfizierten SH-SY5Y Zellklonen gezeigt werden, dass EAG in diesem Zellsystem wirklich ein onkogenes Potential besitzt.

Allerdings soll man sich bewusst sein, dass eine lineare Korrelation zwischen EAG und der Zellproliferation nicht nachweisbar war. Es konnte durch Dr. Kristina Schönherr (MZB, Prof. Heinemann, Jena, Deutschland) gezeigt werden, dass mittels RT-PCR nur in einer von drei S-Typ Zelllinien, die durch eine höhere Proliferationsrate als N-Typ Zellen (Voigt et al. 2000) gekennzeichnet sind, ein Signal für mRNA von EAG nachgewiesen werden konnte, während in allen drei neuronalen Typen mittels RT-PCR dieser Kanal detektiert wurde. In den elektrophysiologischen Experimenten konnten nur in N-Typ Zellen EAG-Ströme gemessen werden.

## 6.2.2 Einfluss von EAG auf die Zelldifferenzierung

Warum hat das Onkogen EAG nur einen Einfluss auf die Zellproliferation und kann nicht die Zelldifferenzierung beeinflussen?

Man muss beachten, dass die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge sind. Giannini et al. (1997) konnten zeigen, dass unter Zugabe von Retinat zwei wichtige Proteine reguliert werden, die unabhängig voneinander die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung beeinflussen können. Während die Erhöhung des *Neutrophin* Rezeptors TrkB eine wichtige Rolle für die neuronale Differenzierung spielt, ist die Herunterregulation des Onkogens *N-myc* relevant für eine Herabsetzung der Proliferation in Neuroblastomzellen. Um genauer eine Aussage über EAG und die beiden Vorgänge Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu machen, müsste man die Auswirkung von EAG auf diese beiden Proteine näher untersuchen. Dass die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung über unterschiedliche Mechanismen gesteuert werden können, ist auch in anderen Arbeiten zu finden. Zum Beispiel wurde von Lopez et al. (2002) die Notwendigkeit der PI3-Kinase für die Retinat-induzierte Differenzierung in Neuroblastomzellen beschrieben, während die PI3-Kinase ebenfalls in der Lage ist, die Proliferation in diesen Zellen über eine Erhöhung des epidermalen Wachstumsfaktor (engl. *epidermal growth factor* (EGF)) zu erhöhen (Ho et al. 2005). Allerdings versucht man, durch Zugabe von Retinat in der Klinik bei der Behandlung von Neuroblastomen neben der Verminderung der Proliferationsrate auch eine Differenzierung zu erreichen. Die mögliche Idee ist darin zu suchen, dass durch eine Differenzierung die Zellen eventuell in eine G0-Phase übergehen, in der sie dauerhaft bleiben und sich somit nicht mehr teilen können.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in Neuroblastomzellen die Differenzierung unter Retinatzugabe eingeleitet werden konnte (Voigt et al. 2000). Mit den Experimenten dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, da in den Wildtypkontrollen unter Retinat eine Zelldifferenzierung eingeleitet wurde. Interessanterweise waren keine Unterschiede zwischen den Wildtypzellen und den mit hEAG1 transfizierten Zellen unter Retinatzugabe festzustellen. Beide, sowohl die mit hEAG transfizierten Klone als auch die Wildtypkontrolle, zeigten eine vermehrte neuronenhähnliche Differenzierung unter Retinat, da die Länge der Zellfortsätze deutlich zunahm (Lopez-Carballo et al. 2002) und die Natriumströme sich in den Zellen erhöhten (Toselli et al. 1996). Interessanterweise war bei zwei mit hEAG1 transfizierten Zellklonen die Zunahme der Dendriten- und Neuritenlängen höher als bei der Kontrolle. Beide Zellklone besaßen jedoch nur relativ geringe Natriumströme und kürzere Zellfortsätze, so dass man davon ausgehen kann, dass sich beide in einem weniger differenzierten Stadium befanden.

Korrelierend zu diesen Ergebnissen ist auch der Befund, dass wenig differenzierte Zellen, die nahezu ohne Wachstumsfaktoren kultiviert worden sind, ungefähr soviel EAG-Strom besaßen wie normal differenzierte Zellen. Auch konnte gezeigt werden, dass der EAG-Strom mit zunehmender Kultivierungszeit der Zellen nur wenig abnahm, während diese Zellen deutlich morphologisch differenzierten. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass EAG keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung in Neuroblastomzellen hat.

Zellen, die nahezu ohne Wachstumsfaktoren kultiviert werden, zeigen nur wenige Zellfortsätze und können unter Zugabe von Retinaten differenzieren (Giannini et al. 1997). Diese Ergebnisse konnten hier experimentell bestätigt werden, da unter Retinatzugabe die SH-SY5Y Zellen, die in einem Medium mit Zusatz von Wachstumsfaktor-freiem Serum kultiviert worden sind, deutlich differenzierten.

Zusammenfassend kann man erkennen, dass EAG ein onkogenes Potential in Neuroblastomzellen hat und die Proliferation sich durch das eingebrachte hEAG1-Gen erhöhte während die Zelldifferenzierung keinen Effekt zeigte.

Aber welche Auswirkungen hat dieser Strom auf das Membranpotential der Zellen? Tumorzellen besitzen deutlich positivere Ruhemembranpotentiale als gesunde Zellen abstammend vom selben histologischen Ursprung (Binggeli und Weinstein 1986). Es konnte gezeigt werden, dass sich das Membranpotential in den mit hEAG1 transfizierten Zellen gering, aber signifikant, erhöhte. Allerdings hätte man auch eine Erniedrigung des Membranpotentials erwarten können, da sich dieses durch die zusätzlich eingebrachten Kaliumkanäle verringern müsste. Es konnte aber gezeigt werden, dass EAG-Kanäle erst bei Potentialen ab 0 mV öffnen und somit im Bereich der Ruhemembranpotentiale noch

geschlossen sein sollten. Jedoch kann man eine Öffnung von einem geringen Teil von EAG-Kanälen bei anliegendem Ruhemembranpotential nicht ausschließen, da geringe EAG-Ströme, die das Ruhemembranpotential verändern können, mit den Messprotokollen in den Experimenten dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten. Bijlenga et al. (1998) hatten gezeigt, dass durch eine vermehrte Expression von hEAG in Myoblasten eine Hyperpolarisierung des Ruhemembranpotentials von -9 mV auf -50 mV erreicht werden konnte.

Auch die Zunahme des verzögerten Gleichrichterstroms kann man nicht als Ursache für die Veränderung des Membranpotentials betrachten, da dieser ebenfalls geschlossen ist, wenn das Ruhemembranpotential anliegt (Meyer und Heinemann 1998). Also müsste man die Veränderung anderer Kaliumströme wie einwärtsgerichtete Kaliumkanäle oder eine Veränderung von Chloridströmen, die ebenfalls die Höhe des Membranpotentials beeinflussen, annehmen.

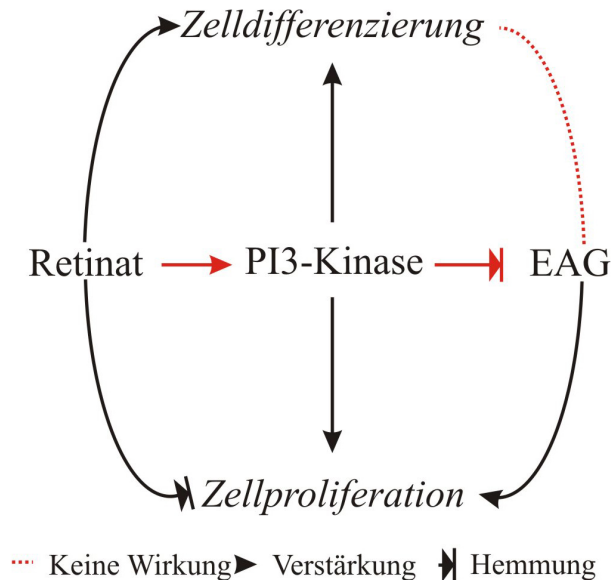
Falls die These stimmt, dass mitotisch aktive Zellen ein höheres Ruhepotential haben als differenzierte Zellen, dann müsste unter Retinatzugabe das Membranpotential negativer werden. In den Experimenten konnte man diese Beobachtung machen, jedoch waren auch hier nur kleine Unterschiede festzustellen.

### **6.3 Zusammenhang zwischen EAG, Retinat, PI3-Kinasen, Zelldifferenzierung und Proliferation**

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten dargestellt wurde, können Retinate sowohl die Zellproliferation als auch die Zelldifferenzierung in Neuroblastomen beeinflussen (Voigt et al. 2000). Ebenso hat die PI3-Kinase einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Lopez-Carballo et al. 2002, Pan et al. 2005). Neuere Befunde weisen auch auf eine Funktion der PI3-Kinase in der Zellproliferation hin (Ho et al. 2005). In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass EAG die Zellproliferation in Neuroblastomen regulieren kann, während dieser Kanal keinen Einfluss auf die Differenzierung zeigt.

Aber gibt es Zusammenhänge zwischen EAG, Retinaten und der PI3-Kinase in der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, oder entfalten sie unabhängig voneinander ihre Wirkung? Dr. Michael Grün (MZ, Prof. Wetzker, Jena, Deutschland) konnte eindeutig die Zunahme der mRNA der PI3-Kinase nach Stimulation mittels Retinat feststellen und somit Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Lopez-Carballo et al. (2002) unterstützen, die eine Aktivitätszunahme der PI3-Kinase unter Retinatstimulation beobachteten.

Es lässt sich somit die Hypothese aufstellen, dass durch Retinate eine Verminderung der PI3-Kinase Aktivität erreicht werden kann, die zu einer Reduktion des Onkogens EAG führt, wodurch die Zellproliferation verlangsamt wird.



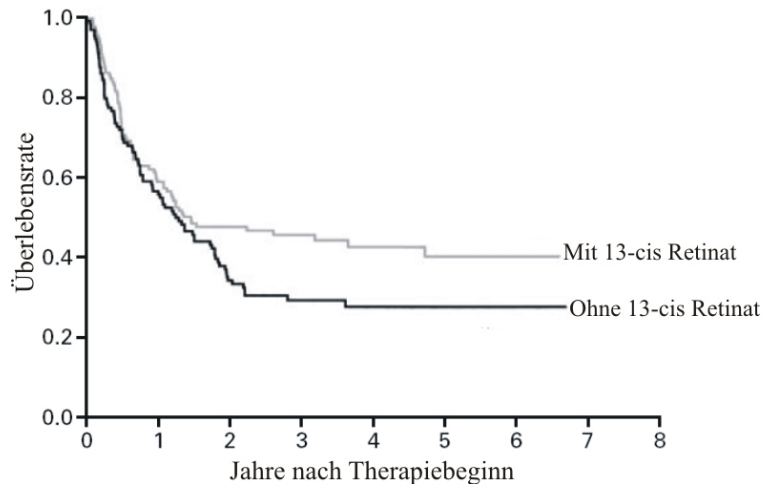
**Abbildung 6.2:** Zusammenhänge zwischen Retinaten, PI3-Kinasen und EAG in der Beeinflussung der Zellproliferation

Bisher wusste man, dass Retinate, EAG-Kanäle und die PI3-Kinasen die beiden voneinander unabhängigen Vorgänge Zellproliferation und Zelldifferenzierung beeinflussen (schwarze Pfeile). Durch die Experimente dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen EAG-Kanälen, Retinat und den PI3-Kinasen näher beschrieben werden (rote Pfeile).

## 6.4 Aktueller therapeutischer Einsatz von Retinaten

Retinate werden aktuell adjuvant bei der Therapie von Neuroblastomen nach konventionellen therapeutischen Maßnahmen wie Operationen oder zytotoxische Chemotherapien eingesetzt, und es können sehr gute Ergebnisse erzielt werden (Reynolds et al. 2003, Matthay et al. 1999).

Das Grundanliegen dieser Arbeit war die übergeordnete Frage, ob sich die erwünschten Effekte in der Klinik bei der Behandlung von Neuroblastomen mit Retinaten auf die Wirkung von Retinat auf den EAG-Kanal zurückführen lassen. Es konnte gezeigt



**Abbildung 6.3:** *Klinische Studie der Retinatbehandlung*

Es wurde eine Patientengruppe mit einem Neuroblastom, die anschließend der konventionellen Therapie mit Retinat über einen Zeitraum von 6 Monaten behandelt wurde mit der einer Kontrollgruppe ohne Retinatbehandlung verglichen. Der Umfang der Patientenkollektive betrug je 130 Patienten (Matthay et al. 1999).

werden, dass durch Retinate der EAG-Kanal reguliert werden kann und gleichzeitig ein Zusammenhang zwischen den EAG-Kanälen und der Proliferation besteht. Es ist also vorstellbar, dass der proliferationshemmende Effekt von Retinaten auf den EAG-Kanal einen wichtigen Anteil an den in der Klinik gewünschten Effekten hat.

Fraglich ist jedoch, ob tatsächlich eine Regulation von EAG *in vivo* eine Rolle spielt. Es konnte dargestellt werden, dass EAG-Kanäle bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  Retinat (13-cis oder all-trans) im Nährmedium der Zellen reduziert worden sind. Aber ist es überhaupt realistisch, dass solche hohen Konzentration an den Zielzellen des Patienten erreicht werden können, oder hat Retinat bei dieser Serumkonzentration bereits toxische Effekte?

Es konnte von Villablanca et al. (1995) demonstriert werden, dass die maximal tolerierbare Dosis von 13-cis-Retinat, die täglich oral verabreicht wird,  $160\text{ mg pro m}^2$  Körperoberfläche betragen kann. Nach 14 Tagen Behandlung lag ein Serumspiegel von  $4\pm 2,8\ \mu\text{M}$  13-cis-Retinat vor. Erst ab einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  13-cis-Retinat im Serum traten bei den meisten der 2- bis 12-jährigen Patienten gravierende Nebenwirkungen wie Hyperkalzämie, Hautausschläge, Übelkeit und Thrombozytopenie auf, die jedoch nach Beendigung der Retinatbehandlung reversibel waren. Da die 13-cis-Retinat in einer Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  bereits den EAG-Strom vollständig reduzieren kann, ist anzunehmen, dass eine Reduktion von EAG *in vivo* durch Retinat stattfindet. Aller-



dings muss man beachten, dass nicht zwangsläufig der Serumspiegel von Retinat am Tumor anliegen muss, da dies von der Gefäßversorgung des Tumors abhängig ist.

Dass die PI3-Kinase ebenfalls den EAG-Kanal regulieren kann, lässt für die Zukunft neue Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen vermuten. Man kann sich vorstellen, dass durch Substanzen, die die PI3-Kinase induzieren, EAG herunterreguliert werden kann, was zu einer Hemmung der Proliferation führt. Allerdings müssen zunächst die Zwischenschritte, über die die PI3-Kinase die Kanäle blockiert, untersucht werden, um exaktere Ansatzpunkte herauszufinden, da verschiedenste Zellfunktionen über PI3-Kinasen reguliert werden und somit eine Induktion der PI3-Kinase tief greifende pathophysiologische Veränderungen mit sich führen kann.

## 7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Wie in der Diskussion dargestellt, wird postuliert, dass der EAG-Kanal ein onkogenes Potential besitzt (Pardo et al. 1999). Diese Hypothese konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, da mit hEAG1 transfizierte Zellklone der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y eine deutliche Steigerung der Proliferation zeigten.

Außerdem ist es gelungen, an verschiedenen Neuroblastomzelllinien zu zeigen, dass der EAG-Strom durch Retinate reduziert werden kann, wodurch frühere Ergebnisse bestätigt werden konnten (Meyer und Heinemann 1998). Da Retinate therapeutisch in der Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt werden (Matthay et al. 1999, Reynolds et al. 2003), ist denkbar, dass die Reduktion von EAG für die in der Klinik gewünschten Effekte von Retinaten verantwortlich ist.

Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, Regulationsmöglichkeiten für diesen Kanal zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EAG mittels Transkriptionskontrolle durch Retinat reguliert werden kann und dass die PI3-Kinasen wichtige Funktionen in der Beeinflussung des EAG-Kanals besitzen.

Diese neuen Erkenntnisse können als Ansatzpunkte für die Erforschung weiterer Therapiemöglichkeiten von Neuroblastomen genutzt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdul M, Santo A, Hoosein N. 2003. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res*, 23:3347–51.
- Aboulafia DM, Norris D, Henry D, Grossman RJ, Thommes J, Bundow D, Yocum RC, Stevens V. 2003. 9-cis-retinoic acid capsules in the treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Arch Dermatol*, 139.
- Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. 2005. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncol*, 6:712–20.
- Altucci L, Gronemeyer H. 2001. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer*, 1:181–93.
- Arcangeli A, Rosati B, Cherubini A, Crociani O, Fontana L, Ziller C, Wanke E, Olivotto M. 1997. HERG- and IRK-like inward rectifier currents are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives. *Eur J Neurosci*, 9:2596–604.
- Arcangeli A, Rosati B, Crociani O, Cherubini A, Fontana L, Passani B, Wanke E, Olivotto M. 1999. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. *J Neurobiol*, 40:214–25.
- Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV, Redfern CP, Pearson AD, Veal GJ. 2005. Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer*, 92:696–704.

- Bijlenga P, Occhiodoro T, Liu JH, Bader CR, Bernheim L, Fischer-Lougheed J. 1998. An ether -a-go-go K<sup>+</sup> current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J Physiol*, 512 ( Pt 2):317–23.
- Binggeli R, Cameron IL. 1980. Cellular potentials of normal and cancerous fibroblasts and hepatocytes. *Cancer Res*, 40:1830–5.
- Binggeli R, Weinstein RC. 1986. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol*, 123:377–401.
- Boehm N, Samama B, Cribier B, Rochette-Egly C. 2004. Retinoic-acid receptor beta expression in melanocytes. *Eur J Dermatol*, 14:19–23.
- Brodeur GM. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3:203–16.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. 1995. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, 80:795–803.
- Deutsch C. 2002. Potassium channel ontogeny. *Annu Rev Physiol*, 64:19–46.
- El-Kholy W, Macdonald PE, Lin JH, Wang J, Fox JM, Light PE, Wang Q, Tsushima RG, Wheeler MB. 2003. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 potently blocks K(V) currents via a direct mechanism. *Faseb J*, 17:720–2.
- Fenaux P, Chomienne C, Degos L. 2001. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*, 38:13–25.
- Fieber LA, Gonzalez DM, Wallace MR, Muir D. 2003. Delayed rectifier K currents in NF1 Schwann cells. Pharmacological block inhibits proliferation. *Neurobiol Dis*, 13:136–46.
- Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci*, 116:3037–40.
- Friederich P, Dilger JP, Isbrandt D, Sauter K, Pongs O, Urban BW. 2003. Biophysical properties of Kv3.1 channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Receptors Channels*, 9:387–96.

- Frings S, Brull N, Dzeja C, Angele A, Hagen V, Kaupp UB, Baumann A. 1998. Characterization of ether-a-go-go channels present in photoreceptors reveals similarity to IKx, a K<sup>+</sup> current in rod inner segments. *J Gen Physiol*, 111:583–99.
- Fry MJ. 1994. Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1226.
- Fry MJ. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res*, 3.
- Ganetzky B, Robertson GA, Wilson GF, Trudeau MC, Titus SA. 1999. The eag family of K<sup>+</sup> channels in *Drosophila* and mammals. *Ann N Y Acad Sci*, 868.
- Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstuck T, Wohlrab W, Heinemann SH. 2002. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol*, 188:137–49.
- Giannini G, Dawson MI, Zhang X, Thiele CJ. 1997. Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 272:26693–701.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391:85–100.
- Heinemann S. 1995. Guide to data acquisition and analysis. *Single Channel Recording* E Neher and B Sackmann.
- Hille B. 1986. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect*, 82:47–69.
- Ho R, Minturn JE, Hishiki T, Zhao H, Wang Q, Cnaan A, Maris J, Evans AE, Brodeur GM. 2005. Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 65:9868–75.
- Jeng CJ, Chang CC, Tang CY. 2005. Differential localization of rat Eag1 and Eag2 K<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons. *Neuroreport*, 16:229–33.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 82:503–68.

- Ju M, Wray D. 2002. Molecular identification and characterisation of the human eag2 potassium channel. *FEBS Lett*, 524:204–10.
- Jurman ME, Boland LM, Liu Y, Yellen G. 1994. Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques*, 17:876–81.
- Kelly WK, Osman I, Reuter VE, Curley T, Heston WD, Nanus DM, Scher HI. 2000. The development of biologic end points in patients treated with differentiation agents: an experience of retinoids in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6:838–46.
- Klinke R, Silbernagel S. 1996. *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Verlag.
- Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE, Peck GL. 1988. Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *N Engl J Med*, 318:1633–7.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupe V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. 1998. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science*, 279:863–7.
- Kunzelmann K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, 205:159–73.
- Lang F, Friedrich F, Kahn E, Woll E, Hammerer M, Waldegger S, Maly K, Grunicke H. 1991. Bradykinin-induced oscillations of cell membrane potential in cells expressing the Ha-ras oncogene. *J Biol Chem*, 266:4938–42.
- Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY. 1996. Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron*, 16:387–97.
- Lee YS, Sayeed MM, Wurster RD. 1994. Inhibition of cell growth and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in human brain tumor cells by Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. *Mol Chem Neuropathol*, 22:81–95.
- Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X, Lefebvre B. 2005. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm*, 70:199–264.
- Lepple-Wienhues A, Berweck S, Bohmig M, Leo CP, Meyling B, Garbe C, Wiederholt M. 1996. K<sup>+</sup> channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membr Biol*, 151:149–57.

- Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ. 2000. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 25:411–23.
- Lippman SM, Lee JJ, Karp DD, Vokes EE, Benner SE, Goodman GE, Khuri FR, Marks R, Winn RJ, Fry W, Graziano SL, Gandara DR, Okawara G, Woodhouse CL, Williams B, Perez C, Kim HW, Lotan R, Roth JA, Hong WK. 2001. Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93:605–18.
- Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Baretino D. 2002. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277:25297–304.
- Ludwig J, Terlau H, Wunder F, Bruggemann A, Pardo LA, Marquardt A, Stuhmer W, Pongs O. 1994. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated either a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart. *Embo J*, 13:4451–8.
- Marino AA, Morris DM, Schwalke MA, Iliev IG, Rogers S. 1994. Electrical potential measurements in human breast cancer and benign lesions. *Tumour Biol*, 15:147–52.
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. 1999. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med*, 341:1165–73.
- Meyer R, Heinemann SH. 1998. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol*, 508 ( Pt 1):49–56.
- Meyskens J F L, Surwit E, Moon TE, Childers JM, Davis JR, Dorr RT, Johnson CS, Alberts DS. 1994. Enhancement of regression of cervical intraepithelial neoplasia II (moderate dysplasia) with topically applied all-trans-retinoic acid: a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 86:539–43.
- Miller C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*, 1.

- Miller J W H, Reyno LM, Loewen GR, Huan S, Winquist E, Moore M, Cato r A, Jaunakais D, Truglia JA, Matthews S, Dancey J, Eisenhauer E. 2000. A phase I-II study of 9-cis retinoic acid and interferon-alpha2b in patients with advanced renal-cell carcinoma: an NCIC Clinical Trials Group study. *Ann Oncol*, 11:1387–9.
- Mitsuyasu RT. 2000. AIDS-related Kaposi's sarcoma: current treatment options, future trends. *Oncology (Williston Park)*, 14:867–78; discussion 878, 881–3, 887–.
- Moczydlowski E. 1998. Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium-channel proteins. *Chem Biol*, 5:R291–301.
- Naeem M, Harrison K, Barton K, Nand S, Alkan S. 2006. A unique case of acute promyelocytic leukemia showing monocytic differentiation after ATRA (all-trans retinoic acid) therapy. *Eur J Haematol*, 76:164–6.
- Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. 1978. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*, 375:219–28.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet*, 21:444–8.
- Niu XW, Peng ZH, Feng J, Ma HQ, Liu C, Yuan JY. 2005. Mechanism of retinoid receptors in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human melanoma cell line A375. *Chin Med J (Engl)*, 118:1482–6.
- Norata GD, Ongari M, Uboldi P, Pellegatta F, Catapano AL. 2005. Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells. *Int J Mol Med*, 16:717–22.
- Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader CR, Fischer-Lougheed J. 1998. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett*, 434:177–82.
- O'Grady SM, Lee SY. 2005. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37:1578–94.
- Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, Prabhakar NR. 2000. HERG-Like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol*, 83:1150–7.



- Pan J, Kao YL, Joshi S, Jeetendran S, Dipette D, Singh US. 2005. Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, 93:571–83.
- Pancrazio JJ, Viglione MP, Kleiman RJ, Kim YI. 1991. Verapamil-induced blockade of voltage-activated K<sup>+</sup> current in small-cell lung cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 257:184–91.
- Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W. 1999. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *Embo J*, 18:5540–7.
- Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stuhmer W. 2005. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol*, 205:115–24.
- Pasqualetti M, Rijli FM. 2001. Vitamin A prevents inner ear defects in mice with congenital homeobox gene deficiency. *ScientificWorldJournal*, 1:916–8.
- Patt S, Preussat K, Beetz C, Kraft R, Schrey M, Kalff R, Schönherr K, Heinemann SH. 2004. Expression of ether a go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett*, 368:249–53.
- Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, Khorasanizadeh S. 2000. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *Embo J*, 19:1045–54.
- Redmann K, Muller V, Tanneberger S, Kalkoff W. 1972. The membrane potential of primary ovarian tumor cells in vitro and its dependence on the cell cycle. *Acta Biol Med Ger*, 28:853–6.
- Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ. 2003. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett*, 197:185–92.
- Rouzaire-Dubois B, Dubois JM. 1990. Tamoxifen blocks both proliferation and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels of neuroblastoma cells. *Cell Signal*, 2:387–93.
- Rouzaire-Dubois B, Dubois JM. 1998. K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol*, 510 ( Pt 1):93–102.

- Rouzair-Dubois B, Gerard V, Dubois JM. 1993. Involvement of K<sup>+</sup> channels in the quercetin-induced inhibition of neuroblastoma cell growth. *Pflugers Arch*, 423:202–5.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M, Gallinger S, Khokha R, Mak TW, Hawkins PT, Stephens L, Scherer SW, Tsao M, Penninger JM. 2000. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature*, 406:897–902.
- Schafer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR. 1999. The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *J Physiol*, 518 ( Pt 2):401–16.
- Schönherr R, Lober K, Heinemann SH. 2000. Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Embo J*, 19:3263–71.
- Schrader AJ, von Knobloch R, Heidenreich A, Buer J, Hofmann R. 2004. Application of retinoids in the treatment of renal cell carcinoma—a futile effort? *Anticancer Drugs*, 15:819–24.
- Sidell N. 1982. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 68:589–96.
- Srivastava S, Li Z, Lin L, Liu G, Ko K, Coetzee WA, Skolnik EY. 2005. The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCa3.1. *Mol Cell Biol*, 25:3630–8.
- Stansfeld CE, Roper J, Ludwig J, Weseloh RM, Marsh SJ, Brown DA, Pongs O. 1996. Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:9910–4.
- Tajima N, Schönherr K, Niedling S, Kaatz M, Kanno H, Schönherr R, Heinemann SH. 2006. Calcium-activated potassium channels in human melanoma cells are upregulated by hypoxia involving HIF-1alpha and VHL. *J Physiol*, 571(Pt 2):349–59.
- Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Stuhmer W, Heinemann SH. 1996. Extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch*, 432:301–12.

- Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. 1985. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, 313:404–6.
- Toselli M, Tosetti P, Taglietti V. 1996. Functional changes in sodium conductances in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *J Neurophysiol*, 76:3920–7.
- Tosetti P, Taglietti V, Toselli M. 1998. Functional changes in potassium conductances of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *J Neurophysiol*, 79:648–58.
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. 1995. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science*, 269:92–5.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, Perlmann T. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*, 290:2140–4.
- Villablanca JG, Khan AA, Avramis VI, Seeger RC, Matthay KK, Ramsay NK, Reynolds CP. 1995. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 13:894–901.
- Voigt A, Hartmann P, Zintl F. 2000. Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. *Cell Adhes Commun*, 7:423–40.
- Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B, Nattel S, Wang Z. 2002. HERG K<sup>+</sup> channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*, 62:4843–8.
- Wang Z. 2004. Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch*, 448:274–86.
- Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. 1991. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, 252:1560–2.
- Warmke JW, Ganetzky B. 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:3438–42.

- Wonderlin WF, Strobl JS. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, 154:91–107.
- Yang N, George J A L, Horn R. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16:113–22.
- Yao X, Kwan HY. 1999. Activity of voltage-gated K<sup>+</sup> channels is associated with cell proliferation and Ca<sup>2+</sup> influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci*, 65:55–62.
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419:35–42.
- Zhang C, Duvic M. 2003. Retinoids: therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther*, 16:322–30.
- Zhou Q, Kwan HY, Chan HC, Jiang JL, Tam SC, Yao X. 2003. Blockage of voltage-gated K<sup>+</sup> channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells. *Int J Mol Med*, 11:261–6.

# 9 Anhang

## 9.1 Danksagung

Abschließend möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan H. Heinemann bedanken für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der benötigten Arbeitsplätze.

Nicht weniger Dank gilt Herrn PD Dr. Roland Schönherr und Frau Dr. Kristina Schönherr für die großzügige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten sowie für ihre Diskussionsbereitschaft. Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. Guido Gessner, der mir die *Whole-cell-clamp* Technik erlernte und mir Hilfestellung bei der Auswertung gab.

Desweiteren möchte ich mich bei Christian König und Dr. Michael Grün aus der Nachbararbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit bedanken. Nicht zu vergessen sind Susanna Niedling, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit sehr behilflich war und Stefan Brodoehl, der mir sehr viele Tips bei der Textverarbeitung *Latex* geben konnte.

Für ihre hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Angela Roßner und Steffi Arend bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Melanie und meiner Familie, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

## 9.2 Lebenslauf

---

*Norbert Meyer*

---

09.11.1979	geboren in Karl-Marx-Stadt
9/1986 - 8/1993	Friedrich-Ebert-Grundschule in Mohsdorf
9/1993 - 8/1998	Gymnasium in Burgstädt, Erreichen der Hochschulreife
9/1998 - 10/1999	Zivildienst im Pflegeheim „Seniorenheim am Taurastein“ in Mittweida
10/1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/2001	Physikum
10/2003	Erstes Staatsexamen
5/2003	Beginn Dissertationsarbeit am Institut für Molekulare Biophysik (Jena, Prof. S.H. Heinemann)
9/2004	Zweites Staatsexamen
10/2004 - 10/2005	Praktisches Jahr
11/2005	Abschluss des Medizinstudiums und Erlangen der ärztlichen Approbation
3/2006	Anstellung als Assistenzarzt (Fachgebiet Innere Medizin)

## 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Stefan Heinemann und PD Dr. Roland Schönherr
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 5. Dezember 2006

Norbert Meyer, Verfasser