Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar


Ca²⁺-Clearance-Mechanismen in epithelialen und stromalen Prostata-Zelllinien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Anne Wolf, geb. Schehl geboren am 08.09.1984 in Zweibrücken



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Anmerkung zu Anglizismen	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Prostata – Anatomie und Funktion	5
2.2 Prostata – Pathologien	9
2.2.1 Prostatakarzinom	9
2.2.2 Benigne Prostatahyperplasie	12
2.2.3 Zelllinien der Prostata	14
2.3 Ca ²⁺ in Zellphysiologie und -pathologie	15
2.4 Ca ²⁺ -Kanäle und Prostatakarzinom	17
2.5 Ca ²⁺ -Clearance	18
2.5.1 Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase	19
2.5.2 Sarko-endoplasmatische-Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase	22
2.5.3 Mitochondrialer Uniporter	25
2.5.4 Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher	26
2.5.5 Ca ²⁺ -Clearance in unterschiedlichen Zellarten	28
2.6 Zielsetzung	29
3 Material und Methoden	32
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	32
3.1.1 Histamin	33
3.1.2 Inhibitoren	34
3.2 Geräte	36
3.3 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien	37
3.4 Primer	42
3.5 Software	45

3.6 Zellkultur	45
3.6.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen	45
3.6.2 Passagieren von Monolayerkulturen	46
3.6.3 Androgen-Stimulation der Zellen	47
3.7 Fluoreszenzphotometrische Messung der [Ca ²⁺] _i	47
3.7.1 Eigenschaften des Kalziumindikators FURA-2-AM	48
3.7.2 Beladung der Zellen und Versuchsaufbau	49
3.7.3 Kalibrierung	50
3.8 Molekularbiologische Untersuchung der Kalziumpumpen	51
3.8.1 Humane Gewebe-Entnahme	51
3.8.2 RNA-Aufreinigung	52
3.8.3 Konzentrationsbestimmung der RNA	53
3.8.4 Reverse Transkription	54
3.8.5 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktionen	56
3.8.6 Agarosegel-Elektrophorese	59
3.8.7 Quantitative Real-Time-PCR	60
3.8.8 Fluoreszenz-Zytochemie	63
3.9 Berechnung der [Ca ²⁺] _i -Clearance und Statistische Auswertung	64
4 Ergebnisse	66
4.1 PC3-Zellen - Einzelinhibition	66
4.1.1 Kontroll-Stimulation an PC3-Zellen	66
4.1.2 PMCA-Inhibition an PC3-Zellen	68
4.1.3 SERCA-Inhibition an PC3-Zellen	71
4.1.4 MCU-Inhibition an PC3-Zellen	74
4.1.5 NCX-Inhibition an PC3-Zellen	76
4.2 PC3-Zellen – Kombinierte Inhibition	78
4.2.1 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und MCU	78
4.2.2 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und PMCA	80
4.2.3 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – PMCA und MCU	82
4.2.4 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA, PMCA und MCU	84
4.3 PC3-Zellen – Inhibition nach Androgen-Stimulation	85
4.3.1 PMCA-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation	85

	4.3.2 SERCA-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation	87
	4.3.3 MCU-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation	90
4	.4 PC3-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung	92
4	.5 DU 145-Zellen - Einzelinhibition	93
	4.5.1 Kontroll-Stimulation an DU 145-Zellen	93
	4.5.2 PMCA-Inhibition an DU 145-Zellen	95
	4.5.3 SERCA-Inhibition an DU 145-Zellen	97
	4.5.4 MCU-Inhibition an DU 145-Zellen	. 100
	4.5.5 NCX-Inhibition an DU 145-Zellen	. 102
4	.6 DU 145-Zellen - Kombinierte Inhibition	. 104
	4.6.1 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA und MCU	. 104
	4.6.2 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA und PMCA	. 106
	4.6.3 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – PMCA und MCU	. 108
	4.6.4 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA, PMCA und MCU	. 110
4	.7 DU 145-Zellen – Inhibition nach Androgen-Stimulation	. 111
	4.7.1 PMCA-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation	. 111
	4.7.2 SERCA-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation	. 114
	4.7.3 MCU-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation	. 116
4	.8 DU 145-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung	. 119
4	.9 P21-Zellen – Einzelinhibition	. 120
	4.9.1 Kontroll-Stimulation an P21-Zellen	. 120
	4.9.2 PMCA-Inhibition an P21-Zellen	. 122
	4.9.3 SERCA-Inhibition an P21-Zellen	. 124
	4.9.4 MCU-Inhibition an P21-Zellen	. 126
	4.9.5 NCX-Inhibition an P21-Zellen	. 128
4	.10 P21-Zellen – Kombinierte Inhibition	. 130
	4.10.1 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA und MCU	. 130
	4.10.2 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA und PMCA	. 132
	4.10.3 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – PMCA und MCU	. 134
	4.10.4 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA, PMCA und MCU	. 135
4	.11 P21-Zellen – Inhibition nach Androgen-Stimulation	. 136
	4.11.1 PMCA-Inhibition an P21-Zellen nach Androgen-Stimulation	. 136

4.11.2 SERCA-Inhibition an P21-Zellen nach Androgen-Stimulation	139
4.12 P21-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung	142
4.13 LNCaP-Zellen – Einzelinhibition	143
4.14 Qualitative PCR (cDNA): Nachweis der Ca ²⁺ -Transporter-Isoformen	144
4.14.1 PMCA-Isoformen	144
4.14.2 SERCA-Isoformen	147
4.14.2 NCX-Isoformen	149
4.15 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	151
4.16 Fluoreszenzmarkierung der SERCA	156
5 Diskussion	157
6 Literaturverzeichnis	169
7 Publikationen/Danksagung	181
8 Lebenslauf	182

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prostata in situ - Medianschnitt
Abbildung 2: Zonengliederung der humanen Prostata 7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Ca ²⁺ -Transporter
Abbildung 4: Membran-Topologie der PMCA20
Abbildung 5: Membran-Topologie der SERCA
Abbildung 6: Membran-Topologie des MCU25
Abbildung 7: Membran-Topologie des NCX
Abbildung 8: Schematische Darstellung der vier Ca ²⁺ -Pumpen mit Inhibitoren 35
Abbildung 9: Exzitationsspektrum von FURA-249
Abbildung 10: FURA-Messung: Kontroll-Stimulation von PC3-Zellen mit 20 μM
Histamin 67
Abbildung 11: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an PC3-Zellen70
Abbildung 12: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an PC3-Zellen 73
Abbildung 13: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μM CCCP) an PC3-Zellen 75
Abbildung 14: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCl-Puffer) an PC3-Zellen
Abbildung 15: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und MCU. 79
Abbildung 16: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und PMCA.
Abbildung 17: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – PMCA und MCU.
Abbildung 18: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA, PMCA und MCU

Abbildung 19: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an PC3-Zellen - Kontrolle
(chFKS) versus 100 nM Androstan
Abbildung 20: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an PC3-Zellen -
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan
Abbildung 21: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μM CCCP) an PC3-Zellen -
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan
Abbildung 22 : FURA-Messung: Kontroll-Stimulation von DU 145-Zellen mit 10 μM
Histamin94
Abbildung 23: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an DU 145-Zellen 96
Abbildung 24: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an DU 145-Zellen 98
Abbildung 25: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an DU 145-Zellen 99
Abbildung 26: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μM CCCP) an DU 145-Zellen 101
Abbildung 27: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCl-Puffer) an DU 145-Zellen 103
Abbildung 28: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA
und MCU
Abbildung 29: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA
und PMCA
Abbildung 30: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – PMCA
und MCU
Abbildung 31: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA,
PMCA und MCU
Abbildung 32: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an DU 145-Zellen -
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan
Abbildung 33: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an DU 145-Zellen -
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan
Abbildung 34: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an DU 145-Zellen -
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan

Abbildung 35: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μM CCCP) an DU 145-Zellen -	
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan	. 117
Abbildung 36: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an DU 145-Zellen -	
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.	. 118
Abbildung 37: FURA-Messung: Kontroll-Stimulation von P21-Zellen mit 10 μM	
Histamin.	. 121
Abbildung 38: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an P21-Zellen	. 123
Abbildung 39: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an P21-Zellen	. 125
Abbildung 40: FURA-Messung: MCU-Inhibition 2 μM CCCP) an P21-Zellen	. 127
Abbildung 41: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCl-Puffer) an P21-Zellen	. 129
Abbildung 42: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA	und
MCU	. 131
Abbildung 43: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA	und
PMCA	. 133
Abbildung 44: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – PMCA	und
MCU	. 134
Abbildung 45: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA	,
PMCA und MCU.	. 135
Abbildung 46: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an P21-Zellen - Kontrol	lle
(chFKS) versus 100 nM Androstan	. 138
Abbildung 47: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μM CPA) an P21-Zellen -	
Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan	. 141
Abbildung 48: Expression von PMCA1 in PC3, DU 145, LNCaP und P21	. 145
Abbildung 49: Expression von PMCA2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21	. 145
Abbildung 50: Expression von PMCA3 in PC3, DU 145, LNCaP und P21	. 146
Abbildung 51: Expression von PMCA4 in PC3, DU 145, LNCaP und P21	. 146
Abbildung 52: Expression von SERCA1 in PC3. DU 145. LNCaP und P21	. 147

Abbildung 53: Expression von SERCA2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 148
Abbildung 54: Expression von SERC31 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 148
Abbildung 55: Expression von NCX1 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 149
Abbildung 56: Expression von NCX2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 150
Abbildung 57: Expression von NCX3 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 150
Abbildung 58: qRT-PCR-Analyse mit PMCA1-Assay an Androgen stimulierten und
deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen
Abbildung 59: qRT-PCR-Analyse mit SERCA2-Assay an Androgen stimulierten und
deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen
Abbildung 60: qRT-PCR-Analyse mit SERCA3-Assay an Androgen stimulierten und
deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen 154
Abbildung 61: Fluoreszenzmarkierung der SERCA

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Template-Primer-Mix für Reverse Transkription	54
Tabelle 2: Master-Mix für Reverse Transkription	55
Tabelle 3: Reverse Transkription	55
Tabelle 4: Master-Mix für PCR Ansatz für eine Reaktion	57
Tabelle 5: PMCA 1,2,4-PCR-Programm	58
Tabelle 6: PMCA3-PCR-Programm	58
Tabelle 7: SERCA2-PCR-Programm	58
Tabelle 8: SERCA3-PCR-Programm	58
Tabelle 9: NCX1-PCR-Programm	58
Tabelle 10: NCX2-PCR-Programm	59
Tabelle 11: NCX3-PCR-Programm	59
Tabelle 12: Ansatz für qRT-PCR	63
Tabelle 13: qRT-PCR Protokoll	63
Tabelle 14: Relative Expression von PMCA1	. 151
Tabelle 15: Relative Expression von SERCA2	. 153
Tabelle 16: Relative Expression von SERCA3	. 155

Abkürzungsverzeichnis

[Ca²⁺]_i Zytosolische Kalzium-Konzentration

[Ca²⁺]_{i1t} Zytosolische Kalzium-Konzentration nach einem Drittel der

Erholung nach Histamin-Stimulation

[Ca²⁺]_{i2t} Zytosolische Kalzium-Konzentration nach zwei Dritteln der

Erholung nach Histamin-Stimulation

Abb. Abbildung

ARE androgen response element

BODIPY Boron-dipyrromethen

BPH Benigne Prostatahyperplasie

CCCP Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazon

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

chFKS Aktivkohlebehandeltes Fötales Kälberserum

CPA Cyclopiazonsäure

DAPI 4,6-Diamidin-2-phenylindol

DHT Dihydrotestosteron

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure

ER Endoplasmatisches Retikulum

FKS Fötales Kälberserum

Fura-2 AM Acetoxymethylester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HS high saline

MCU Mitochondiraler Uniporter

NCX Natrium-Kalzium-Austauscher

PBS phosphate bufferd saline

PCa Prostatakarzinom

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

PMCA Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase

PSA Prostatspezifisches Antigen

RNA Ribonukleinsäure

SERCA Sarco-/Endoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase

TAPS N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3 aminopropansulfonsäure

Anmerkung zu Anglizismen

Es wurde versucht, im Rahmen dieser Arbeit weitgehend auf Anglizismen zu verzichten. Manche englischsprachigen Fachbegriffe können leider nur unzureichend ins Deutsche übersetzt werden, bzw. es gibt keinen adäquaten deutschen Fachbegriff. An diesen Textpassagen konnte daher nicht auf die Benutzung von Anglizismen verzichtet werden. Entsprechend wurde auch bei englischsprachigen Eigennamen verfahren.

1 Zusammenfassung

Ca²⁺ ist eines der vielseitigsten und wichtigsten Signalmoleküle jeder Zelle. Unter anderem finden sich Ca²⁺-abhängige Prozesse in Zell-Metabolismus, Gen-Transkription aber auch nicht zuletzt im Rahmen der Apoptose. Änderungen im streng regulierten Ca²⁺-Haushalt führen daher zu unterschiedlichen Krankheiten, allen voran Krebs. Die maligne Entartung der Prostata ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland. Noch häufiger ist die benigne Prostata Hyperplasie (BPH). Die genauen Auslöser beider Krankheitsentitäten sind bisher noch nicht hinreichend geklärt. Neben anderen Größen ist Testosteron ein wichtiger Einflussfaktor bei Entstehung und Progress beider proliferativen Erkrankungen. Als in-vitro-Modell dienen unterschiedliche, teilweise bereits lange etablierte Zelllinien: z.B. PC3, DU 145, LNCaP (epithelial) und P21 (stromal).

Ziel dieser Arbeit war es, in verschiedenen Prostata-Zelllinien Ca²⁺-Transport-Mechanismen zu untersuchen, welche die basale zytosolische Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) aufrecht erhalten (Ca²⁺-Clearance). Die Clearance-Leistung der Sarkoendoplasmatischen-Retikulum-Ca²⁺-ATPase (SERCA), der Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase (PMCA), des Mitochondrialen Uniporters (MCU) sowie des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCX) wurde in den oben genannten epithelialen und stromalen Zelllinien fluoreszenzphotometrisch nach Histamin-Stimulation bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss des hochpotenten Testosteron-Metaboliten Dihydrotestosteron auf die Clearance-Leistung sowie Expression der genannten Ca²⁺-Transporter untersucht.

Es zeigten sich innerhalb der beobachteten Zelllinien viele Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede: Die basale [Ca²⁺]_i sowie das Ausmaß des [Ca²⁺]_i-Anstieges nach Histamin-Stimulation variierte innerhalb der unterschiedlichen Zelllinien. In LNCaP-Zellen konnte durch Histamin kein [Ca²⁺]_i-Anstieg provoziert werden. Am wichtigsten für die Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase zeigten sich in den übrigen drei Zelllinien PMCA und SERCA. Dabei hatte die PMCA-Inhibition in epithelialen Zellen einen größeren Effekt als in stromalen Zellen. MCU und NCX spielten in der Ca²⁺-Clearance der untersuchten Prostata-Zellen nur eine

untergeordnete Rolle. Im Gegensatz zu DU 145- und P21-Zellen zeigten sich marginale Änderungen der Clearance-Rate unter MCU- und NCX-Inhibition nur in der PC3-Zelllinie.

Überraschenderweise fanden sich neben Genexpressions-Änderung von SERCA3 und PMCA1 in LNCaP-Zellen, auch in Androgen-Rezeptor-negativen Zellen Abweichungen nach 72h Dihydrotestosteron-Inkubation. In DU 145-Zellen bestand eine reduzierte Clearance-Leistung von SERCA3, in P21-Zellen von PMCA1. Im Gegensatz dazu war die Clearance-Leistung von SERCA3 in PC3-Zellen durch die Dihydrotestosteron-Behandlung gesteigert, während die Expression von SERCA3 und PMCA1 reduziert war.

So konnte gezeigt werden, dass die Regulierung des Ca²⁺-Haushaltes in bereits etablierten Prostata-Zelllinien sehr unterschiedlich erfolgt und auch in Androgen-Rezeptor-negativen Zellen durch Dihydrotestosteron beeinflusst werden kann.

Summary

Ca²⁺ is one of the most versatile and important signal molecules in cells. There are a number of processes dependent on Ca2+, including cell metabolism, gene transcription and also apoptosis. Thus, it is hardly surprising that changes in the strictly regulated Ca²⁺ homeostasis can lead to various diseases, foremost cancer. Malignant degeneration of the prostate is the most common cancer in men Germany. However, benign prostate hyperplasia (BPH) is more common. The exact trigger of either disease has so far not been sufficiently clarified. Testosterone is one of the important factors in development and progress of both proliferative diseases. Different, in part already long-established cell lines, such as PC3, DU 145, LNCaP (epithelial) and P21 (stromal), are used as an in vitro model.

The aim of this work was to investigate Ca²⁺ transport mechanisms in different cell lines of the prostate which maintain the basal [Ca²⁺]_i (Ca²⁺-clearance). The clearance capacity of the plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA), the sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase (SERCA), the mitochondrial uniporter (MCU) and the sodium-calcium-exchanger (NCX) in the already-mentioned epithelial and stromal cell lines was determined fluorescence-photometrically after histamine stimulation. Additionally, the influence of the highly potent testosterone metabolite dihydrotestosterone on the clearance capacity and expression of the Ca²⁺ transporter was investigated.

There were several differences but also similarities among the investigated cell lines: The basal $[Ca^{2+}]_i$ as well as the $[Ca^{2+}]_i$ increase after histamine stimulation varied among the different cell lines. In LNCaP cells there was no histamine-related $[Ca^{2+}]_i$ increase. PMCA and SERCA were most important for the maintenance of Ca^{2+} homoeostasis in the other three cell lines. Thus, PMCA inhibition in epithelial cells had a greater effect than in stromal cells. MCU and NCX played a minor role in the Ca^{2+} clearance of examined prostatic cells. In contrast to DU 145 and P21 cells, the PC3 cell line showed marginal changes in the clearance rate under MCU and NCX inhibition.

Surprisingly, in addition to alterations of gene expression of SERCA3 and PMCA1 in LNCaP cells, changes in androgen receptor-negative cells also occurred after 72 h incubation of dihydrotestosterone. The clearance capacity of SERCA3 in DU145 and of PMCA1 in P21 cell was reduced. In contrast, the clearance rate of SERCA3 in PC3 cells increased after dihydrotestosterone treatment, while the gene expression of SERCA3 and PMCA1 was reduced.

So it could be shown that the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in already-established cell lines of the prostate is diverse and influenced by dihydrotestosterone, even in androgen-receptor negative cells.

2 Einleitung

2.1 Prostata - Anatomie und Funktion

Die Prostata - auch Vorsteherdrüse genannt - gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Als exokrine Drüse produziert sie ein saures und proteinreiches Sekret, welches 30% des Ejakulatvolumens ausmacht. Neben Proteinen wie Spermin und Seminin sind auch Zink und das Enzym saure Phosphatase wesentliche Bestandteile des Sekrets. Daneben ist ferner Cholesterol eine wichtige Komponente. Dem Prostataspezifischen Antigen (PSA), was sich ebenfalls im Seminalplasma befindet, kommt eine besondere Bedeutung im Rahmen der Diagnostik von Prostatapathologien zu. Die unterschiedlichen Komponenten des Prostatasekretes haben vor allem die Aufgabe, die Motilität der Spermatozoen zu steigern, das Seminalplasma zu verflüssigen, Spermatozoen weniger anfällig gegen Umwelt- oder Temperaturveränderungen zu machen, sowie den unteren Urogenitaltrakt vor Infektionen zu schützen [Frick et al., 1991].

Die Vorsteherdrüse besitzt physiologischer Weise etwa die Größe einer Kastanie und wiegt beim gesunden Mann zwischen 20 und 25 g. Umgeben von einer derben fibrösen Kapsel grenzt die Drüse mit ihrer Basis kranial an den Harnblasengrund und kaudal mit dem Apex an das Diaphragma urogenitale (Abb. 1). Ventral schließt sich im Spatium retropubicum eine bindegewebige Verstärkung, das Ligamentum puboprostaticum, an und verbindet so die Prostata mit der Symphyse. Dorsal der Vorsteherdrüse liegt das Rektum, über welches 4 cm ab Ano dieselbe palpiert werden kann. Von kraniokaudal ziehen sich beidseits als Fortsetzung der Ductus deferentes die Ductus ejaculatorii durch die Prostata und münden im Bereich des Colliculus seminalis in die Urethra. Die 30 – 50 tubuloalveolären Drüsen der Prostata münden über Ductuli prostatae in die Pars prostatica der Urethra. Die Prostata lässt sich sowohl nach anatomischen Gesichtspunkten, als auch nach funktionellen bzw. klinischen Aspekten einteilen. Rein anatomisch betrachtet

gliedert sich die Prostata in Lobus dexter und Lobus sinister, die über den Isthmus prostatae verbunden sind. Dorsal der Urethra befindet sich der Lobus medius.

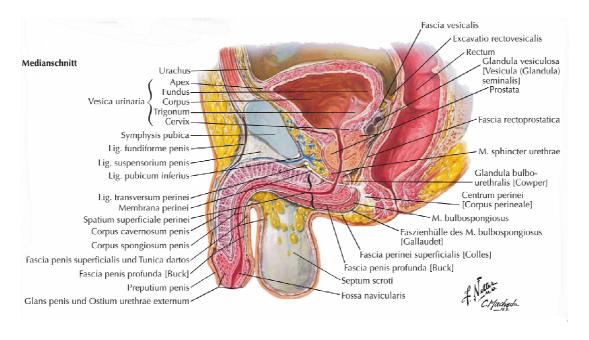


Abbildung 1: Prostata in situ - Medianschnitt [Atlas der Anatomie, Netter F., 5. Auflage, Elsevier].

Klinisch und funktionell wird die Prostata nach McNeal in vier Zonen gegliedert [McNeal, 1981]: periphere Zone, zentrale Zone, das präprostatische Segment mit Transitionszone sowie das anteriore fibromuskuläre Stroma (Abb. 2). Die periphere Zone macht ca. 65-70% des gesamten Volumens einer gesunden Prostata aus. Die Drüsengänge dieses Bereiches laufen fächerförmig von kraniolateral nach zentral und münden distal des Colliculus seminalis in die Urethra. Die Drüsenbereiche um die Ducti ejaculatores gehören der zentralen Zone an. Auch in der zentralen Zone verlaufen die Drüsen fächerförmig in Richtung des Colliculus seminalis und münden im selben in die Urethra. Diese Zone macht ca. 25-30% des Prostatagewebes aus. Die präprostatische Zone liegt kranial des Colliculus seminalis periurethral und beinhaltet den inneren oder preprostatischen Sphinkter. Dieser besteht aus einer glatten Muskelzellschicht als Fortführung der inneren longitudinalen Muskelschicht des Blasenhalses. Er schließt sich direkt an die urethrale Submucosa an. Dieser

innere Sphinkter verhindert zum einen retrograde Ejakulation, zum anderen sichert er die Harnkontinenz. Die Drüsengänge in diesem Bereich bilden sich nur rudimentär aus, da der Anschluss an das Urethralumen hier nur bedingt möglich ist. Eine Ausnahme stellt eine kleine Gruppe von Ausführungsgängen dar, die an der Basis des Colliculus seminalis münden. Sie liegen also zwischen der peripheren Zone und der distalen Begrenzung des internen Sphinkters. Man bezeichnet diesen Bereich als Transitionszone. Das anteriore fibromuskuläre Stroma als vierte Zone nach McNeal besitzt im Gegensatz zu den drei anderen bereits beschriebenen Bereichen keine Drüsenanteile.

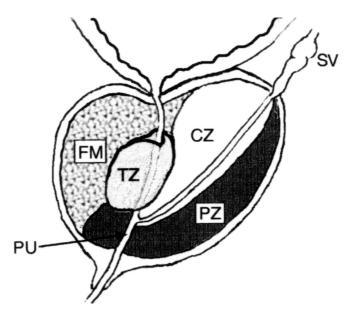


Abbildung 2: Zonengliederung der humanen Prostata [Giles et al., 2010]
Schematische Darstellung der zonalen Gliederung nach McNeal. FM: fibromuskuläres Stroma, TZ:
Transitionszone, CZ: Zentrale Zone, PZ: Periphere Zone, PU: Pars prostatica der Urethra, SV: Glandula vesiculosa.

Das Drüsenepithel der Prostata setzt sich aus drei verschiedenen Zelltypen zusammen: sekretorische luminale Zellen, endokrine Zellen und eine basale Zellschicht, welche als prostatische Stammzellpopulation fungiert [Aumuller, 1983; Bonkhoff et al., 1998; Frick et al., 1991]. Sie unterscheiden sich in Funktion, Entwicklungsgrad und Differenzierungsstadium. Dabei ist das Epithel je nach

Funktionszustand einschichtig isoprismatisch, aber auch mehrreihig iso- bis hochprismatisch. Das Drüsenepithel wird von fibromuskulärem Stroma umgeben.

Die Prostata nimmt ihre Funktion mit steigender Serum-Androgen-Konzentration während der Pubertät auf. Sie ist eines der wenigen Organe, das ein Leben lang wächst [Schauer et al., 2011]. Während die sekretorischen Zellen - hochdifferenziert aber mit geringem proliferativen Potential - streng androgenabhängig arbeiten, sind die Basalzellen - nicht differenziert aber mit hohem proliferativen Potential androgenunabhängig [Berry et al., 2008; Bonkhoff et al., 1998]. Letztgenannte exprimieren keine Androgenrezeptoren jedoch Östrogenrezeptoren. Für den Differenzierungsprozess bzw. die Reifung der aus der Basalzellpopulation gebildeten Zellen ist vor allem Testosteron wichtig, aber auch das Verhältnis des im Blut zirkulierenden Testosterons zu Östrogen. Dieses verändert sich in höherem Alter zunehmend in Richtung Östrogen. Obwohl im Stammzellkompartiment keine Androgenrezeptoren vorkommen, ist die Proliferation des Prostataepithels dennoch Testosteron-abhängig. Dafür ist die stromal-epitheliale Interaktion verantwortlich. Zellen synthetisieren unter Androgeneinfluss Wachstumsfaktoren, welche die Epithelproliferation stimulieren [Berry et al., 2008].

Testosteron gelangt per Diffusionem in die Zelle und wird dort über das Enzym 5-α-Reduktase in Dihydrotestosteron überführt, welches eine 10-fach höhere Androgenrezeptoraffinität besitzt als seine Ausgangssubstanz [Sperling et al., 2004]. Dieses reagiert mit dem zytosolischen Androgenrezeptor, disloziert in den Nucleus und aktiviert die RNA-Polymerase. So wird die Expression spezifischer Gene, die in nahezu allen zellulären Funktionen eingebunden sind, gezielt gesteigert. Dazu gehört unter anderem Proliferation, Zellüberleben, Fettstoffwechsel und Zelldifferenzierung.

2.2 Prostata – Pathologien

2.2.1 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) ist derzeit mit einem Anteil von 26% die häufigste maligne Erkrankung bei Männern in der Bundesrepublik Deutschland (Deutsches Krebsregister). In der Gruppe der tödlich verlaufenden malignen Erkrankungen steht dieser Tumor bei deutschen Männern an dritter Stelle. Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer bösartigen Neubildung im Bereich der Prostata ist das Lebensalter. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter momentan bei 69 Jahren. Weiterhin gilt - wie bei allen Krebserkrankungen - eine positive Familienanamnese (Verwandte ersten Grades mit einem Prostatakarzinom) ebenfalls als Risikofaktor. Eine besondere Rolle nimmt Testosteron in der Pathogenese des PCa ein. Obwohl jahrzehntelang ein erhöhter Testosteronspiegel als Risikofaktor für eine Tumorgenese gehalten wurde, ist die Datenlage zu diesem Thema sehr inhomogen [Algarte-Genin et al., 2004; Imamoto et al., 2008]. Die Rolle des Testosterons in der Entstehung des PCa ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es scheint dennoch sicher, dass Testosteron den Tumorprogress triggert. Daher wird im Rahmen der Therapie auch unter Umständen eine Chemokastration durchgeführt. Diese antiandrogene Behandlung kann über erhöhten Selektionsdruck dazu führen, dass das Karzinom schließlich androgenunabhängig wird. Neben dem umstrittenen Einfluss von Androgenen auf die Tumorentwicklung gibt es noch einige weitere Risikofaktoren, deren Gewicht bisher jedoch durch Studien nicht hinreichend belegt werden konnte. Dazu zählen Ernährung und Sozioökonomischer Status, lokale Entzündungen, Adipositas, Diabetes mellitus sowie Vasektomie [Giovannucci, 2001].

Hinsichtlich der Prävalenz zeigen sich aus geographischer, bzw. ethnischer Sicht deutliche Unterschiede. Die niedrigste Prävalenz weltweit findet sich im Mittelmeerraum, was nicht zuletzt wohl an der antioxidantienreichen Ernährung liegt. Die höchste Zahl an Neuerkrankungen findet sich in den Vereinigten Staaten und betrifft dort im Besonderen die farbige Bevölkerung. Trotz der hohen Inzidenz stehen die USA am Ende der weltweiten Mortalitätsrangliste. Ursächlich hierfür

könnte das ausgeprägte Früherkennungsprogramm des amerikanischen Gesundheitssystems sein [Haas et al., 2008].

Die Deutsche Gesellschaft für Urologie empfiehlt derzeit eine Früherkennungsuntersuchung ab dem 40. Lebensjahr bei Vorliegen von Risikofaktoren, bzw. ab dem 45. Lebensjahr ohne Risikofaktoren. Einzig die Biopsie und histologische Beurteilung sichert die Diagnose eines Prostatakarzinoms. Dem voran geht immer, zusätzlich zur klinischen Untersuchung, eine Bestimmung des PSA-Blutspiegels. Der PSA-Wert ist zwar organspezifisch, jedoch nicht krankheitsspezifisch. PSA-Screeninguntersuchungen - wie in den USA üblich werden hierzulande derzeit nicht empfohlen, da der Nutzen umstritten ist. Seit Einführung des PSA-Tests ist die Zahl der Neuerkrankungen drastisch angestiegen, da der Tumor bei vielen Betroffenen - auch sehr jungen Männern - in einem sehr frühen Stadium diagnostiziert werden konnte. Man spricht hier von einem age shift und stage shift. Es bleibt jedoch strittig, ob für diese Patienten der Nutzen durch die frühe Diagnosestellung überwiegt, oder ob eine Übertherapie erfolgt. Denn das Prostatakarzinom kann auch einen langsamen "natürlichen" Verlauf haben. Autopsiestudien haben gezeigt, dass die Zahl der "Karzinomträger" um ein Vielfaches höher ist, als die Zahl derer, die tatsächlich an einem Prostatakarzinom symptomatisch erkranken oder versterben [Bunting, 2002]. Auf der anderen Seite ist eine Heilung nur möglich, solange das Tumorgeschehen auf das Organ begrenzt bleibt.

Bei dem Prostatakarzinom handelt es sich meist um ein multifokal angesiedeltes Adenokarzinom. Es gibt zwei mögliche epitheliale Vorstufen für ein PCa. Das sind zum einen die prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN) und zum anderen die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH). Die PIN findet sich vor allem in der peripheren Zone, während die AAH in der Regel in der Transitionszone und zentralen Zone zu finden ist. Erstgenannte unterteilt man in high grade (hgPIN) und low grade. Dabei sind der Grad der Dysplasie und der Erhalt der basalen Zellschicht entscheidend für die Einteilung. Der Begriff der low grade PIN wird im Gegensatz zum high grade nur noch selten verwandt und stellt meist einen Zufallsbefund des Pathologen dar [Bostwick, 1996]. Dagegen handelt es sich beim high grade PIN um

eine obligate Präkanzerose. Es finden sich in strukturell physiologischen Azini zytologisch atypische Zellen. Jedoch ist unklar, ob die hgPIN auch eine Nebenerscheinung eines Karzinoms darstellen kann oder immer die Vorstufe darstellt. Im Unterschied zum Karzinom ist beim PIN die Basalmembran immer erhalten. Erst beim Durchbruch dieser Barriere wird aus dem *Carcinoma in Situ* ein invasives Karzinom. Umstrittener ist dagegen der Begriff der AAH im Bereich der Präkanzerosen. Man findet diese atypische glanduläre Zellvermehrung sowohl in gutartigem Prostatagewebe (z.B. im Rahmen einer benignen Prostatahyperplasie), als auch in Prostatakarzinomen.

Das PCa metastasiert sowohl lymphatisch als auch hämatogen. Bei Erstgenanntem sind pelvine und retroperitoneale Lymphknoten betroffen. Fernmetastasen finden sich in Organen wie Knochen und Lunge, Blase, Leber und Nebennieren.

Die Symptome eines Prostatakarzinoms sind häufig sehr unspezifisch und treten mitunter erst nach längerem unerkanntem Krankheitsverlauf in Erscheinung. Dazu gehören erschwertes oder schmerzhaftes Wasserlassen und B-Symptomatik mit Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Fieber und Nachtschweiß. Manche Betroffene werden erst durch Symptome der Metastasen (z.B. Rückenschmerzen durch Metastasen der Wirbelsäule) auf ihre Erkrankung aufmerksam.

Nach der Diagnosestellung wird die lokale Ausbreitung des Tumors mit Hilfe bildgebender Verfahren wie Ultraschalluntersuchung oder Computertomographie bestimmt. Die genaue Kenntnis über die Größe und Ausdehnung des Tumors ist für die Therapieentscheidung ausschlaggebend.

Je nach klinischem Stadium gemäß TNM-Klassifikation und Tumorgrad (Gleason-Score) erfolgt die weitere Therapie. Unter Berücksichtigung der Komorbidität kommen folgende Therapieoptionen in Frage: Prostatektomie mit evtl. Strahlenbehandlung (Seeds, perkutan, Brachytherapie) oder Chemokastration sowie watchful waiting (abwartende Nichtbehandlung).

2.2.2 Benigne Prostatahyperplasie

Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) bezeichnet die gutartige Vergrößerung der Prostata. Diese Zellvermehrung ist nie neoplastisch und stellt auch keine Vorstufe eines Malignoms dar, sondern ist eine eigene Krankheitsentität. Man kann diese sowohl klinisch, als auch anatomisch-histologisch beurteilen. Die klinische Beurteilung erfolgt gemäß der Symptome, die unter dem Begriff "lower urinary tract symptoms" (LUTS) zusammengefasst werden. Dieser Symptomenkomplex entsteht durch die mit der Zellproliferation verbundene zunehmende Obstruktion des prostatischen Abschnitts der Urethra. Zu den Krankheitszeichen gehören häufiges erschwertes typischer Weise Nokturie, und Wasserlassen (Startverzögerung), Stottermiktion sowie Restharnbildung. Histologisch ist die BPH durch eine typischer Weise stromale, aber unter Umständen auch epitheliale, Zellvermehrung charakterisiert. Diese findet sich regelhaft in der Transitionszone, sie kann aber auch in anderen Zonen der Prostata entstehen [Nicholson et al., 2011]. Es werden je nach beteiligter Zellart fünf Typen unterschieden (in absteigender Häufigkeit): 1. fibromyoadenomatös, 2. fibroadenomatös, 3. fibrös/fibrovaskulär, 4. fibromuskulär, 5. muskulär. Histologisch lässt sich eine beginnende BPH schon ab der vierten Lebensdekade nachweisen. Autopsiestudien konnte bei 90% der Männer über 80 Jahren eine BPH festgestellt werden. Dabei korreliert der histologische Nachweis, bzw. auch die Größe der Prostata nicht unbedingt mit den Symptomen der betroffenen [Roehrborn, 2005].

Die Ätiologie der BPH ist multifaktoriell und bisher noch nicht hinreichend geklärt. Dabei kann die Koexistenz von unterschiedlichen Entstehungstheorien auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Typen bzw. Entstehungsorte der BPH sein. Ein strittiger Punkt ist die Inflammation des prostatischen Gewebes, wobei diskutiert wird, ob sie als Ursache der BPH zu sehen ist, oder mit ihr einhergeht. Weiterhin werden Entitäten wie oxidativer Stress, metabolisches Syndrom oder auch veränderte Aktivität der autonomen Nerven als potentielle Ursachen angesehen [Schauer et al., 2011]. Eine Schlüsselrolle nimmt der Hormonhaushalt ein, der sich im Laufe des Lebens zunehmend verändert. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass

das Verhältnis von Östrogen zu Testosteron eine Rolle bei der Entwicklung der BPH spielt [Nicholson et al., 2011]. In BPH-Gewebe ist dieses Hormon-Verhältnis massiv zu Gunsten des Östrogens verschoben. Dies lässt den Schluss zu, dass das Verhältnis von Östrogen zu Testosteron ein Einflussfaktor für BPH-Entstehung ist [Prins et al., 2008]. Neben dieser Ratio ist auch Testosteron als solches ein wichtiger Punkt in der Pathogenese der benignen Prostatahyperplasie. Diese Erkenntnis fußt vor allem auf dem Wissen, dass die Prostata sich nur in Abhängigkeit von Androgenen überhaupt funktionsfähig entwickelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten mit Hypopituitarismus und folglich geringen Serum-Androgen-Konzentration gar keine BPH entwickeln [Nicholson et al., 2011]. Genauso verhält es sich auch mit Kastraten, die im Rahmen des Testosteronmangels weder BPH noch PCa entwickeln. Obwohl Testosteron den Krankheitsprogress der BPH zu beeinflussen scheint, ist ähnlich wie beim Prostatakarzinom aber dennoch umstritten, ob es auch einen Auslöser darstellt. Gleichzeitig bietet dies einen Ansatzpunkt zur medikamentösen Therapie der BPH. 5-α-Reduktase-Inhibitoren verhindern, dass das gleichnamige Enzym in der Prostata Testosteron in die 10-fach stärker wirksame Form Dihydrostestosteron (DHT) überführt wird. Dies resultiert in einer verminderten Zellproliferation des Prostatagewebes und so auch in einer Verbesserung der Symptomatik bei BPH-Patienten, bzw. zum Sistieren des Progresses. Denn das Androgen DHT transloziert nach Bindung an den Androgenrezeptor in den Kern und induziert dort durch die über androgen response elements (ARE) die Transkription verschiedener Gene (z.B. EGF), die unter anderem auch die Zellproliferation unterstützen. Eine weitere Säule, auf der die medikamentöse Therapie fußt, ist die Verabreichung von α -Rezeptor-Blockern. Diese führen über eine Relaxierung der glatten Muskulatur der Prostata zu einer Verbesserung der Obstruktion-Symptomatik. Allerdings kann so der weiteren Proliferation nicht entgegengewirkt werden. Neben der medikamentösen Behandlung ist der Goldstandard der Therapie die transurethrale Prostataresektion, bei der die Prostata ausgeschält wird und damit die Obstruktion beseitigt wird.

2.2.3 Zelllinien der Prostata

Alle verwendeten Zelllinien sind humanen Ursprungs und stammen aus unterschiedlichen Prostatapathologien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei epitheliale und eine stromale Zelllinie untersucht. Die epithelialen Linien wurden kommerziell von ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel) erworben. Diese bereits Jahrzehnte etablierten Zelllinien dienen als in-vitro-Modell des Prostatkarzinoms. Bei der stromalen Zelllinie handelte es sich um Zellen der Primärkultur.

Die PC3-Zelllinie wurde im Jahr 1979 von Kaighn et al. etabliert [Kaighn et al., 1979]. Es handelt sich um androgenunabhängige Zellen aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Patienten, der an einem Prostatakarzinom erkrankt war. Für die beschriebenen Versuche wurden Zellen der Passagen 11 bis 86 benutzt.

Im Jahr 1975 wurde die DU 145-Zelllinie erstmals von Stone und Kollegen beschrieben [Stone et al., 1978]. Die Zellen wurden im Rahmen einer Kraniotomie aus einer Hirnmetastase eines androgenunabhängigen Adenokarzinoms der Prostata gewonnen. Der 69-jährige Patient, der weiterhin an einer Leukämie litt, hatte zum Zeitpunkt der Operation bereits multiple Metastasen des Prostatakarzinoms entwickelt. Im Gegensatz zum Primärtumor, der nur schlecht differenziert war, zeigten sich die Zellen der Hirnmetastase mittelgradig differenziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellpassagen von 4 bis 94 verwandt.

Die dritte epitheliale Zelllinie, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist die LNCaP-Zelllinie. Die Primärkultur wurde 1977 von Horoszewicz et al. etabliert [Horoszewicz et al., 1980]. Die Zellen stammen aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines mittelgradig differenzierten Adenokarzinoms der Prostata. Der Tumor sprach im Verlauf der Behandlung nur schlecht auf Hormonund Chemotherapie an. Der 50-jährige Patient verstarb 18 Monate nach Diagnosestellung. Für die durchgeführten Versuche wurden Passagen von 10 bis 56 benutzt.

Im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien wurde die stromale P21-Zelllinie aus einer benignen Prostatahyperplasie gewonnen. Die Zellen konnten im Rahmen einer transurethralen Prostataresektion eines 56-jährigen BPH-Patienten isoliert werden. Die Verdopplungszeit der stromalen Zellpopulation ist mit 72 h, im Vergleich zu epithelialen Zellen, sehr lang und nimmt mit zunehmender Passagenzahl weiter zu. Janßen et al. beschrieben die Charakteristika dieser Zelllinie im Jahr 2000 erstmals [Janssen et al., 2000]. Ein wesentliches Merkmal ist, dass sich der Anteil fibroblastoider und myoider Zellen mit zunehmender Passagenzahl in Richtung der erstgenannten verschiebt. Nach der 12. Passage bleiben schließlich nur 10% myoider Zellen übrig. Daher wurden für die Experimente nur die Passagen 2 bis 14 benutzt.

2.3 Ca²⁺ in Zellphysiologie und -pathologie

Ca²⁺ gilt als vielfältigstes Signalmolekül im Rahmen des Zellmetabolismus. Im Gegensatz zu anderen intrazellulären Botenstoffen besitzt Ca²⁺ eine große Bandbreite an Wirkungsmechanismen. Es kann dabei an erster, zweiter oder sogar dritter Stelle einer Signalkaskade stehen. Über einen membranständigen G-Proteingekoppelten Rezeptor (CaR) vermittelt es beispielsweise seine Wirkung ähnlich wie Hormone [Fedrizzi et al., 2008]. Externe Stimuli dagegen können entweder dazu führen, das Ca²⁺ von extrazellulär einströmt oder aber, dass es über second messenger aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird [Berridge et al., 2003]. Ca²⁺ bindet dann an Effektorproteine, die für die Ca²⁺-abhängigen Prozesse verantwortlich sind. Allein durch die Bindung des Ions an ein Protein ändert sich dessen Konformität und Ladung und damit auch dessen Aktivität. Je nachdem in welchem Prozess Ca²⁺ als Vermittler fungiert, variiert das Ausmaß und die Dauer des zytosolischen Ca²⁺-Anstiegs. An Synapsen beispielsweise bewirkt Ca²⁺ innerhalb von Mikrosekunden eine Exozytose des Neurotransmitters. Im Rahmen der Muskelkontraktion dauert der Ca²⁺-Anstieg nur den Bruchteil einer Sekunde, während Zellmetabolismus, Gentranskription oder Fertilisation und Mitose in Minuten bis Stunden durch Ca²⁺ vermittelt werden. Auch im Rahmen von Chemotaxis oder Apoptose kommt Ca²⁺ zum Einsatz. Ca²⁺ spielt also eine wesentliche Rolle in allen Zellarten und vermittelt dabei ganz unterschiedliche

Funktionen. Physiologischer Weise liegt die zytosolische Kalziumionenkonzentration ([Ca²⁺]_i) bei etwa 100 nM - abhängig von der betreffenden Zellart -, während im extrazellulären Milieu eine 20000-fach höhere Konzentration herrscht. Da ein unmäßiger dauerhafter Anstieg der [Ca²⁺]; zu Veränderungen des Zellmetabolismus bis hin zur Apoptose führen kann, muss die [Ca²⁺]_i streng reguliert werden. Dies geschieht vor allem durch Entfernung aus dem Zytosol - entweder über spezifische Transportmechanismen nach extrazellulär oder in intrazelluläre Speicher. Eine Besonderheit des Ca²⁺ ist die transkriptionelle und auch posttranskriptionelle Autoregulation [Brini et al., 2009]. So kommt es bei Bedarf durch das Ion selbst zur Auf- oder auch Abregulierung der verschiedenen Ca²⁺-Transporter, welche den zytosolischen Kalziumhaushalt in strengen Grenzen regulieren. Abweichungen im Ca²⁺-Haushalt einer Zelle können zum einen Krankheits-auslösend sein, aber auch als Folge - mit der Erkrankung einhergehen. Zelldifferenzierung aber auch maligne Transformation (im Sinne einer Mutation von Protoonkogenen) gehen mit einer Veränderung der Ca²⁺-Signalwege und des Expressionsmusters beteiligter Proteine einher [Arbabian et al., 2010]. So konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass Ca²⁺vermittelte Signalwege eine wichtige Rolle bei der Karzinomentstehung, Metastasierung, Stromainvasion aber auch Angiogenese spielen [Parkash et al., 2010].

Neben Mutationen in Protoonkogenen können auch epigenetische Faktoren ursächlich für die Malignomentstehung sein. Sehr viele Karzinom-Arten sind Folge einer chronischen Gewebezerstörung. Es kommt zum Zelluntergang, aber gleichzeitig auch zu einem wiederholten Anstieg der [Ca²+]i unmittelbar benachbarter Zellen. Eben diese Zellen können den Ursprung des Malignoms darstellen. Ein Erklärungsansatz scheint, dass Ca²+ auf epigenetischer Ebene Einfluss nehmen kann [Jaffe, 2005]. Über Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren durch Ca²+-bindende Proteine, wie Calmodulin und Calcineurin, kann die Transkription durch Ca²+ indirekt reguliert werden. Eine direkte Regulation kann beispielsweise über das *EF-Hand* Ca²+-bindende Protein DREAM erfolgen. Dieses ist in der Lage, in den Kern zu gelangen und dort spezifisch mit Promotorregionen der DNA zu interagieren [Ikura et al., 2002]. Weiterhin wurde

gezeigt, dass es im Rahmen der Karzinogenese zu einer Hochregulierung von Ca²⁺-Transportern kommen kann, welche die zytosolische Kalziumkonzentration niedrig halten [Roberts-Thomson et al., 2010]. Dadurch wird die betreffende Zelle resistenter gegen Apoptosestimuli und entzieht sich so unter Umständen der körpereigenen Abwehr. Dieses Wissen wiederum kann einen Angriffspunkt für neue mögliche Therapieansätze geben. Welche Rolle Ca²⁺ in Ätiologie und Progress von Krankheiten - insbesondere Malignomen - aber genau einnimmt, ist jedoch noch unklar.

2.4 Ca²⁺-Kanäle und Prostatakarzinom

Auch für das Prostatakarzinom konnten bereits im Vergleich zu gesundem Gewebe Veränderungen des Ca²⁺-Haushaltes, bzw. der beteiligten Kanäle nachgewiesen werden [Prevarskaya et al., 2011]. Aus der Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential channels), welche durchlässig für Kationen sind, wurden bereits mehrere Mitglieder in Prostatakarzinomzellen nachgewiesen. TRPV6, welcher hochselektiv für Ca²⁺ ist, wurde in maligne entarteten Prostatazellen nachgewiesen, jedoch nicht in BPH-Zellen oder gesunde Gewebe. Dabei korreliert die Expression sowohl mit dem histologischen Grad nach Gleason als auch mit dem klinischen Stadium, bzw. auch der extra-prostatischen Ausbreitung [Fixemer et al., 2003; Wissenbach et al., 2004]. In vitro verstärkte TRPV6 in LNCaP Zellen die Apoptoseresistenz und führte zu einer gesteigerten Proliferationsrate [Lehen'kyi et al., 2007]. Eine gesteigerte Expression von TRPM8 konnte ebenfalls in Prostatakarzinomen demonstriert werden [Bidaux et al., 2007; Prevarskaya et al., 2007]. Dieser Kationenkanal scheint in direktem Zusammenhang mit dem Krankheitsprogress zu stehen. Cav3.2, ein spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanal vom T-Typ, wird im Rahmen der neuroendokrinen Differenzierung von LNCaP-Zellen überexprimiert [Gackiere et al., 2008; Mariot et al., 2002]. Wang und Kollegen konnten eine Überexpression von WNT5a in Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu Kontrollezellen zeigen sowie weiterhin Änderungen im Wnt5A/Ca²⁺-Signalweg [Wang et al., 2010].

2.5 Ca²⁺-Clearance

Der Begriff der Ca^{2+} -Clearance beschreibt die Fähigkeit einer Zelle, eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf das Grundniveau zu senken. Um die $[Ca^{2+}]_i$ in strengen Grenzen regulieren zu können, besitzt jede Zelle eine Ausstattung von vier wesentlichen Ca^{2+} -Transportmechanismen, welche eine sichere Ca^{2+} -Homöostase gewährleisten. Dazu gehören die Sarko-endoplasmatische-Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA), der Mitochondriale Uniporter (MCU) sowie der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX). Alle vier sind in Abb. 3 schematisch dargestellt. Diese sind die Haupt-Clearance-Mechanismen neben anderen intrazellulären Speichern wie z. B. der Golgi-Apparat und werden im Weiteren näher beschrieben.

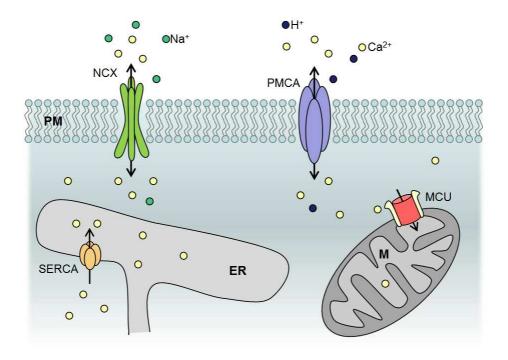


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Ca^{2+} -Transporter; PM: Plasmamembran; M: Mitochondrium; ER: Endoplasmatisches Retikulum; PMCA: Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase; SERCA: Sarko-endoplasmatische-Retikulum-Ca2+-ATPase; MCU: Mitochondrialer Uniporter; NCX: Na^{+}/Ca^{2+} -Austauscher.

2.5.1 Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase

Die PMCA ist eine membranständige Pumpe, welche unter Verbrauch eines ATP-Moleküls ein Ca²⁺ nach extrazellulär pumpt. Diese Pumpe gehört zu der Familie der P-ATPasen (Phosphorylierung erfolgt an einer Aspartat-Seitenkette des Enzyms unter Bildung einer energiereichen Carbonsäure-Phosphorsäure-Anhydridbindung). Sie vermittelt nicht nur den Efflux von Ca²⁺, sondern auch den Influx von Protonen. Dabei ist umstritten, ob es sich um einen elektroneutralen oder einen elektrogenen Austausch handelt [Brini et al., 2009]. Ein alkalischer extrazellulärer pH führt zur Abnahme der PMCA Aktivität [Xu et al., 2000]. In eukaryoten Zellen gibt es vier verschiedene Gene (ATP2B1-4), welche die Proteine PMCA1 bis PMCA4 kodieren [Brini, 2009]. Von jedem Gen-Transskript wiederum gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Splicing-Varianten. Insgesamt wurden etwa 30 unterschiedliche Varianten bisher auf RNA- oder Proteinebene nachgewiesen. Die Verteilung der unterschiedlichen Isoformen ist zell- und gewebsspezifisch und bedingt auch eine spezialisierte Funktion. Das Expressionsmuster ist sehr unterschiedlich. Eines der wenigen Gewebe, das alle Isoformen aufweist, ist das Gehirn [Zacharias et al., 1995]. Während PMCA1 und PMCA4 ubiquitär exprimiert werden, unterliegen die Isoformen 2 und 3 einer strengeren Verteilung. PMCA2 findet man beispielsweise in Leber, Haarzellen des Innenohrs, Purkinje-Zellen des Kleinhirns, Uterus oder laktierender Mama. PMCA3 lässt sich in quergestreiften Muskel oder auch in Zellen des Plexus choroideus nachweisen [Brini, 2009]. PMCA besteht grundsätzlich aus einer einzigen Polypeptidkette mit zehn Transmembrandomänen (TM), zwei intrazelullären Schleifen, vier zytosolischen Domänen sowie einem N- und Cterminalen Ende [Di Leva et al., 2008]. Die vier zytosolischen Domänen gliedern sich in eine Reglerdomäne (A-Domäne), eine Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne), eine Nukleotid-bindende Domäne (N-Domäne) sowie eine Calmodulin-bindende Domäne (CaM-BD) (Abb. 4). Die erste intrazelluläre Schleife zwischen TM2 und TM3 bildet zusammen mit dem N-terminalen Ende die A-Domäne, welche wahrscheinlich essentiell für die Phosphorylierung ist. Die zweite Schleife zwischen TM4 und TM5 beinhaltet den katalytischen Kern der Pumpe – die P-Domäne.

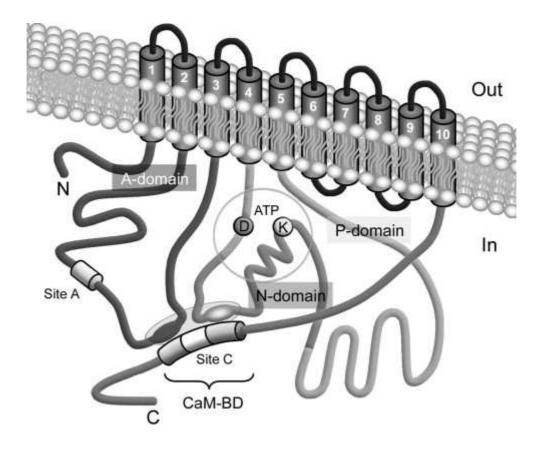


Abbildung 4: Membran-Topologie der PMCA [Di Leva et al., 2008]

Zylinder 1-10: Transmembrandomänen; CaM-BD: Calmodulin-bindinder Bereich; Site A + C: Splicing-Bereiche; D: Phosphoryl-Aspartat; K: Lysin; D+K: ATP-Bindung.

Die nicht stimulierte PMCA besitzt nur eine geringe Affinität zu Ca²⁺ und würde in diesem Zustand bei physiologischer [Ca²⁺]_i gar nicht arbeiten. Ausgenommen ist hier die Isoform PMCA2. Sie hat die besondere Eigenschaft, auch ohne Aktivatoren unter physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Einer der am längsten bekannten Aktivatoren ist Calmodulin, ein Ca²⁺-bindendes regulatorisches Protein. In Abwesenheit von Calmodulin wirkt die CaM-BD autoinhibitorisch, indem sie an beide intrazelluläre Schleifen bindet und so die Funktion der Pumpe blockiert. Die Aktivität wird weiterhin durch die Phospholipid-Zusammensetzung der umliegenden Plasmamembran bestimmt. Saure Phospholipide (z.B. Phosphatidylinositolbisphosphat) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirken aktivierend. Erstgenannte binden im Bereich der ersten zytosolischen Schleife und bewirken eine gesteigerte Dephosphorylierung und damit einen schnelleren Umsatz des ATP. Auch eine Phosphorylierung der Pumpe erhöht die Aktivität, zum einen über eine Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit und zum anderen aber auch über eine Erhöhung der Ca²⁺-Affinität [Di Leva et al., 2008].

In PMCA1 Knock-out-Tieren konnte gezeigt werden, dass PMCA1 eine Schlüsselrolle in der Embryogenese einnimmt [Prasad et al., 2004]. In Würfen heterozygoter PMCA1-Mäuse fanden sich im Rahmen der Studie ausschließlich Wildtypen und heterozygote Nachkommen. Um den Zeitpunkt der Embryoletalität bestimmen zu können, wurden Embryos zu unterschiedlichen Zeitpunkt entnommen. Obwohl präimplantatorisch vorhanden, konnten an Tag 8,5 der Trächtigkeit keine knockout-Tiere mehr entdeckt werden. An heterozygoten Tieren zeigte sich eine erhöhte Apoptoseneigung in glatter Gefäßmuskulatur. Eine homozygote PMCA2 Mutation kann entsprechend des Expressionsmusters zu Taubheit und Ataxie führen. Im Gegensatz zu PMCA1 gibt es lebensfähige PMCA4-Null-Mutanten. Ihr Phenotyp unterscheidet sich nur durch die Infertilität der Männchen vom Wildtyp.

Veränderungen des Expressionsmuster bzw. Überexpression der PMCA-Isoformen wurden bereits bei unterschiedlichen Karzinomarten nachgewiesen [Roberts-Thomson et al., 2010]. Dazu gehören vor allem Karzinomzelllinien von Mamma, Lunge, Haut und Colon. Diese Veränderungen sind meist Isoform-spezifisch und können für Krebszellen einen Wachstumsvorteil darstellen. Es finden sich je nach Art des Malignoms Hoch- und Runterregulierung der PMCA. Eine Überexpression kann Zellen beispielsweise weniger anfällig gegenüber Apoptosestimuli machen. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine gezielte Inhibition mittels siRNA in vitro in solchen Karzinomzellen zu einer verminderten Lebensfähigkeit führt. Warum eine abgeschwächte Expression der PMCA einen Selektionsvorteil für Krebszellen darstellen kann, wird bisher noch diskutiert. Scheinbar reagieren diese Zellen trotz geringerer PMCA-Expression weniger sensibel auf Apoptosestimuli [Roberts-Thomson et al., 2010].

2.5.2 Sarko-endoplasmatische-Retikulum-Ca²⁺-ATPase

Die Sarko-endoplasmatische-Retikulum-Ca²⁺-ATPase (SERCA) ist eine ATP-abhängige Pumpe, welche Ca²⁺ in das sarko-/ bzw. endoplasmatische Retikulum pumpt. Unter Verbrauch eines ATP-Moleküls kann die Pumpe zwei Ca²⁺ transportieren. Dabei werden entgegengesetzt zu den Ionen Protonen transportiert. Für zwei Ca²⁺ werden jedoch rein rechnerisch nicht genau vier H⁺ transportiert, sondern weniger. Folglich ist der Transport nicht elektroneutral [Brini et al., 2009]. Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) in Muskelzellen und sein Analogon, das endoplasmatische Retikulum (ER), fungieren in jeder Zelle als Ca²⁺-Speicher. Dabei können bis zu mehrere millimolar an Ca²⁺ gespeichert werden. Die SERCA gehört genau wie die Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase zur Familie der P-Typ-ATPasen. Sie ist eine 110 kDa schwere Polypeptidkette, die in der Membran des ER und SR lokalisiert ist und besitzt 10 Transmembrandomänen (TM) mit α-Helixstruktur (Abb. 5) [Periasamy et al., 2007]. Sie besitzt weiterhin drei zytoplasmatische Domänen: A (Reglerdomäne), N (Nukleotid-bindende Domäne), P (Phophorylierungsdomäne mit Aspartat). Die Ca²⁺-Bindungsstellen werden durch TM4, TM5, TM6 und TM8 gebildet [Toyoshima et al., 2000].

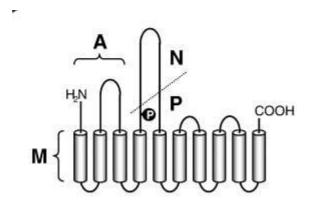


Abbildung 5: Membran-Topologie der SERCA [Puts et al., 2009]

Transmembrandomänen (TM) sind als Zylinder dargestellt. P: Phosphorylierungsdomäne, N: Nucleotid-bindende Domäne, A: Reglerdomäne; M: Ttransmembrandomänen.

Die Phosphorylierung des Aspartats führt zu einer drastischen Konformationsänderung, welche die Schlüsselrolle der Ca²⁺-Abgabe in das Lumen des ER/SR darstellt. Diese Pumpe ist sowohl in pro- als auch in eukaryoten Zellen zu finden. Die Aktivität der SERCA ist – abhängig vom Gewebe - durch Proteine wie z.B. Phospholamban und Sarcolipin reguliert. In dephosphoryliertem Zustand wirkt Phospholamban, welches zwischen TM6 und TM7 bindet, inhibierend auf die Ca²⁺-Aufnahme in das SR des Myokards. Durch β-adrenerge Stimulation über eine Aktivierung der Proteinkinase A wird Phospholamban phosphoryliert und so die Inhibierung aufgehoben [Periasamy et al., 2007]. Weiterhin wird die SERCA-Expression im Herzen durch Thyroxin getriggert. In Wirbellosen Tieren existiert nur ein kodierendes Gen für SERCA, während es in Vertebraten drei verschieden Gene gibt. Durch alternatives Splicing können aus den jeweiligen Transskripten mehr als zehn unterschiedliche Isoformen generiert werden. SERCA1 ist spezifisch in schnell kontrahierenden Muskelzellen, während SERCA2a vornehmlich in langsam kontrahierenden Myozyten sowie im Herzmuskel zu finden ist. SERCA2b ist in allen Geweben nachweisbar, wohingegen SERCA3 nur in nicht muskulären Zellen exprimiert wird [Periasamy et al., 2007]. Obwohl drei verschiedene Gene diese Pumpe kodieren, gibt es dennoch sehr viele Ähnlichkeiten. Alle Isoformen unabhängig von ihrer Gewebeverteilung – ähneln sich mindestens in 75% ihrer Primärstruktur. Dennoch können die Eigenschaften der unterschiedlichen Isoformen, was z. B. Inhibierung, Aktivierung oder Ca²⁺-Affinität betrifft, Gewebeoder Zell-spezifisch verschieden sein. Eine gemeinsame Eigenschaft ist die irreversible Hemmung durch Thapsigargin. Diese hält die Pumpe irreversibel in einem inaktiven Status. Indirekt kommt es so zu einer Entleerung des ER und einem zytosolischen Ca²⁺-Anstieg. Letztgenanntes wird durch kapazitativen Ca²⁺-Einstrom über sogenannte "store-operated channels" (SOC) noch zusätzlich verstärkt. Dabei dient Stim1 als Ca²⁺-Sensor im ER und Orai1 als Ca²⁺-selektiver Kanal in der Plasmamembran. Dieser Anstieg bleibt etwa für 6 bis 12 h bestehen, bevor sich die [Ca²⁺]_i wieder normalisiert. Nach etwa 24 h kommt es zu einem zweiten Anstieg der [Ca²⁺]_i, der dann schließlich in der Apoptose der Zellen resultiert [Denmeade et al., 2005]. Dieses Wissen kann für neue Therapieansätze genutzt werden. So konnten Denmeade et. al. zeigen, dass PSA-aktiviertes Thapsigargin gezielt

Prostatakarzinomzellen Apoptose einleitet. Ähnlich, wenn auch mit geringerer Affinität zur Pumpe und reversibel, wirkt auch Cyclopiazonsäure auf SERCA-Pumpen. Der Mechanismus über den CPA an der SERCA-Pumpe wirkt, ist noch umstritten. Wahrscheinlich blockiert CPA die Ca²⁺-Pore des Moleküls [Brini et al., 2009].

Eine Mutation des SERCA1-Gens geht, neben anderen Faktoren, mit der Brody-Myopathie einher [Periasamy et al., 2007]. Es zeigen sich verzögerte Muskelrelaxierung und belastungsinduzierte Muskelschmerzen. Die Lebenserwartung der Betroffenen ist durch eine kompensatorische Überexpression von SERCA2 jedoch normal. Bei der Darier-Erkrankung liegt eine Mutation in einem Allel des SERCA2-Gens. Es kommt zur fokalen Hyperkerathose der Epidermis. Die Patienten zeigen jedoch keine kardialen Symptome, da ein Allel ausreicht, um eine physiologische Herzfunktion aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zu Brody-Myopathie-Patienten zeigte sich bei SERCA1-Knock-out-Mäusen vor allem eine respiratorische Insuffizienz kurz nach der Geburt [Prasad et al., 2004]. Dies liegt wohl an der fehlenden kompensatorischen Hochregulierung anderer Isoformen, wie sie im Menschen zu beobachten ist. Weiterhin ist der Anteil schnell kontrahierender Muskelfasern im Zwerchfell der Mäuse viel höher als beim Menschen. Da SERCA2 vor allem im kardialen SR eine Rolle spielt, schien es unwahrscheinlich dass SERCA2-Knock-out-Mäuse überhaupt lebensfähig sind. Heterozygote SERCA2-Mutanten zeigten eine deutliche Verschlechterung bei kardialen Erkrankungen im Gegensatz zu Wildtypen, scheinen aber keine kardiale Funktionsstörung allein durch die Reduktion des SERCA2-Levels zu entwickeln. Sehr häufig wurde bei diesen Mäusen die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms beobachtet. SERCA3-Knock-out-Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Dies lässt den Schluss zu, dass SERCA3 keine housekeeping Funktion erfüllt [Prasad et al., 2004].

Im Rahmen einer Neoplasie kann sich auch das Expressionsmuster der SERCA verändern [Brouland et al., 2005]. Brouland et al. konnten zeigen, dass in Colonkarzinom und Malignomen des Magens die SERCA3 Expression verloren gegangen ist. Auch in Malignomen der Schilddrüse und der Lunge gibt es Veränderungen des SERCA-Expressionsmusters [Arbabian et al., 2010].

2.5.3 Mitochondrialer Uniporter

Auch Mitochondrien dienen als intrazelluläre Ca²⁺-Speicher. Abhängig vom Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran werden Ca²⁺ über den mitochondrialen Uniporter (MCU) in das Mitochondrium gepumpt [Drago et al., 2011]. Dabei wird das Membranpotential der inneren Membran entweder für die Ca²⁺-Aufnahme oder für die ATP-Synthese genutzt. Beides kann nicht gleichzeitig geschehen [Brini et al., 2009]. Regulatorisch wirkt dabei die MICU1-Untereinheit [Perocchi et al.]. Bis 2011 war der molekulare Aufbau dieser Pumpe weitgehend unbekannt und ist bisher auch noch nicht detailliert erforscht. Es handelt sich beim mitochondrialen Uniporter um ein 40 kDa schweres Protein mit zwei Transmembrandomänen und liegt in der inneren Mitochondrienmembran (Abb. 6) [De Stefani et al., 2011].

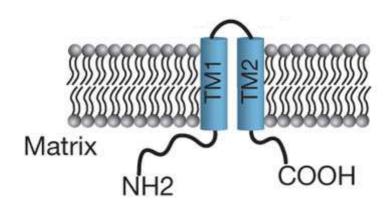


Abbildung 6: Membran-Topologie des MCU [Baughman et al., 2011] Transmembrandomänen(TM) sind als Zylinder dargestellt.

Physiologischer Weise hat der Uniporter eine geringe Ca²⁺-Affinität und wird erst ab einer [Ca²⁺]_i im μM-Bereich aktiv. Die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme ist wahrscheinlich am wichtigsten in Mikrodomänen nahe des ER und der Plasmamembran, da hier relativ hohe [Ca²⁺]_i-Spiegel erreicht werden. Unter physiologischen Bedingungen dient die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme zur Regulierung Ca²⁺-abhängiger Dehydrogenasen des Zitratzyklus und damit zur Regelung der ATP-Produktion [Brini et al., 2009]. Pro μm² Membran finden sich

etwa 10 bis 40 Pumpen. MCU kann durch Ruthenium Red inhibiert werden, aber auch durch eine Entkopplung der Atmungskette z.B. mittels Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP). Ferner kann MCU durch divalente Kationen (z. B. Mg²⁺, Mn²⁺) oder auch Protonen kompetitiv inhibiert werden [Dash et al., 2009]. Ein längerer exzessiver Anstieg der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration kann zur Dysfunktion der Mitochondrien bis hin zur Apoptose führen.

2.5.4 Na⁺/Ca²⁺-Austauscher

Ein weitere Pumpe, welche den Ca²⁺-Haushalt der Zelle reguliert, ist der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX). Dieser ist in der Plasmamembran lokalisiert und transportiert ein Ca²⁺ gegen drei Na²⁺ nach extrazellulär. Der NCX gehört zu der Familie der "solute carrier 8", welche wiederum den Ca²⁺/Kationen-Austauscher zuzuordnen ist [Lytton, 2007]. Dieser Transporter besitzt zwar eine geringe Ca²⁺-Affinität, jedoch eine hohe Transport-Kapazität. Ein Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration kann zu einer Umkehr der Pumpfunktion führen: Einwärts-Transport von Ca²⁺ in die Zelle [Allen et al., 2003]. Es existieren beim Menschen drei verschiedene Isoformen des Proteins, welche jeweils durch ein anderes Gen kodiert werden. Weiterhin gibt es auch hier unterschiedliche Splice-Varianten des jeweiligen Transskripts. Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher spielt vor allem bei erregbaren Zellen eine Rolle. NCX1, welcher erstmals in Kardiomyozyten nachgewiesen wurde, ist vornehmlich in Niere und Neuronen des Großhirns zu finden. Dennoch lässt sich eine schwache Expression in nahezu allen Geweben finden. Ähnlich verhält es sich mit NCX2. Diese Pumpe ist vornehmlich in zentralen Gliazellen und Skelettmuskel zu finden. NCX3 wird ausschließlich in neuronalen Zellen und Skelettmuskel exprimiert. Alle drei Isoformen gleichen sich jedoch in ihrer Aminosäuresequenz zu 70%. NCX besteht aus neun Transmembrandomänen, welche in zwei Gruppen angeordnet sind. Diese zwei Gruppen sind über eine intrazelluläre Schleife miteinander verbunden (Abb. 7) [Quednau et al., 2004].

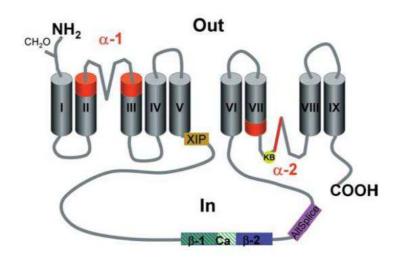


Abbildung 7: *Membran-Topologie des NCX* [Quednau et al., 2004] *Zylinder I-IX:* Transmembrandomänen.

In jedem Transporter gibt es unterschiedliche Repeatsequenzen. Die α -Repeatregionen sind am wahrscheinlichsten für Ionenbindung und Transport wichtig. Die genaue Funktion der β -Repeatsequenzen ist bisher noch ungeklärt. NCX-Aktivität kann unselektiv durch Amilorid- oder Bepiridil-Analoga inhibiert werden. Beides sind Medikamente die im Rahmen der Herzinsuffizienz eingesetzt werden. Klinisch spielen Aktivitätsänderungen des NCX vor allem in Pathologien von Herz und ZNS eine Rolle. Wahrscheinlich kommt es auch im Rahmen der Alzheimer Erkrankung zu einer Interaktion zwischen β -Amyloiden und NCX [Annunziato et al., 2004].

Knock-out-Mäuse wurden vor allem im Hinblick auf ihre zerebrale und kardiale Leistung untersucht. Ein Ausschalten von NCX2 oder NCX3 (v.a. im Hippocampus) führt zu deutlichen Einschränkungen in Lernvorgängen, Gedächtnis und synaptischer Plastizität [Jeon et al., 2003; Molinaro et al., 2011]. Ein NCX1-Knockout wirkt sich bereits im embryonalen Stadium letal aus. Zur Untersuchung der NCX1-Isoform wurde ein gezielter Knock-out an murinen Kardiomyozyten

durchgeführt. Die Mäuse zeigten nur eine leichte Einschränkung der kardialen Pumpfunktion [Henderson et al., 2004].

2.5.5 Ca²⁺-Clearance in unterschiedlichen Zellarten

Je nach Zellart haben die verschieden Ca²⁺-Clearancemechanismen einen unterschiedliche großen Einfluss auf den Ca²⁺-Haushalt. Dies hängt auch von den physiologisch erreichten [Ca²⁺]_i ab, bzw. der Funktion der Zelle. Es gibt bereits eine Reihe von Untersuchungen der Clearanceleistungen in diversen Zellarten. Sowohl in murinen Spermatozoen [Wennemuth et al., 2003], in Kleinhirnneuronen [Ivannikov et al., 2010], in differenzierten PC12 Zellen [Duman et al., 2008] als auch in humanen Thrombozyten [Redondo et al., 2005] ist PMCA der Haupt-Clearance-Mechanismus. SERCA ist vor allem in Herz- oder Skelettmuskel für den Ca²⁺-Transport verantwortlich. Dabei wird je nach Spezies in Kardiomyzoyten 70%-92% der [Ca²⁺]_i durch SERCA transportiert [Bers, 2002]. Weiterhin ist die ATPase auch in murinen β-Zellen des Pankreas [Chen et al., 2003] sowie Purkinje Zellen der Ratte [Fierro et al., 1998] maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase beteiligt. Herrington und Kollegen demonstrierten, dass MCU in chromaffinen Nebennierenzellen der Ratte den Haupt-Ca²⁺-Clearancemechanismus darstellt [Herrington et al., 1996]. NCX ist in undifferenzierten PC12 Zellen [Duman et al., 2008] sowie in Neuronen des Ganglion cerviale superior von Ratten [Wanaverbecq et al., 2003] hauptsächlich für die Ca²⁺-Clearance verantwortlich.

2.6 Zielsetzung

Wie einleitend bereits beschrieben, steht das Prostatakarzinom an erster Stelle der Krebsneuerkrankungen des Mannes. Auch die Benigne Prostatahyperplasie ist zumindest histologisch bei 90% der Männer über 80 Jahren nachweisbar. Die erfolgreiche Therapie des Prostatakarzinoms ist nur möglich, solange der Tumor auf das Organ beschränkt bleibt. Eine Änderung vom androgenabhängigen zum androgenunabhängigen Typ kann die Therapie dieses Malignoms zusätzlich erschweren. Nicht zuletzt unter klinischen Gesichtspunkten ist es notwendig, grundlegend mehr über Ätiologie, Krankheitsprogress sowie den auf Zellebene stattfindenden Veränderungen zu erfahren. Nur so können überhaupt neue Schritte in Richtung Diagnostik und Therapie gegangen werden.

Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase Einfluss auf die Malignomentstehung und den Krankheitsprogress haben kann, bzw. dass die maligne Entartung mit einer Veränderung des Ca²⁺-Haushaltes einhergeht [Arbabian et al., 2010; Brouland et al., 2005; Parkash et al., 2010; Roberts-Thomson et al., 2010]. Es wurde bereits eine Vielzahl an Mechanismen und Substanzen erforscht, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes führen - darunter auch mitogene und karzinogene Substanzen. Es sind weiterhin auch bereits unterschiedliche Veränderungen des Ca²⁺-Haushaltes in Prostata-Karzinom-Zellen beschrieben, wie z.B. Wnt5A/Ca²⁺-Signalweg oder unterschiedliche Expressionslevel von TRP-Kanälen [Bidaux et al., 2007; Fixemer et al., 2003; Lehen'kyi et al., 2011; Wang et al., 2010].

Das Augenmerk der wissenschaftlichen Arbeiten in diesem Bereich, hat sich erst in den letzten Jahren in Richtung Ca²⁺-Clearance verschoben. So gibt es beispielswiese bereits Clearance-Modelle von murinen Spermatozoen oder der PC12-Zelllinie [Duman et al., 2008; Wennemuth et al., 2003]. Sowohl in murinen Spermatozoen als auch in PC12-Zellen ist vor allen anderen die PMCA maßgeblich daran beteiligt, intrazelluläre Ca²⁺-Anstiege abzufangen. Desweiteren spielt auch NCX – vor allem in hohen Ca²⁺-Konzentrationsbereichen – eine Rolle. Im Gegensatz dazu nehmen MCU und SERCA bei diesen untersuchten Zelltypen nur eine untergeordnete Rolle bei der

Regulierung des Ca²⁺-Haushaltes ein. Sowohl für Prostatakarzinomzelllinien als auch für BPH-Zellen, gibt es bisher keine funktionelle Analyse der Ca²⁺-Transportmechanismen. Auch auf molekularbiologischer Ebene wurde in dieser Form bisher nicht untersucht, welche Isoformen der unterschiedlichen Ca²⁺-Transporter überhaupt in Zelllinien von BPH und PCa exprimiert werden. Dennoch gibt es schon verschiedene Studien, die gerade die Ca²⁺-Clearance als Angelpunkt für eine Therapie des Prostatakarzinoms sehen [Christensen et al., 2009; Denmeade et al., 2005]. Auch im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie soll ein Thapsigargin-Derivat in der palliativen Karzinomtherapie zum Einsatz kommen (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01056029). Daher ist es von besonderer Bedeutung mehr über die Ca²⁺-Homöostase der unterschiedlichen Prostatazelllinien zu erfahren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden konkret folgende Fragestellungen untersucht:

- Welchen Anteil haben PMCA, SERCA, NCX und MCU an der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase in PC3-, DU 145-, LNCaP- und P21-Zellen?
- In welchen Konzentrationsbereichen liegt die h\u00f6chste Aktivit\u00e4t der untersuchten Transportmechanismen in den jeweiligen Zelllinien?
- Arbeiten die Pumpen abhängig voneinander oder additiv zueinander?
- Gibt es Aktivitätsunterschiede zwischen der androgenabhängigen LNCaP-Zelllinie und den anderen Zelllinien?
- Welche Isoformen von PMCA, SERCA und NCX werden in den untersuchten
 Zelllinien exprimiert?

• Wie ändern sich Aktivität und Expression der Ca²⁺-Transporter unter Androgeneinfluss?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien wurden über die deutschen Niederlassungen der entsprechenden Firmen bezogen und sind im Weiteren genauer aufgelistet.

Von AppliChem wurde Chloroform und Tris-Puffer bezogen. Von New England BioLabs wurden vor allem Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen bezogen: 100 bp DNA Ladder (#N3231S), DNTP-Mix (#N0447S), Gel Loading Dye blue (6x) (#B7021S), Tag-Polymerase (#M0267S). GelRed wurde von Biotium erworben. Alle Verbrauchsmaterialien der Zellkultur wie Sechs-Well-Platten und Zellkulturflaschen waren von Greiner Bio-one. Von Invitrogen sind: Attofluor® Cell Chamber (#A7816), BODIPY® TR-X Thapsigargin (#B13800), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; #10829018), FURA-2-AM (#F1221), Pluronic F-127 (#P3000MP), Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI; # 21875091), Trypsin 0,5% **EDTA** (#15400054). Agarose, Carbonyl Cvanide Chlorophenylhydrazon (CCCP; #215911), Glucose D(+) (Monohydrat) sind von Merck. Von PAA wurde folgendes benutzt: Antibiotische/ antimykotische Lösung (Amphotericin B, Streptomycin, Penicillin), Fötales Kälberserum Gold (FKS), Phosphate-buffered Saline (PBS). Das Aktivkohl-behandelte Fötale Kälberserum stammt von PAN Biotech. Trifast wurde von peqlab bezogen. Von Quiagen stammt das RNA-Aufreinungs-Kit RNeasy Mini Kit (#74104). Für die Reverse Transkription von RNA in cDNA wurde das Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (#05081955001) von Roche benutzt. Von Roth stammen: Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure (100%), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (EGTA), Glycerin, Kalziumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumlaurylsulfat, Xylencyanol, 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI; #6335.1). Von Sigma-Aldrich wurden bezogen: 4-Bromo-Calcium Ionophor A23187 (#B7272), Androstan (4,5α-Dihydrotestosteron; #A8380), Ethidiumbromid (#E7637), Kaliumchlorid,

Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3 aminopropansulfonsäure (TAPS), Natrium-Pyruvat, Sodium DL-lactate 60% (w/w), Tris(hydroxymethyl)aminomethan. Von VWR stammen: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Deckgläschen, 25mm Ø, Histamindihydrochlorid. Ethanol, p.a., abs. stammt vom Zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes.

3.1.1 Histamin

Da Ca²⁺ in eine Reihe an Signalwege eingeschaltet sind, gibt es auch sehr viele unterschiedliche Substanzen, die in vitro benutzt werden können, um einen [Ca²+]_i-Anstieg zu evozieren. Auch in Prostatazellen gibt es eine Reihe von Stoffen, die zu einem reversiblen und gleichermaßen reproduzierbaren [Ca²⁺]_i-Anstieg führen [Wasilenko et al., 1997]. Dazu gehört auch das biogene Amin Histamin. Es wird aus L-Histidin durch die Histidindecarboxylase in vielen unterschiedlichen Zellen des Körpers gebildet [Jutel et al., 2009]. Es dient in verschiedenen Geweben als endogener Transmitter und ist vor allem im Kontext der Immunantwort von Bedeutung [Bachert, 2002]. Weiterhin spielt Histamin unter anderem im Rahmen von Zelldifferenzierung, Hämatopoese, Embryonalentwicklung, Wundheilung und kognitiven Fähigkeiten eine Rolle [Haas et al., 2003; Heron et al., 2001; Numata et al., 2006; Schneider et al., 2011]. Das biogene Amin wirkt wird über membranständige Rezeptoren. Dabei gibt es insgesamt vier verschiedene Subtypen: HR1 – HR4. Alle Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und vermitteln ihr Signal über sog. intrazelluläre "second messenger", welche sich jedoch je nach Rezeptor-Subtyp unterscheiden können. In vitro konnte bereits in vielen unterschiedlichen Zelltypen ein [Ca²⁺];-Anstieg durch Histamin gezeigt werden. Auch Prostatakarzinomzelllinien kann ein [Ca²⁺]_i-Anstieg über HR1 vermittelt werden [Lee et al., 2001]. G_{q/11} stimuliert dabei den Inositolphospholipid-Signalweg, was zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER über Inositoltriphosphat führt [Jutel et al., 2009]. Histamin wurde in den folgenden Versuchen benutzt, um einen reversiblen [Ca²⁺];-Anstieg in den untersuchten Zelllinien zu evozieren.

3.1.2 Inhibitoren

SERCA-Inhibition: Cyclopiazonsäure (CPA)

Cyclopiazonsäure ist ein toxisches Indoltetramer, welches in verschiedenen Spezies

von Aspergillus und Penecillinum synthetisiert wird. Das Mykotoxin ist ein starker

reversibler Inhibitor der Ca²⁺-ATPase des endoplasmatischen Retikulums. CPA

bindet dabei magnesiumabhängig an die Ca²⁺-Pore und stabilisiert so den

konformationellen Status der Pumpe, so dass keine Änderungen mehr möglich sind

und die Pump-Aktivität blockiert ist [Laursen et al., 2009]. Aus diesem Grund wurde

CPA in einer Konzentration von 15 μM für die SERCA-Inhibition benutzt (Abb. 8).

MCU-Inhibition: Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazon (CCCP)

Um Mitochondrialen Uniporter den zu inhibieren, wurde den

[Ca²⁺]_i-Messungen fluoreszenzphotometrischen Carbonyl Cyanide m-

Chlorophenylhydrazon (CCCP) benutzt. CCCP wurde erstmals von Heytler und

Prichard als Entkoppeler der Atmungskette verwandt [Heytler et al., 1962]. Carbonyl

Cyanid m-Chlorophenylhydrazon gehört zu der Gruppe der Protonophoren und

besitzt die Fähigkeit, Protonen über lipid bilayer zu transportieren. Da die Leistung

des MCU auf den Protonengradienten entlang der mitochondrialen Membran

angewiesen ist, führt eine Behandlung mit CCCP zwangsläufig auch zum

irreversiblen Ausfall des mitochondrialen Uniporters (Abb. 8). Dieser Inhibitor

wurde in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt.

PMCA-Inhibition

Die Inhibition der PMCA wurde durch eine Verringerung der extrazellulären

Protonenkonzentration gewährleistet (Abb. 8). Denn der Transporter vermittelt

34

nicht nur den Efflux von Ca²⁺, sondern auch den Influx von Protonen [Brini et al., 2009]. Xu und Kollegen beschrieben an Erythrozyten bereits, dass ein pH von 8,6 (Protonenkonzentration 2,5 nM) zu einer Abschwächung der PMCA-Leistung auf 21% ihres ursprünglichen Ausgangswertes bei pH 7,4 führt.

NCX-Inhibition

Der NCX wurde im Rahmen fluoreszenzphotometrischen [Ca²⁺]_i-Messungen durch Lithium inhibiert. Dabei wurde in dem entsprechenden Puffer 135 mM NaCl durch 135 mM LiCl ersetzt (siehe 3.3 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedium: LiCl-Puffer).

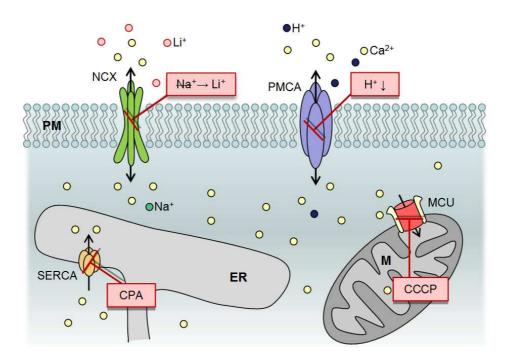


Abbildung 8: Schematische Darstellung der vier Ca^{2^+} -Pumpen mit Inhibitoren; PM: Plasmamembran; M: Mitochondrium; ER: Endoplasmatisches Retikulum; PMCA: Plasmamembran-Ca2+-ATPase; SERCA: Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Ca2+-ATPase; MCU: Mitochondrialer Uniporter; NCX: Na^+/Ca^{2^+} -Austauscher; CPA: Cyclopiazonsäure; CCCP: Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazon.

3.2 Geräte

CCD Kamera mit S/W Monitor CDM-1203 Monacor, Rotkreuz, Schweiz Chemi Doc XRS+ BioRad, München Digidata 1320 Series Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA Eclipse TE2000-U Invertoskop Nikon, Tokyo, Japan G-Storm GS482 AlphaMetrix, Rödermark Inkubator, incu safe mco 20AIC Sanyo, München Lasercanning System, Eclipse TE2000-E Nikon, Tokyo, Japan Invertoskop (D-Eclipse C1 mit Argonlaser) Perifusion Valve Controller Mode VC 8M Warner Instruments, Hamden CT, USA T.I.L.L. PHOTONICS GmbH, Gräfelfing Polychrome IV Power PAC 200 BioRad, München Wide Mini-Sub Cell GT cell BioRad, München

3.3 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien

Agarose-Gel 1% 2 g Agarose

200 ml TAE-Puffer

Die Lösung wurde mehrmals in der Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlieren mehr sichtbar

waren.

Nach Abkühlen wurden dem Gel 17 μl Ethidiumbromid unter leichtem Schwenken zugesetzt.

CCCP-Gebrauchslösung 2 μM 1 μl/ml Carbonyl Cyanide m-

Chlorophenylhydrazon

(Stock: 2 mM in DMSO)

in *High Saline* Puffer (HS-Puffer)

CPA-Gebrauchslösung 15 μM 1 μl/ml Cyclopiazonsäure

(Stock: 15 mM in DMSO)

in HS-Puffer

DMEM 460 ml Dulbecco's Modified Eagle

Zellkulturmedium Medium (DMEM)

50 ml Fetales Kälberserum (FKS)

10 ml Antibiotische/antimykotische

Lösung (Amphotericin B,

Streptomycin, Penicillin)

DNA-Marker 80 µl Aqua dest.

20 μl 100 bp DNA Ladder

20 μl Gel Loading Dye, blue (6x)

FURA-2-AM 5 μ I/ml FURA-2-AM

Gebrauchslösung (Stock: 1mM in DMSO)

3 μL/ml Pluronic

in Roswell Park Memorial Institute

Zellkulturmedium (RPMI) oder

DMEM Zellkulturmedium

HEPES-Stammlösung 11,915 g N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-

(1 M) ethansulfonsäure) (HEPES)

ad 50 ml Nach dem Ansetzen in Aqua dest.

wurde der Puffer mit 1 M

Natriumhydroxid auf pH 7,4/8,6

eingestellt.

HS-Stock (2x) 15,77g NaCl

0,75g KCl

ad 11 Aqua dest.

HS-Puffer	135 mM		NaCl
	5 mM	100 ml	KCI [HS-Stock 2x (NaCl +KCl)]
	2 mM	400 μΙ	Kalziumchlorid (1 M)
	1 mM	100 μΙ	Magnesiumchlorid (2 M)
	20 mM	4 ml	HEPES/TAPS (1 M Stammlösung)
	5 mM	0,312 g	Glucose
	10 mM	500 μΙ	Lactat
	1 mM	0,022 g	Pyruvat
		ad 200 ml	Nach dem Ansetzen in Aqua dest.
			wurde der Puffer mit 1 M
			Natriumhydroxid auf pH 7,4/8,6
			eingestellt.

"low Calcium"	5mM	10 ml	KCI [HS-Stock 2x (NaCl+KCl)]
	1 mM	10 μΙ	Magnesiumchlorid (2 M)
	20 mM	400 μΙ	HEPES (1 M Stammlösung)
	20 mM	152,14 mg	EGTA
		ad 20 ml	Nach dem Ansetzen in Aqua dest.
			wurde der Puffer mit 1 M

NaCl

Natriumhydroxid auf pH 7,4

eingestellt.

135 mM

Kalibrierungspuffer

Kalibrierungspuffer	135 mM		NaCl
"mid Calcium"	5 mM	10 ml	KCI [HS-Stock 2x (NaCl+KCl)]
	1 mM	2,408 mg	Magnesiumsulfat
	15 mM	300 μl	Kalziumchlorid (1 M)
	20 mM	400 μl	HEPES (1 M Stammlösung)
	20 mM	152,14 g	EGTA
		ad 20 ml	Nach dem Ansetzen in Aqua dest.
			wurde der Puffer mit 1 M
			Natriumhydroxid auf pH 7,4
			eingestellt.
Kalibrierungspuffer	135 mM		NaCl
"high Calcium"	5 mM	10 ml	KCI [HS-Stock 2x (NaCl+KCl)]
	1 mM	10 μΙ	Magnesiumchlorid (2 M)
	20 mM	400 μΙ	HEPES (1 M Stammlösung)
	2 mM	40 μΙ	Kalziumchlorid (1 M)
		ad 20 ml	Nach dem Ansetzen in Aqua dest.
			wurde der Puffer mit 1 M
			Natriumhydroxid auf pH 7,4
			eingestellt.
LiCl-Stock (2x)		5,72 g	LiCl
		0,3728 g	KCI
			Aqua dest.

135 mM		LiCl
5 mM	100 ml	KCI [LiCl-Stock 2x (LiCl/KCI)]
2 mM	400 μΙ	Kalziumchlorid (1 M)
1 mM	100 μΙ	Magnesiumchlorid (2 M)
20 mM	4 ml	HEPES (1 M Stammlösung)
5 mM	0,312 g	Glucose
10 mM	500 μΙ	Lactat
1 mM	0,022 g	Pyruvat
	ad 200 ml	Nach dem Ansetzen in Aqua dest.
		wurde der Puffer mit 1 M
		Natriumhydroxid auf pH 7,4
		eingestellt.
500 mM	0,74 g	Kaliumchlorid
100 mM	242 μΙ	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
22,5 mM	0,418 g	Magnesiumchlorid
5%	10 ml	DMSO
	ad 200 ml	in Aqua dest.
0.20/	0.4 ~	Codium do do outsulfat
0,2%	0,4 g	Sodiumdodecylsulfat
E00/	100 ~!	Clycorin
50%	100 ml	Glycerin
50% 0,05% 0,05%	100 ml 10 mg 10 mg	Bromphenolblau
	5 mM 2 mM 1 mM 20 mM 5 mM 10 mM 1 mM 250 mM 500 mM 500 mM 500 mM 500 mM 500 mM	5 mM 100 ml 2 mM 400 μl 1 mM 100 μl 20 mM 4 ml 5 mM 0,312 g 10 mM 500 μl 1 mM 0,022 g ad 200 ml 500 mM 0,74 g 100 mM 242 μl 22,5 mM 0,418 g 5% 10 ml ad 200 ml

ad 200 ml in Aqua dest.

RPMI 432,5 ml RPMI 1640

Zellkulturmedium 50 ml FKS

12,5 ml HEPES

10 ml Antibiotische/ Antimykotische

Lösung (Amphotericin B,

Streptomycin, Penicillin)

TAE-Puffer 1 mM 29 mg Ethylendiamintetraessigsäure

40 mM 0,484 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

20 mM 20 ml Essigsäure (100%)

ad 100 ml Nach dem Ansetzen in Aqua dest.

wurde der Puffer mit

konzentrierter Essigsäure auf pH

8,3 eingestellt.

3.4 Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert. Es handelt sich um Exon-übergreifende Primersequenzen zum Nachweis von zuvor transkribierter RNA. Die PMCA-Primer, ausgenommen für PMCA3, wurden aus der Arbeit von Moreau et al., 2003 übernommen und die Bindung mittels NCBI/Primer-Blast überprüft. Alle anderen Primersequenzen wurden mit Hilfe von NCBI/Primer-Blast ermittelt.

PMCA1-forward 5'- ACTGAGTCTCTCTTGCTTCGGAAAC - 3' Tm 63 ℃ **PMCA1-reverse** 5'- ACGAAATGCATTCACCACTCG - 3' *Tm 57,9* ℃ PMCA2-forward 5'- ACAGTGGTACAGGCCTATGTCG - 3' Tm 62,1 ℃ PMCA2-reverse 5'- CGAGCCGTGTTGATATTGTCG - 3' Tm 59,8 ℃ PMCA3-forward 5'- GGTCGTCTCCCACCGACAAG- 3' Tm 63,5 ℃ **PMCA3-reverse** 5'-GAAGAGCTCCCCGACAAACA - 3' Tm 59,4 ℃ **PMCA4-forward** 5'- GTTCTCCATCATCCGAAACGG - 3' Tm 59,8 ℃ **PMCA4-reverse** 5'- CAAGCATCCAAGTGCCGTACTAG - 3' *Tm 62,4* ℃ **SERCA1-forward** 5'- AACGTGGGCGAGGTGGTCTG - 3' Tm 63,5 ℃ **SERCA1-reverse** 5'- TGGATCCTCTAGGTAGTTCCGAGCA - 3' *Tm 64,6* ℃

SERCA2-forward 5'- ACTGGCGATGGCGTGAACGA - 3' Tm 61,4 ℃ **SERCA2-reverse** 5'- TGCAGGTTCCAGGTAGTTGCGG - 3' Tm 64 ℃ **SERCA3-forward** 5'- TGCATCTTCCTCACGGCAAT - 3' *Tm 57,3* ℃ **SERCA3-reverse** 5'- CCGGAGACTCCACTCTGTTC - 3' Tm 61,4 ℃ **NCX1-forward** 5'- TGTGGCCCTTACCATTATCCG - 3' Tm 59,8 ℃ **NCX1-reverse** 5'- GGCTGCTTGTCATCATATTCG - 3' *Tm 57,9* ℃ **NCX2-forward** 5'- CCGACTACGAGTACAGCGAG - 3' Tm 61,4 ℃ **NCX2-reverse** 5'- AACACCGTCAGGAAGTGCAT - 3' *Tm 57,3* ℃ **NCX3-forward** 5'- TGTGACAGACAGGAAGCTGAC - 3' Tm 59,93 ℃ **NCX3-reverse** 5'- CGTATCTGGGACAGAGGTGC - 3' *Tm 59,9* ℃

3.5 Software

Adobe Photoshop CS4 Extended Adobe Systems Inc., San Jose CA, USA Axoscope 9.2.1.6.1 Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA Endnote X2 (BLD 3210) Thomson Reuters., New York NY, USA Excel 2010 Microsoft, Redmond WA, USA EZ-C1 3.40 Nikon, Tokyo, Japan WaveMetrics, Lake Oswego OR, USA Igor Pro 6.0 Image Lab 4.0 BioRad, München Sigma Plot 12.0 Systat Software Inc., USA SPSS Statistics 20.0 IBM, Armonk NY, USA TILLpmcC 1.0.5 T.I.L.L. PHOTONICS GmbH, Gräfelfing Word 2010 Microsoft, Redmond WA, USA

3.6 Zellkultur

3.6.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO² in 75mm² bzw. 25mm² Flaschen kultiviert. Außer der DU 145-Zelllinie, die in DMEM wächst, wurden alle Zelllinien in RPMI kultiviert. Grundsätzlich erfolgte alle zwei bis drei Tage - je nach Zelllinie und Zelldichte - ein Mediumwechsel, um anfallende Stoffwechselprodukte zu eliminieren und pH-Verschiebungen zu vermeiden. Gleichzeitig sollte so ein kontinuierliches Angebot an Nährstoffen gewährleistet werden. Dabei wurde das alte Medium abpippetiert und durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt.

3.6.2 Passagieren von Monolayerkulturen

Liegt ein nahezu dichter Zellrasen vor, müssen die Zellen gesplittet, respektive passagiert, werden. Das bedeutet, man überführt die Zellen in entsprechender Verdünnung in neue Kulturflaschen. Dies ist wichtig, da die Zellen ansonsten beginnen, übereinander zu wachsen und abzusterben.

Nachdem das alte Kulturmedium abpippetiert wurde, wurde der Zellrasen mit 8 ml PBS gespült, um Reste des FKS-haltigen Mediums zu entfernen. Mögliche FKS Rückstände könnten eine folgende Trypsinreaktion abstoppen. Die Zellkulturflasche wurde im Anschluss mit 2 ml Trypsin auf der Wärmeplatte bei 37°C über 5 Min inkubiert. Um sicherzustellen, dass sich alle Zellen vom Untergrund gelöst haben, erfolgte nach leichtem Beklopfen der Kulturflasche eine Kontrolle durchs Mikroskop. Bei der LNCaP-Zelllinie konnte in der Regel schon nach weniger als 5 Min ein vollständiges Ablösen der Zellen beobachtet werden. Um die Trypsin-Reaktion zu stoppen und damit einen Zellschaden zu vermeiden, wurde 8 ml FKShaltiges Kulturmedium auf den gelösten Zellrasen gegeben. Die 10 ml Zellsuspension wurden dann entweder auf neue Flaschen verteilt und in 20 ml frischem Medium resuspendiert oder in mit Glasplättchen ausgelegten Sechs-Well-Platten ausgesät. In der Regel wurden die PC3-, DU 145 und LNCaP-Zelllinien 1:10 oder 1:20 gesplittet. Die P21-Zelllinie wurde 1:2 gesplittet. In den Sechs-Well-Platten wurde je Well 4 ml Medium vorgelegt und 300 bis 500 μL (je nach Dichte der Ausgangsflasche) der Zellsuspension hinzugegeben. P21-Zellen wurden mit 1 ml Zellsuspension pro Well ausgesät. Die Zellen wurden 2 bis 3 Tage vor dem geplanten Versuch auf 25 mm Glasplättchen in Sechs-Well-Platten ausgesät, P21 Zellen jedoch 7 Tage vorher. Dabei erfolgte im Normalfall am Tag vor der FURA-Messung nochmals ein Wechsel des Kulturmediums bzw. bei der P21-Zelllinie nach 3 Tagen.

3.6.3 Androgen-Stimulation der Zellen

Um zu prüfen, ob die Aktivität der untersuchten Pumpen sowie deren Expression androgenabhängig sind, wurden die untersuchten Zelllinien PC3, DU 145, P21 und LNCaP unter Androgenstimulation und Androgendeprivation vergleichend untersucht. Beide Populationen wurden über 72 h in dem entsprechenden Medium kultiviert.

Für die Expressionsanalyse wurde die Zellsuspension nach dem Trypsinieren in einer Verdünnung von 1:20 auf zwei 25mm² Kulturflaschen verteilt. Als Negativkontrolle wurde die entsprechende Zelllinie in 10 ml Medium mit Aktivkohle behandeltem Fötalen Kälberserum (chFKS) kultiviert. Die andere Flasche enthielt ebenfalls Kulturmedium, welches mit chFKS angesetzt wurde, allerdings mit 100 nM Dihydrotestosteron (Androstan). Die Flaschen wurden nach Standard im Brustschrank inkubiert. Alle 24 h erfolgte ein Wechsel des entsprechenden Kulturmediums.

Gleiches gilt auch für die Aussaat in Sechs-Well-Platten für die nachfolgenden FURA-Messungen. Auch hier wurde Zellsuspension auf zwei Platten verteilt, in denen jeweils ein anderes Medium vorlag: Medium mit chFKS und Medium mit chFKS und 100 nM Dihydrotestosteron. Auch hier erfolgte alle 24 h ein Mediumwechsel.

3.7 Fluoreszenzphotometrische Messung der [Ca²⁺]_i

Um die Aktivität der unterschiedlichen Ca²⁺-Clearance-Mechanismen beurteilen zu können, wurden fluoreszenzphotometrische Einzelmessungen mit dem Ca²⁺-Indikator FURA-2-AM durchgeführt. Nachdem gezielt ein [Ca²⁺]_i-Anstieg durch Histamin-Umspülung der Zelle provoziert wurde, konnte während des Absinkens der [Ca²⁺]_i die Zelle mit einem spezifischen Inhibitor umspült werden. Während dieser Erholungsphase, wurde die Clearance rechnerisch über die 1. Ableitung ermittelt. Veränderungen in der Clearance-Rate ließen so einen Rückschluss auf den Anteil der jeweils inhibierten Pumpe zu.

3.7.1 Eigenschaften des Kalziumindikators FURA-2-AM

Das BAPTA-Derivat FURA-2 besitzt genauso wie sein Ausgangsstoff eine hohe Ca²⁺-Affinität. Durch die hohe Polarität dieses Fluoreszenzfarbstoffes kann es jedoch nur schwer die Plasmamembran überwinden. Aus diesem Grund wurde der Ca²⁺-Chelator mit insgesamt fünf Acetoxymethyl-Estern (FURA-2-AM) versehen. Diese unpolare, aber auch wenig Ca²⁺-sensitive Form des Farbstoffes ist durch ihre lipophilen Eigenschaften sehr gut membrangängig. Intrazellulär überführen unspezifische Esterasen FURA-2-AM wieder in seine Ca²⁺-sensitive Form FURA-2.

FURA-2 gehört zu den sogenannten dual-wave-length-dyes. Das bedeutet, dass es bei diesem Farbstoff zwei Absorptionsmaxima gibt – abhängig davon, ob FURA Ca²⁺ gebunden hat oder nicht. Das Absorptionsmaximum des Ca2+-Komplexes liegt bei einer Anregungswellenlänge von 335 nm, das Absorptionsmaximum des freien Anions liegt bei 362 nm. Die beste Diskriminierung von Kalziumkonzentrationen zwischen 1 nM und 10 µM bei einer Emission von 510 nm liegt für den Ca²⁺-Komplex bei einer Anregung mit 340 nm und für freies FURA-2 bei 380 nm [Grynkiewicz et al., 1985]. Die Fluoreszenzintensität von FURA-2 ist bei einer Exzitation von 362 nm unabhängig von der Kalziumkonzentration (Abb. 9). Diesen Wert bezeichnet man als isobestischen Punkt. Das Aufgezählte begründet, warum FURA-Messungen grundsätzlich mit einer Anregung von 340 nm und 380 nm durchgeführt werden, also Wellenlängen die von den Absorptionsmaxima abweichen. Die Fluoreszenzintensitäten bei einer Anregung mit 340 nm und 380 nm verhalten sich abhängig von der [Ca²⁺]_i immer gegenläufig zueinander. Das heißt, bei steigender [Ca²⁺]_i steigt die Fluoreszenzintensität bei der Anregung mit 340 nm immer weiter an, während sie bei 380 nm immer weiter sinkt. Aus den gemessenen emittierten Lichtintensitäten kann man einen Quotienten bilden. (F₃₄₀/F₃₈₀). Dieser Quotient entspricht der [Ca²⁺]_i und ist in der Regel unabhängig von Störfaktoren, wie z.B. unterschiedlicher Farbstoffkonzentration oder unterschiedlicher Zelldicke und ähnliches.

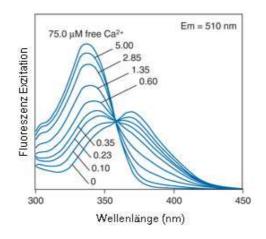


Abbildung 9: Exzitationsspektrum von FURA-2 (Quelle: Invitrogen)

3.7.2 Beladung der Zellen und Versuchsaufbau

Ein mit einem konfluenten Zellrasen bewachsenes Glasplättchen wurde in einen Einspannring (Attofluor® Cell Chamber, Invitrogen, Linden) eingesetzt, mit PBS gespült und mit 500 µl der 5 µM FURA-2-AM-Gebrauchslösung bedeckt. Die Zellen wurden so 30 Min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das eingespannte Plättchen zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin erneut für 15 bis 30 Min im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende Esterhydrolyse zu gewährleisten. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 500 µL HS-Puffer auf die Zellen gegeben. Mit einem 20x-Objektiv des Invertoskop wurde eine Zelle eingestellt und die "Region of Interest" entsprechend an die Zelle angepasst. Mittels Monochromator mit einer integrierten 150 W Xenonlampe erfolgte die Anregung bei 340 nm und 380 nm. Das bei 510 nm emittierte Licht wurde mittels Photomultiplier (Digidata 1320 Series, Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) verstärkt und zum Computer übermittelt. Dort wurde aus dem gemessenen Wertepaar der Fluoreszenzintensitäten ein Graph erstellt. Die Zelle wurde im mit einer Frequenz von 1 Hz bei 340 nm und 380 nm angeregt, dabei betrug die Belichtungszeit minimal bei 10 ms und maximal bei 20 ms.

So war es möglich, die gemessene Zelle zu definierten Zeitpunkten mittels eines Perifusions-Systems mit unterschiedlichen Puffern zu umspülen. So konnten direkt die Auswirkungen der applizierten Substanz auf den [Ca²⁺]_i-Haushalt der Zelle gemessen werden. Das Perifusions-System bestand aus sieben 10-ml-Spritzen, welche mit Polyethylen-Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm verbunden waren. Letztgenannte liefen in einer Glaskapillare mit einer abgerundeten Spitze zusammen. Im Verlauf der Schläuche befand sich ein steuerbares Magnetventil, das es erlaubte, den Fluss einer Spritze an oder auszuschalten. Pro Spritze flossen etwa 220 μl/min Flüssigkeit.

3.7.3 Kalibrierung

Um die gemessenen Quotienten in tatsächliche [Ca²⁺], umrechnen zu können, musste erst eine Kalibrierung erfolgen. Diese wurde nach Grynkiewicz [Grynkiewicz et al., 1985] mit Eichlösungen (deren Ca²⁺-Gehalt bekannt waren) und einem Ionophor (was Ca²⁺ ermöglicht in die Zelle einzudringen) vorgenommen. Nach dem Beladen der Zellen - wie oben beschrieben - wurde anstatt HS-Puffer 500 µl des mit 10 μM 4-Bromo-Calcium Ionophor A23187 versetzten Kalibrierungspuffers "low Calcium" auf die Zellen gegeben. 4-Bromo-Calcium Ionophor A23187 ist hochselektiv für Ca²⁺ und besitzt gegenüber seiner nicht halogenierten Ausgangssubstanz den Vorteil bei Fluoreszenz-Messungen, dass es keine Autofluoreszenz besitzt. Nach fünf Min Inkubationszeit, wurden mehrere Zellen wie bereits beschrieben - gemessen. Der gemessene Quotient hatte sich auf ein Plateau eingestellt, welches einer [Ca²⁺]; von 0 nM entsprach. Genauso wurde mit dem Kalibrierungspuffer "mid Calcium" vorgegangen, der einer [Ca²⁺]_i von 250 nM entsprach. Der "high Calcium" Kalibrierungspuffer mit 10 µM 4-Bromo-Calcium Ionophor A23187 wurde über die Perifusion eingeleitet. Der gemessene Quotient entsprach dabei der maximalen [Ca²⁺]_i, welche die Zelle duldet. Die gemessenen Werte wurden im Anschluss gemittelt. Für jede Zelllinie wurde eine eigene Kalibrierungs-Messreihe (n ≥ 30) durchgeführt. Mit Hilfe der Kalibrierungsformel nach Grynkiewicz (siehe unten) konnten die so gemessenen Quotienten nach Hintergrundkorrektur in [Ca²⁺]_i- Werte überführt werden.

$$[C\alpha^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

Dabei beschreibt K_d die Dissoziationskonstante zwischen freiem FURA und Ca²⁺-gebundenem FURA. R_{min} und R_{max} bezieht sich jeweils auf den bei den Kalibrierungsmessungen erhaltenen Quotienten in Ca²⁺-freien Puffer bzw. im Ca²⁺-gesättigten Puffer. S2 entspricht der Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 380 nM. f steht für die gemessene Lichtintensität in Ca²⁺-freiem Kalibrierungspuffer und b für die Intensität in Ca²⁺-gesättigten Puffer. Für R kann man nach erfolgreicher Kalibrierung Quotienten, die man in den eigentlichen Messungen erhält, einsetzen und ermittelt so über den Quotienten die [Ca²⁺]_i.

3.8 Molekularbiologische Untersuchung der Kalziumpumpen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht nur die Aktivität der unterschiedlichen Ca²⁺-Clearance-Mechanismen untersucht, sondern auch deren Expressionsmuster in den verschiedenen Zelllinien. Dabei erfolgte der Vergleich zwischen Zellen, die in Medium mit Aktivkohle behandelten FKS gewachsen sind, mit Zellen, die zusätzlich noch über 72 h mit 100 nM Dihydrotestosteron stimuliert wurden.

3.8.1 Humane Gewebe-Entnahme

Für den Nachweis der unterschiedlichen Ca²⁺-Transporter in den untersuchten Prostatazelllinien mittels PCR, wurden auch positiv Kontrollen benötigt. Aus diesem Grund erfolgte eine Gewebeentnahme am Leichnam eines Körperspenders. Es handelte sich dabei um einen 78-jährigen Mann, der im Rahmen einer malignen Erkrankung (Ösophaguskarzinom) verstarb. Es wurde ein temporo-parietaler Bogenschnitt gesetzt und die Dermis scharf abpräpariert. Die dünne Subkutis und

Muskelfaszie des M. temporalis wurden ebenfalls entfernt. Kleine Stücke – etwa 5 mm x 5 mm – des M. temporalis wurden entweder zur späteren Weiterverarbeitung direkt in flüssigen Stickstoff tiefgefroren oder für eine umgehende RNA-Aufreinigung direkt in 2,5 ml Trifast gegeben. Im Anschluss wurde der komplette Muskel von der Kalotte scharf abpräpariert und nach kaudal geklappt, so dass der Schädel im Bereich des Os temporale eröffnet werden konnte. Nach Entfernung der Meningen wurden aus dem Bereich des Temporallappens ZNS-Gewebe entnommen. Bei der Aufarbeitung wurde analog zu den Muskelproben verfahren.

3.8.2 RNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll der Phenol-Choloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [Chomczynski et al., 1987] sowie mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Quiagen. Es wurden 25 cm² Zellkulturflaschen einmal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden 2,5 ml Trifast, welches Phenol und Guanidinisothiocynat enthielt, auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgetragen. Die Zellsuspension wurde mit einer Einmalspritze und Kanüle (Durchmesser 0,9 mm) sechs bis acht Mal aspiriert. So wurde sichergestellt, dass in der homogenen Suspension alle Zellen aufgeschlossen wurden. Die humanen Gewebeproben wurden ebenfalls in 2,5 ml Trifast lysiert und mit einem Plastikmörser homogenisiert. Auch hier wurde die gewonnene Suspension mit Spritze und Kanüle weiter aufgeschlossen. Im Anschluss wurden von allen Proben je 800 µl der Suspension auf drei Reaktionsgefäße verteilt und jeweils mit 400 µl Chloroform versetzt. Daraufhin wurden die Gefäße eine Minute kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Suspension bei 12.500 RPM 5 min zentrifugiert wurde, war eine deutliche Phasentrennung zu erkennen. In der oberen wässrigen Phase war die RNA gelöst, während in der unteren Phenol-Phase Proteine gelöst waren. In der Grenze zwischen beiden Phasen, der sogenannten Interphase, befand sich die DNA. Die wässrige Phase (ca. 450 – 500 μl) wurde daraufhin in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem jeweils gleichen Volumen 70% Ethanols versetzt. Nach

vorsichtigem Mischen wurden 700 µL gemäß der Gebrauchsanweisung des RNeasy Mini Kits auf eine Auftrennsäule gegeben und 15 s bei 10.000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt mit den übrigen beiden Proben wiederholt. Wie angegeben, wurden 700 µL des mitgelieferten RW1-Puffers auf die Säule gegeben und wieder 15 s bei 10.000 RPM zentrifugiert. Dabei handelte sich um einen Waschpuffer mit Guanidin und Ethanol, der Kohlenhydrate, Fette und Proteine, die unspezifisch an die Säule gebunden hatten, in Lösung nehmen sollte. Daraufhin wurde die Säule in ein frisches Probengefäß überführt und 500 µl des RPE-Puffers des RNeasy Mini Kits auf die Säule gegeben. Bei dem RPE-Puffe handelte es sich um einen Ethanol-haltigen Waschpuffer, welcher Salze der zuvor benutzten Puffer entfernen sollte. Nach einem Zentrifugations-Schritt von 15 s bei 10.000 RPM, wurde erneut RPE-Puffer auf die Säule gegeben und 2 min bei 10.000 RPM zentrifugiert. Um Puffer-Reste zu entfernen, wurde die Säule in einem frischen Reaktionsgefäß für 1 Min bei 12.500 RPM zentrifugiert. Schließlich wurden 40 µl RNAse freies Wasser auf die Säule gegeben und so die RNA wieder in Lösung genommen und bei 10.000 RPM 1 min lang zentrifugiert. Mit der so extrahierten und aufgereinigten RNA wurde eine photometrische Konzentrations-Bestimmung durchgeführt. Die RNA wurde in der Regel direkt nach Aufreinigung in cDNA umgeschrieben. Reste der RNA-Lösung wurden, wie von Quiagen empfohlen, bei -20° C tiefgefroren.

3.8.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer ermittelt. Dabei wurde die Absorption der RNA-Lösung mit einer Verdünnung von 1:60 bei 260 nm und 280 nm gegen RNAse freies Wasser gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Annahme, dass bei $OD_{260} = 1,0$ eine RNA-Konzentration von 40 μ g/ml vorliegt [Mülhardt, 2009]. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. So kann aus dem Verhältnis OD_{260} / OD_{280} der

Reinheitskoeffizient berechnet werden, welcher bestenfalls zwischen 1,6 und 2,0 liegt.

3.8.4 Reverse Transkription

Eine Umschreibung von RNA in cDNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase ist seit 1970 möglich [Baltimore, 1970; Temin et al., 1970]. Dieses Enzym wurde von Baltimore und Temin erstmals aus dem Rous-Sarkom-Virus isoliert, welcher bei Hühnern die Entstehung von Sarkomen fördert. Die Reverse Transkription der extrahierten RNA wurde zweischrittig mit dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* von Roche gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgten die Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA und die Bindung der Primer. Im zweiten Schritt wurde die eigentliche Umschreibung der Ausgangs-RNA in cDNA vorgenommen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter RNAse-freien Bedingungen durchgeführt. Der Template-Primer-Mix wurde im Thermocycler 10 min bei 65° C inkubiert und danach direkt auf Eis gekühlt (Tab. 1, 3). Im Anschluss wurden 18,6 μl des vorbereiteten Master-Mix hinzugegeben und bei 55°C für 30 min inkubiert (Tab. 2, 3). Auch nach dem zweiten Schritt wurde das PCR-Gefäß direkt auf Eis gekühlt. Die cDNA wurde direkt im Anschluss bei -20°C eingefroren.

Tabelle 1: Template-Primer-Mix für Reverse TranskriptionAnsatz für eine Reaktion

RNA-Template	4 μg
Random Hexamer Primer (600 pmol/μl)	60 μΜ
H ₂ 0 (RNAse frei)	ad 11,4 μl

Tabelle 2: Master-Mix für Reverse Transkription

Ansatz für eine Reaktion

Reaktions-Puffer (5x)	4 μΙ
Protector RNase Inhibitor 40 U/μΙ	0,5 μΙ
Desoxynucleotid-Mix 10mM	2 μΙ
DTT	1 μΙ
Reverse Transkriptase	1,1 μΙ
Gesamtvolumen	18,6 μΙ

Tabelle 3: Reverse Transkription

Protokoll

1. Schritt	65°C	10 min
2. Schritt	55°C	30 min
3. Schritt	4°C	∞

3.8.5 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktionen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geht auf den Biochemiker Kary Mullis zurück, der im Jahr 1993 für die Entwicklung dieser Methode den Nobelpreis für Chemie erhielt [Mullis et al., 1986]. Im Rahmen der PCR wird ein gewünschter DNA-Abschnitt mit bereits bekannter Nukleotidsequenz in vitro amplifiziert. Der zu vervielfältigende Bereich wird durch Primer markiert. Die betreffenden Primer sind Oligonukleotide mit einer Länger von etwa 20 bp mit korrespondierender Basenabfolge zur Matrize. Vorwärts- und Rückwärtsprimer markieren jeweils Ende bzw. Anfang des Amplifikats. Im Falle der Amplifikation von cDNA muss darauf geachtet werden, dass die entsprechenden Primer Exon überspannend sind. Ansonsten wir nicht nur cDNA amplifiziert sondern ggf. auch der entsprechende Abschnitt der genomischen DNA. Die Polymerase-Kettenreaktion teilt man in drei Phasen ein: Denaturierung, Primerhybridisierung ("Annealing") und Elongation. Während der Phase der Denaturierung wird die Temperatur auf 95°C erhöht, um durch Sprengung der Wasserstoffbrückenbindung ein Auftrennen der DNA-Stränge zu gewährleisten. Während der Primerhybridisierung wird die Temperatur wieder erniedrigt, abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) des jeweiligen Primerpaares. In dieser Phase lagern sich die Primer an den homologen Abschnitt des Templates an und markieren so den zu replizierenden Abschnitt für die Taq-Polymerase. Dabei bezeichnet T_m die Temperatur, bei der 50% der Primer an die zu ihnen homologe Sequenz binden. Sie ist abhängig von der Länge und der Basenabfolge der Primer. In der Regel wählt man die Annealing-Temperatur etwa 5°C um die T_m. In der dritten Phase erfolgt der eigentliche Amplifikationsschritt. Die Temperatur wird auf 72°C erhöht, was das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase darstellt. Dieses Enzym ist eine besonders hitzebeständige Polymerase mit 5'- 3'-Aktivität, die ursprünglich in Thermus aquaticus YT-1 gefunden wurde. Sie setzt ca. 1000 bp pro Min um. Diese drei Phasen bilden einen Zyklus. Normalerweise besteht eine PCR aus etwa 30-40 Zyklen, an die sich ein finaler Elongationsschritt über 10 min bei 72°C anschließt. Je nachdem in welcher Konzentration der zu replizierende Abschnitt vorliegt, kann die Zyklenzahl aber auch weiter erhöht werden.

Um zu bestimmen, welche Ca²⁺-Transporter-Isoformen in den unterschiedlichen Zelllinien mit und ohne Androgen-Stimulation exprimiert werden, wurde eine konventionelle PCR mit entsprechender cDNA durchgeführt. Diese liefert als solche jedoch lediglich einen qualitativen und keinen quantitativen Nachweis. Alle PCRs wurden im Thermocycler GS482 von G-Storm durchgeführt. Es wurde immer der Mastermix-Ansatz, wie in Tabelle 4 beschrieben, benutzt. Die cDNA wurde in der Regel so verdünnt, dass absolut gerechnet 60 ng eingesetzt wurden. Ausnahmen sind bei dem entsprechenden PCR-Protokoll gesondert erwähnt (Tab. 5-11). Alle Primer wurden bei den Versuchen in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Als Positivkontrolle für alle PMCA-PCRs wurden die cDNA aus den ZNS-Proben benutzt [Zacharias et al., 1995]. Für den SERCA1- und SERCA2-Nachweis diente Muskel-cDNA als Positivkontrolle [Martin et al., 2002], genauso wie für die NCX3-PCR. Bei allen anderen PCRs wurde ebenfalls ZNS-cDNA benutzt [Lytton, 2007].

Tabelle 4: Master-Mix für PCR Ansatz für eine Reaktion

	Volumen	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x)	5 μΙ	1 x
DMSO	2,5 μΙ	2,75 mg
Primer - vorwärts 50 μM	1 μΙ	1 μΜ
Primer - rückwärts 50 μM	1 μΙ	1 μΜ
dNTP 10 mM	1,25 μΙ	250 μΜ
Taq-Polymerase 5000 units/ml	0,5 μΙ	2,5 U
cDNA	3 μΙ	30 – 60 ng
H ₂ O _{dest}	ac	d 50 μl

Tabelle 5: PMCA 1,2,4-PCR-Programm Positivkontrolle: ZNS; 60ng cDNA				
95°C			1 min	
	ſ	95°C	30 sec	
40 Zyklen	{	55°C	30 sec	
	l	72°C	1 min	
72°	С		5min	
4°C			∞	

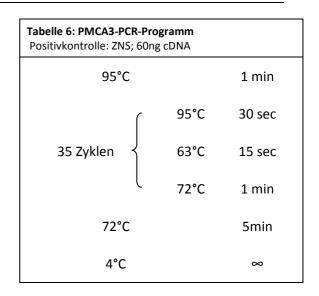


Tabelle 5: SERCA1-PCR-Programm Positivkontrolle: Muskel; 60 ng cDNA				
95°C	1 min			
	95°C	30 sec		
30 Zyklen	62°C	30 sec		
	72°C	1 min		
72°C		5min		
4°C		∞		

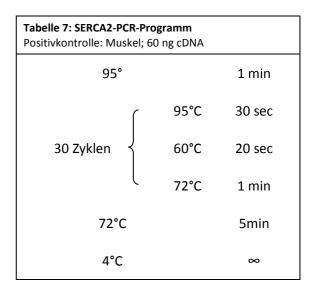


Tabelle 8: SERCA3-PCR-Programm Positivkontrolle: ZNS; 60 ng cDNA				
95°C			1 min	
	ſ	95°C	30 sec	
30 Zyklen		62°C	30 sec	
	l	72°C	1 min	
72°C			5min	
4°			∞	

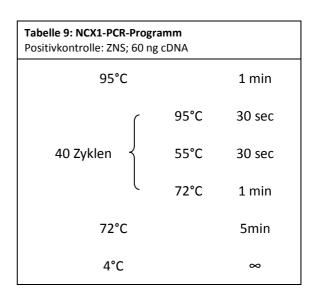


Tabelle 10: NCX2-PCR-Programm Positivkontrolle: ZNS; 60 ng cDNA				
95°C			1 min	
33 Zyklen	ſ	95°C	30 sec	
	}	53°C	15 sec	
		72°C	1 min	
72°C		5min		
4°C			∞	

Tabelle 11: NCX3-PCR-Programm Positivkontrolle: Muskel; 60 ng cDNA				
95°C			1 min	
35 Zyklen	ſ	95°C	30 sec	
	{	62°C	15 sec	
		72°C	1 min	
72°C		min		
4°C			∞	

3.8.6 Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente [Stellwagen, 2009]. Dabei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur Anode wandert. Dabei richtet sich die Laufgeschwindigkeit nach der Größe der Fragmente. Die Trennschärfe des Agarose-Gels richtet sich nach dem Gehalt an Agarose. Es wurden bei allen Versuchen 1% Agarose-Gele benutzt. Diesen wurden, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, 0,007% Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren und führt bei einer Beleuchtung mit UV-Licht zu sichtbaren Banden im Agarose-Gel [Waring, 1965].

Nachdem das mit Ethidiumbromid versetzte Agarosegel in der abgedichteten Gelkammer ausgehärtet war, wurde die Kammer mit TAE aufgefüllt, so dass das Gel und auch die Taschen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die PCR-Produkte wurden mit 10 μl Probenauftragspuffer versetzt und daraufhin 25 μl der Probe in je eine Tasche des Agarosegels gegeben. Zusätzlich wurde in eine Tasche mit 7 μl DNA-Marker gefüllt. Alle Gel-Elektrophoresen liefen grundsätzlich bei 70 V über einen Zeitraum von 45 bis 60 Min. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzdetektor Chemi Doc XRS+ (Biorad, München) und der Software Image Lab 4.0.

3.8.7 Quantitative Real-Time-PCR

Neben der qualitativen konventionellen PCR gibt es weiterhin die Möglichkeit, eine quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR) durchzuführen (qRT-PCR). Wie der Name bereits verrät, können Nukleinsäuren nach dem Prinzip der PCR vervielfältigt werden und in Echtzeit mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Diese Methode kommt in unterschiedlichen Bereichen zur Anwendung z.B. in der klinischen Mikrobiologie, Lebensmittel-Mikrobiologie, klinische Onkologie, sowie bei Genexpressions-Analysen [Klein, 2002]. Man unterscheidet verschiedene Formate der Fluroeszenzmessung bei der qRT-PCR: Hydrolisierungssonde (TaqMan™), Molecular Beacons oder Scorpion-Primers und Fluoreszence Resonance Energy Transfer (FRET) [Holzapfel et al., 2007]. Hydrolisierungssonden sind Oligonukleotide, die zu einem Abschnitt der gesuchten Sequenz komplementär sind. Sie besitzen an einem Ende einen sog. "Reporter", ein Fluorochrom (z.B. 5-FAM/5-Carboxyfluorescein), und am anderen einen sog. "Quencher", der die Emission des Reporters durch die unmittelbare Nähe zu diesem unterdrückt. Wird nach der Bindung spezifischer Primer die gewünschte Sequenz synthetisiert, so spaltet die Taq-Polymerase durch ihre Exonuclease-Tätigkeit die Sonde von der Matrize Nucleotid für Nucleotid ab und trennt damit Reporter und Quencher. Die Fluoreszenz des Reporters ist somit nicht mehr unterdrückt und steigt mit wiederholender Replikation der gewünschten Nukleotidsequenz exponentiell an. Die sogenannten Molecular Bacons sind ebenfalls Oligonukleotide, an deren Enden sich jeweils Reporter und Quencher befinden. Im Unterschied zu den TagMan™-Sonden bilden diese allerdings durch komplementäre Nukleotidsequenzen am 3'und 5´-Ende eine Haarnadelstruktur. Dadurch sind Quencher und Reporter so nahe beieinander, dass die Fluoreszenz unterdrückt wird. Erst durch die Bindung an die Zielsequenz wird die Haarnadelstruktur aufgehoben, und Quencher und Reporter sind weit genug voneinander entfernt, dass der Reporterfarbstoff Licht emittieren kann. Bei der FRET-Detektion kommt es zur Fluoreszenz durch Energietransfer. Zwei Sonden binden an die Zielsequenz in unmittelbarer Nähe. An beide Sonden sind Fluorochrome gebunden. Dabei entspricht das Emissionsspektrum des Einen dem Anregungsspektrum des Anderen. Durch die unmittelbare räumliche Nähe zu der Zielsequenz kann es zu einem Energietransfer kommen, Licht wird emittiert. Des Weiteren lässt sich eine qRT-PCR auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green durchführen. Dieses Fluorchrom interkaliert gezielt in doppelsträngiger DNA. Diese Methode besitzt allerdings neben einer hohen Sensitivität nur eine geringere Spezifität. Letztgenannte kann jedoch durch eine anschließende sog. Schmelzkurvenanalyse überprüft werden (bei unspezifischen PCR-Produkten oder Primerdimeren gibt es mehrere Peaks).

Man unterscheidet weiterhin bei der qRT-PCR zwischen einer absoluten und einer relativen Quantifizierung [Pfaffl, 2004]. Die Absolute erfolgt durch einen Vergleich mit Standards des Zielgens in verschiedenen Verdünnungen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines sog. "House Keeping Genes" (ubiquitär und homogen exprimiertes Gen) normalisiert und auf eine Kontrollprobe/Kalibrator bezogen (dessen Expression wird auf 1 bzw. 100% gesetzt). Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgt mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Den Amplifikations-Zyklus, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, bezeichnet man als CT-Wert ("*Threshold Cycle*" = "Schwellenwert-Zyklus"). Zur Normalisierung werden die CT-Werte von Referenzund Zielgen voneinander abgezogen.

$$\Delta CT = CT \ Zielgen - CT \ Referenzgen$$

Die ΔCT-Werte der Kontrolle und der Proben werden in einem nächsten Schritt voneinander abgezogen.

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT \ Probe - \Delta CT \ Kontrolle$$

Um die relative Quantifizierung (RQ), bzw. die n-fache Expression zu bekommen wird die Effizienz-korrigierte (idealisierte Annahme, dass jeder Zyklus zu einer Verdopplung des PCR-Produktes führt) $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel benutzt.

$$RQ = \frac{\left(E_{Zielgen}\right)^{\Delta CT}_{Zielgen \, (Kontrolle - Probe)}}{\left(E_{Referenzgen}\right)^{\Delta CT}_{Referenzgen \, (Kontrolle - Probe)}}$$

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine qRT-PCR mit TaqMan™-Assays von Applied Biosystems durchgeführt, um die Expression von PMCA1, SERCA2 und SERCA3 in den unterschiedlichen Prostata-Zelllinien vor und nach Androgen-Behandlung zu untersuchen.

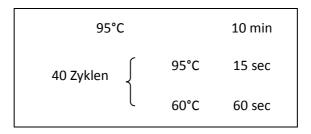
Die Analyse wurde mit 10 ng cDNA der jeweiligen Zellen sowie der Kontrolle (PMCA1: ZNS; SERCA2/3: Muskel) in 96-Wellplatten als Triplikate durchgeführt. Das Experiment wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die qRT-PCR wurde in einem StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System sowie mit der entsprechenden StepOne Software Version 2.3 von Applied Biosystems der durchgeführt. Es wurde eine relative Quantifizierung mittels ΔΔCT-Methode vorgenommen. Die PCR erfolgte mit den TaqMan®-Assays Hs00155949_m1 (PMCA1), Hs00544877_m1 (SERCA2), Hs01024558_m1 (SERCA3) sowie zum 18s rRNA Nachweis (als endogene Kontrolle) Katalognummer 4319413E und TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix. PCR-Ansatz und -Protokoll wurde gemäß Hersteller-Empfehlung durchgeführt (Tab. 12 - 13).

Tabelle 12: Ansatz für qRT-PCR

Ansatz für eine Reaktion

Fast Universal Master Mix	10 μΙ
TaqMan™-Assay	1 μΙ
cDNA in H₂0	9 μΙ
Gesamtvolumen	20 μΙ

Tabelle 13: qRT-PCR Protokoll



3.8.8 Fluoreszenz-Zytochemie

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Zytochemie lassen sich intrazelluläre Proteine sehr gut markieren. Dabei absorbieren Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes (Fluorochrom) Licht bestimmter Wellenlänge und werden so auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn diese Elektronen wieder auf das ursprüngliche Energieniveau zurückfallen, wird Licht emittiert - allerdings mit einer größeren Wellenlänge als die des Anregungslichtes. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Fluorochrome DAPI und Bodipy® benutzt. DAPI ist ein spezifischer Fluoreszenzstoff der DNA markiert, also zu einer Kernfärbung führt. Es besitzt ein Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich von

358 nm (ultraviolett) und ein Emissionsmaximum bei 461 nm (blau). DAPI lagert sich vornehmlich in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA an A-T reiche Regionen [Kapuscinski, 1995]. Es bindet zwar auch an andere Regionen doppelsträngiger DNA, allerdings ist Fluoreszenz hier nur sehr schwach ausgeprägt. BODIPY® TR-X Thapsigargin ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der im roten Wellenlängenbereich Licht emittiert und durch die Bindung an Thapsigargin spezifisch die SERCA markiert. Sein Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum findet sich bei 588 nm bzw. 621 nm.

Die auf Glasplättchen gezüchteten Zellen wurden für die Markierung in eine Attofluor® cell chamber eingespannt. Absolutes Ethanol wurde 20 min bei -20°C für die Fixierung gekühlt. Die Zellen wurden nach einem Waschschritt mit PBS mit dem gekühlten Ethanol bedeckt und bei 4°C für 15 min inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1 µM BODIPY® TR-X Thapsigargin und 3 µl/ml Pluronic bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen und mit DAPI in PBS in einer Verdünnung von 1:1000 über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Kernfärbung konnte das Plättchen nach erneutem Waschen mit dem Laserscanning System, Eclipse TE2000-E Invertoskop mikroskopiert werden. Die Anregung erfolgte mittels Argonlaser. Dabei erfolgte mit Hilfe der Software EZ-C1 3.40 eine Farbstoff-spezifische Anregung und Detektion. In Adobe Photoshop CS4 Extended wurden die Fluoreszenzbilder weiter bearbeitet, um so eine Co-Lokalisation von Bodipy- und DAPI-Signalen sichtbar zu machen.

3.9 Berechnung der [Ca²⁺]_i-Clearance und Statistische Auswertung

Um die [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate in Abhängigkeit von der jeweiligen [Ca²⁺]_i darstellen zu können, wurde mit Hilfe von Sigma Plot Version 12.0 die 1. Ableitung der einzelnen Messungen gebildet. Die so errechneten Clearance-Raten konnten dann in Beziehung zu den gemessen [Ca²⁺]_i-Werten dargestellt werden. Jede [Ca²⁺]_i-Messung erfolgte mit 1 Hz. Dadurch ergab sich zwangsläufig eine diskontinuierliche

Darstellung des [Ca²⁺]_i-Verlaufs. Diese Tatsache führte dazu, dass eine errechnete Clearance für den beobachteten [Ca²⁺]_i-Bereich nicht für alle Punkte mit Standardfehler angegeben werden konnte, sondern nur näherungsweise dargestellt sind. Daher konnte beim Vergleich der Clearance-Raten in Abhängigkeit zur [Ca²⁺]_i keine statistische Testung auf Signifikanz erfolgen. Miteinander verglichen wurden jeweils die Clearance-Rate nach einem Drittel [Ca²⁺]_{i1t} und nach zwei Dritteln [Ca²⁺]_{i2t} des gesamten Ca²⁺-Abfalls nach Histamin-Stimulation.

Für die statistische Analyse der Genexpression wurde der t-Test für gepaarte Stichproben benutzt. Dieser parametrische Test prüft die Mittelwerte zweier Stichproben, die miteinander in Beziehung stehen, auf Gleichheit bzw. Ungleichheit. Es wurde die relative Genexpression mit der Software IBM SPSS Statistics Version 21 in der jeweiligen Zelllinie mit und ohne Androgeneinfluss auf Signifikanz untersucht. Ab einem Signifikanzniveau von p \leq 0,05 wurde die Nullhypothese verworfen. Diese besagt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten beider Stichproben bestehen. Je nach Signifikanzniveau sind die Abbildungen entsprechend mit einem p-Wert von \leq 0,05 mit * markiert, p \leq 0,01 mit ***, und p \leq 0,001 mit ***.

4 Ergebnisse

4.1 PC3-Zellen - Einzelinhibition

4.1.1 Kontroll-Stimulation an PC3-Zellen

Um sicherzustellen, dass eine wiederholte Histamin-Applikation einen annähernd gleichermaßen reproduzierbaren [Ca²⁺]_i-Anstieg verursacht, wurde vor den Inhibitionsversuchen ein Kontrollexperiment mit Histamin-Perifusion ohne anschließende Inhibitor-Gabe durchgeführt. gemittelter Graph Ein aller durchgeführten Einzelzellmessungen ist in Abbildung 10A zu sehen. Der Standardfehler liegt zwischen minimal ±7,4 nM und maximal ±23,5 nM - je nach Messzeitpunkt. Zu Beginn des Messprotokolles wurde die Zelle jeweils über 20 s mit HS pH 7,4 umspült. Dadurch waren physiologische extrazelluläre Bedingungen gegeben. Im Anschluss wurde die Zelle für 20 s mit 20 μM Histamin perifundiert. Dies führte zu einem raschen und reversiblen [Ca²⁺]_i-Anstieg von basal 40,5 nM (SE = \pm 7,4) auf 189,03 nM (SE = \pm 14,4). Diese Stimulation wurde so insgesamt dreimal durchgeführt. Zum Zeitpunkt 344 s und 644 s wurde ein [Ca²⁺]_i-Anstieg auf 203,15 nM (SE = $\pm 18,93$) bzw. auf 208,29 (SE = $\pm 17,4$) gemessen (Abb. 10D).Der Abfall der [Ca²⁺]_i nach allen drei Stimulationen verlief annähernd deckungsgleich (Abb. 10B).

Die Clearance-Raten wurden über die erste Ableitung aus den Mittelwerten aller Einzelmessungen berechnet und sind in Abbildung 10C dargestellt. Es zeigte sich in PC3-Zellen ein geringer Abfall der Clearance-Raten in allen [Ca²+]_i-Bereichen nach wiederholter Stimulation. Verglichen wurden eine höhere [Ca²+]_i und eine niedrigere [Ca²+]_i. An dieser Stelle und im Folgenden wird die Clearance-Rate nach einem Drittel [Ca²+]_{i1t} und nach zwei Dritteln [Ca²+]_{i2t} des gesamten Ca²+-Abfalls nach Histamin-Stimulation miteinander verglichen. Bei [Ca²+]_{i1t} bertugen die Clearance-Raten -19,6 nM/s (1. Stimulus), -20,3 nM/s (2. Stimulus) und -18,1 nM/s (3. Stimulus). Bei [Ca²+]_{i2t} lagen die Clearance-Raten bei -12,3 nM/s (1. Stimulus), -10,9 nM/s (2. Stimulus) und -11,6 nM/s (3. Stimulus).

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ lag nach allen drei Stimulationen zwischen 41,8 nM (SE = \pm 7,6) und 48,8 nM (SE = \pm 8,6). Sowohl Clearance-Rate als auch basale $[Ca^{2+}]_i$ zeigten im Vergleich der drei Kontrollstimuli keine Unterschiede.

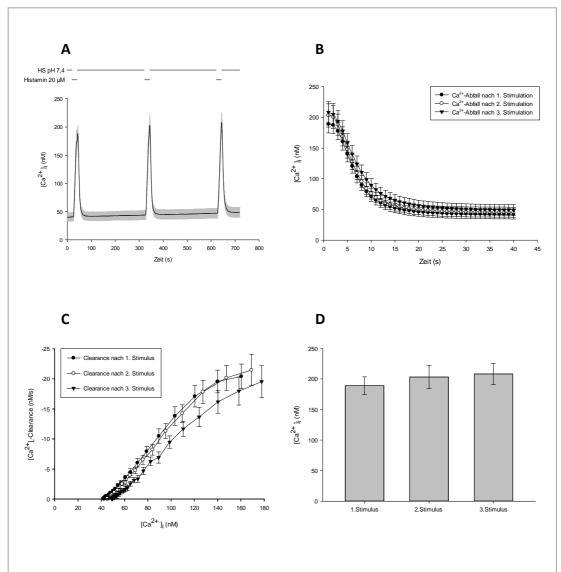


Abbildung 10: FURA-Messung: Kontroll-Stimulation von PC3-Zellen mit 20 μM Histamin.

A: Gemittelter Graph (n=29 Zellen) mit SE. **B:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Abfall mit SE nach 1., 2. und 3. Stimulation. **C:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=29 Zellen). Schwächere Clearance nach 3. Stimulation in allen $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Bereichen. **D:** Gemittelte maximale Stimulation mit SE nach 1. Stimulation (189,03 nM, SE = $\pm 14,4$), 2. Stimulation (203,15 nM, SE = $\pm 18,93$) und 3. Stimulation (208,29, SE = $\pm 17,4$) mit 20 μ M Histamin (n=29 Zellen).

4.1.2 PMCA-Inhibition an PC3-Zellen

Um die PMCA zu inhibieren, wurde die extrazelluläre Protonenkonzentration reduziert, da dieser Transporter neben dem Efflux von Ca²⁺ physiologischerweise den Influx von Protonen vermittelt. So führt eine erniedrigte Protonenkonzentration zu einer Inhibition der Ca²⁺-Transportkapazität. Dafür wurde ein HS Puffer mit einem alkalischen pH von 8,6 benutzt. Eine Einzelmessung ist exemplarisch in Abbildung 11A dargestellt. Nach einem Vorlauf von 20 s im physiologischen Milieu mit HS Puffer pH 7,4, wurde die Zelle 20 s mit 20 μM Histamin stimuliert. Diese Histamin-Stimulation erfolgte im Rahmen des Messprotokolles insgesamt dreimal. Die Clearance-Rate des ersten Kontroll-Stimulus wurde später zum Vergleich mit der Clearance-Rate des zweiten Stimulus unter Inhibition herangezogen. Nach 300 s Perifusion mit HS pH 7,4 wurde der zweite Stimulus gesetzt, mit dem Unterschied, dass die Zelle danach nicht mit HS pH 7,4 weiter umspült wurde, sondern mit HS pH 8,6. Nach einem Abfall der [Ca²⁺]_i erfolgte ein erneuter Anstieg, der sich schließlich auf einem Plateau von im Mittel 143,4 nM (SE = ±24,1) einpendelte (Abb. 11B). Das Plateau lag damit im Mittel um 97,9 nM höher als die basale [Ca²⁺]; der gemessenen Zellpopulation. Da das [Ca²⁺];-Plateau bei den Einzelmessungen nicht zu identischen Zeitpunkten erreicht wurde, sind die Mittelwerte der Messungen in Abbildung 11B nur bis zum Zeitpunkt 525 s dargestellt. Der Standardfehler dieses Mittelwertgraphen liegt im Verlauf der Messung zwischen minimal ±10,9 nM und maximal ±26,6 nM - je nach Messzeitpunkt. Im Bereich des Plateaus wurde die Zelle erneut mit HS pH 7,4 umspült. Dies führte zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf im Mittel 76,5 nM (SE = ±13,7). Nach weiteren 120 s wurde der dritte Stimulus gesetzt, um zu zeigen, dass die Zelle immer noch in einem physiologischen Rahmen auf Histamin reagiert. 90 s später erfolgte ein erneuter Wechsel von HS pH 7,4 zu HS pH 8,6 (Abb. 11A). Auch ohne vorangegangene Histamin-Stimulation kam es zu einem gleich hohen [Ca²⁺]_i-Anstieg wie nach Stimulation.

Die Clearance-Raten wurden durch die erste Ableitung der Mittelwerte der Einzelmessungen berechnet und sind in Abbildung 11D dargestellt. Es erfolgte ein Vergleich der Clearance-Raten nach einem Drittel $[Ca^{2+}]_{i1t}$ und nach zwei Dritteln $[Ca^{2+}]_{i2t}$ des gesamten Ca^{2+} -Abfalls nach Histamin-Stimulation. Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulus bei -16,6 nM/s und unter Inhibition bei -16,2 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulus bei -9,0 nM/s und unter Inhibition bei -7,2 nM/s.

Nach Kontroll-Stimulation wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ bei 49,8 nM (SE = ±11,3) wieder erreicht. Der Scheitelpunkt unter Inhibition, nach dem es die $[Ca^{2+}]_i$ nach dem Abfall wieder anstieg, lag bei 76,5 nM.

Die Umspülung von PC3-Zellen mit HS pH 8,6 führte zu einer deutlichen Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate im basalen Bereich. Die Ruhe-Konzentration wurde unter diesen Bedingungen nicht mehr erreicht.

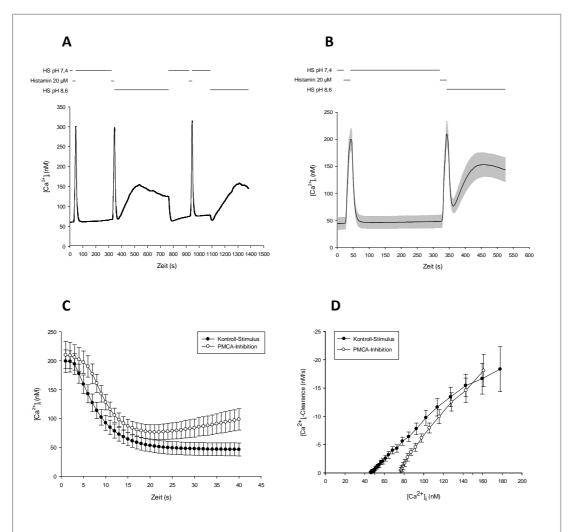


Abbildung 11: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an PC3-Zellen.

A: Einzelmessung: $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau nach 2.Stimulation unter HS pH 8,6 Umspülung bei 125,4 nM. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=26 Zellen). Plateau unter HS pH 8,6 bei 144 nM (SE = ±24,1). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter PMCA-Inhibition (n=26 Zellen). Größter Unterschied in $[Ca^{2+}]_i$ -Bereich < 80 nM. **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=26 Zellen). Deutliche langsamere Clearance < 120 nM $[Ca^{2+}]_i$ -

4.1.3 SERCA-Inhibition an PC3-Zellen

Die Inhibition der SERCA wurde mit Cyclopiazonsäure (CPA) durchgeführt, da diese magnesiumabhängig den konformationellen Status der Pumpe stabilisert, so dass keine Änderungen mehr möglich sind und die Pump-Aktivität blockiert ist. In Vorversuchen zeigte sich bei PC3-Zellen eine übermäßige [Ca²+]_i-Verschiebung, während die Zelle mit 15 μM CPA umspült wurde. Da es durch CPA-Applikation indirekt zu eine Entleerung des ER kommt, werden membranständige *store operated channels* aktiviert und es kommt zu einem Ca²+-Einstrom von extrazellulär. Dies führte bei den PC3-Zellen dazu, dass ein [Ca²+]_i-Anstieg über mehr als 550 s zu verzeichnen war. Weiterhin war es nicht mehr möglich, die Zelle mit Histamin zu stimulieren. Abbildung 12A zeigt einen gemittelten Graphen einer CPA-Applikation nach Histamin-Stimulation in Ca²+-haltigem Medium mit Standardfehler zwischen minimal ±7,53 nM und maximal ±51,24 nM - je nach Messzeitpunkt.

Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente zum Zeitpunkt der Stimulation, bzw. Inhibition, in Ca²⁺-freiem Puffer durchgeführt. Eine Einzelmessung ist in Abb. 12B dargestellt. Nach 10 s Vorlauf in Ca²⁺-haltigem HS pH 7,4 wurde die Zelle für den Verlauf der Kontroll-Stimulation mit Ca²⁺-freiem Puffer umspült. Eine Histamin-Stimulation der Zelle erfolgte zum Zeitpunkt 20 s und 620 s. Eine dritte Stimulation erfolgte erst zu einem späteren Zeitpunkt, der sich nach der Erholungsdauer der Zelle richtete. Um zu gewährleisten, dass CPA am ER zum Zeitpunkt der Stimulation in ausreichender Konzentration vorliegt, wurde die Perfusion mit CPA bereits 10 s vor dem Beginn der zweiten Histamin-Stimulation begonnen und weitergeführt bis wieder annähernd eine basale [Ca²⁺]_i von 16,1 nM erreicht war. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zelle wieder mit Ca²⁺-haltigem Puffer ohne CPA umspült. Nach einem erneutem [Ca²⁺]_i-Anstieg auf 83,5 nM und folgendem Abfall, wurde die Zelle zum dritten Mal mit Histamin stimuliert, um sicherzustellen, dass die Zelle noch reagiert. Hier stieg die [Ca²⁺]_i nur noch auf 113,26 nM an (Abb. 12B).

In der exemplarischen Messung (Abb. 12B) zeigte sich der zweite [Ca²⁺]_i-Anstieg mit 233,8 nM deutlich höher als der Kontroll-Stimulus mit 153,8 nM.

Dies kann auch am gemittelten Graphen abgelesen werden (Abb. 12C). Der $[Ca^{2+}]_{i-}$ Anstieg des Kontroll-Stimulus war im Mittel mit 142,3 nM (SE = ±14,1) geringer als der zweite Stimulus unter Inhibition mit im Mittel 236,7 nM (SE = ±20,7). Da die $[Ca^{2+}]_{i-}$ Verschiebungen beim Wechsel von Ca^{2+} -freien in Ca^{2+} -haltigen Puffer nicht immer das gleiche Ausmaß hatten, wird der gemittelte Graph nur bis zum Messpunkt 800 s gezeigt. Der Standardfehler der gemittelten Messungen liegt zwischen minimal ±5,6 nM und maximal ±21,96 nM - je nach Messzeitpunkt. Die basale $[Ca^{2+}]_{i-}$ lag bei im Mittel 25,26 nM (SE = ±5,66).

Es sind unter CPA-Inhibition deutlich zwei Phasen des [Ca²⁺]_i-Abfalles zu erkennen. Eine schnellere Phase in Konzentrationsbereichen > 150 nM und eine langsamere Phase unterhalb dieses [Ca²⁺]_i-Bereiches (Abb. 12D).

Die Clearance-Raten wurden wieder über die erste Ableitung aus den Mittelwerten der Messungen berechnet und sind in Abbildung 12E dargestellt. Unter 150 nM fand während der SERCA-Inhibition nur noch eine Clearance < -0,8 nM/s statt. Über 150 nM [Ca²⁺]_i war eine Clearance gegeben, die sich aber mit dem Kontroll-Stimulus nicht vergleichen ließ, da bei diesem keine so hohen [Ca²⁺]_i-Spiegel erreicht wurden.

Die Clearance-Rate unter SERCA-Inhibition zeigte sich insgesamt deutlich langsamer als die des Kontroll-Stimulus - vor allem in niedrigeren [Ca²⁺]_i-Bereichen.

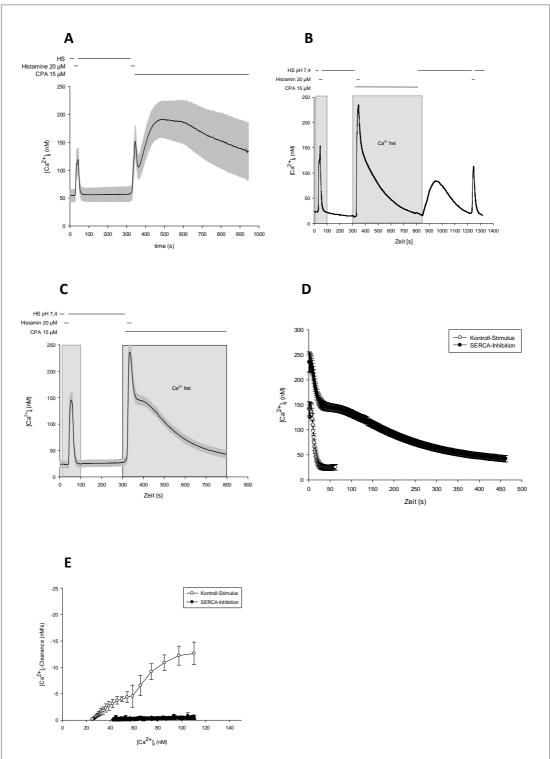


Abbildung 12: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an PC3-Zellen.

A: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an PC3-Zellen in Ca²⁺-haltigem Puffer – gemittelter Graph mit SE (n=7 Zellen). **B**: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an PC3-Zellen in Ca²⁺-freiem Puffer - Einzelmessung. **C**: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an PC3-Zellen – gemittelter Graph mit SE (n=29 Zellen). **D**: Gemittelter [Ca²⁺]₋-Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter SERCA-Inhibition (n=29 Zellen). **E**: Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=29 Zellen).

4.1.4 MCU-Inhibition an PC3-Zellen

Die Inhibition des MCU erfolgte mit dem Hemmstoff Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP). Ähnlich wie in den anderen Einzelinhibitions-Versuchen wurde auch hier die Zelle insgesamt dreimal mit 20 μ M Histamin stimuliert - nach jeweils 20 s, 320 s und 620 s. 10 s vor der zweiten Stimulation erfolgt bereits die Perifusion mit 2 μ M CCCP, um zu gewährleisten, dass CCCP zum Zeitpunkt der Stimulation in ausreichender Menge an den Mitochondrien vorliegt.

Eine Einzelmessung ist in Abbildung 13A dargestellt. Den gemittelten Graphen aller durchgeführten Messungen zeigt Abbildung 13B. Der Standfehler schwankt bei den gemittelten Messungen zwischen minimal $\pm 7,78$ nM und maximal $\pm 12,79$ nM - je nach Messzeitpunkt. Es wurde bis zum Zeitpunkt 540 s mit CCCP perifundiert. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine $[Ca^{2+}]_i$ von 51,51 nM, respektive mittlere $[Ca^{2+}]_i$ von 72,1 nM (SE = $\pm 11,23$). Im Anschluss erfolgte nach einer Umspülung mit HS pH 7,4 die dritte Histamin Stimulation. Es zeigte sich kein weiterer Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf die anfängliche Ruhe-Konzentration von 24,0 nM, respektive im Mittel 45,2 nM (SE = $\pm 7,8$) (Abb. 13C).

Die korrespondierenden Clearance-Raten nach Kontroll-Stimulus und unter Inhibition, berechnet aus den Mittelwerten, sind in Abbildung 13D dargestellt. Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate des Kontroll-Stimulus bei -9,0 nM, die des inhibierten Stimulus bei -1,6 nM. Unter 90 nM fand unter MCU-Inhibition nur noch eine Clearance < -0,8 nM/s statt.

Die Clearance-Rate unter MCU-Inhibition ist in den verglichenen [Ca²⁺]_i-Bereichen langsamer als die nach Kontroll-Stimulation. Die ursprüngliche Ruhe-Konzentration wurde nicht mehr erreicht.

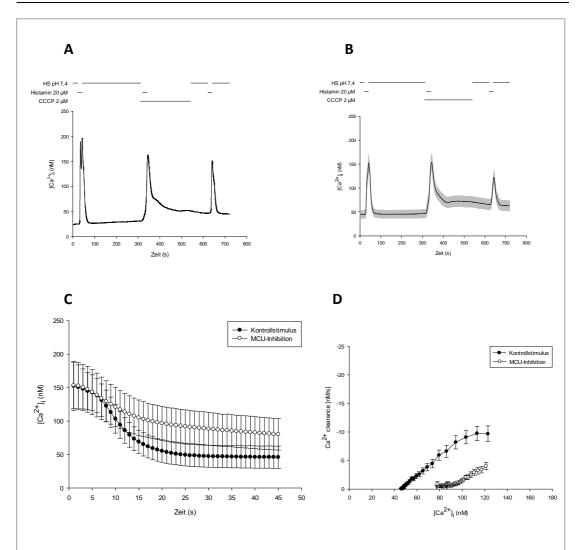


Abbildung 13: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an PC3-Zellen.

A: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an PC3-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=27 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\vec{i}}$ -Abfall nach Kontroll-Stimulus und unter MCU-Inhibition mit SE (n=27 Zellen). Die basale $[Ca^{2+}]_{\vec{i}}$ wird unter MCU-Inhibition nicht erreicht. **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=27 Zellen). Niedrigere Clearance-Werte unter MCU-Inhibition in allen verglichenen $[Ca^{2+}]_{\vec{i}}$ -Bereichen.

4.1.5 NCX-Inhibition an PC3-Zellen

Der NCX wurde durch Perifusion mit LiCL-Puffer gehemmt. Es erfolgten insgesamt – standardisiert – drei Stimulationen mit 20 μ M Histamin im Abstand von 300 s. Direkt nach der zweiten Stimulation wurde die Zelle mit LiCl-Puffer umspült. Nachdem sich nach 480 s eine stabile $[{\rm Ca}^{2+}]_i$ bei im Mittel 47,69 nM (SE = ± 5 ,44) eingestellt hatte, wurde die Zelle wieder mit HS pH 7,4 perifundiert. Ein erneuter Stimulus wurde nach insgesamt 620 s gesetzt. Das Protokoll einer Einzelmessung ist in Abbildung 14A dargestellt. Der in Abbildung 14B gezeigte Graph wurde aus den Mittelwerten von insgesamt 28 Einzelmessungen erstellt. Der Standardfehler lag – je nach Messzeitpunkt – zwischen minimal ± 4 ,13 nM und maximal ± 19 ,38 nM.

Der Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ nach Kontroll-Stimulation und unter NCX-Inhibition unterschieden sich nur im basalen Bereich (Abb. 14C). Die Ruhe-Konzentration betrug nach Kontroll-Stimulation 26,1 nM (bzw. im Mittel 40,96 nM, SE = \pm 4,46), unter NCX-Inhibition 29,8 nM (bzw. im Mittel 47,46 nM, SE = \pm 5,18).

Die Clearance-Raten nach Kontroll-Stimulation und unter NCX-Inhibition wurden bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ und $[Ca^{2+}]_{i2t}$ miteinander verglichen(Abb. 14D). Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ zeigten sich nach Kontroll-Stimulation eine Clearance-Rate von -7,3 nM/s, unter NCX-Inhibition betrug diese -4,7 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ betrug die Clearance-Rate des Kontroll-Stimulus -3,9 nM/s und unter Inhibition -2,4 nM/s.

Der [Ca²⁺]_i-Abfall unter NCX-Inhibition verlief annähernd deckungsgleich. Die errechneten Clearance-Raten unter NCX-Inhibition lagen wenige Einheiten unter den Clearance-Raten nach Kontroll-Stimulation. Die basale [Ca²⁺]_i war unter Inhibitions-Bedingungen um 6,5 nM höher als unter Standardbedingungen.

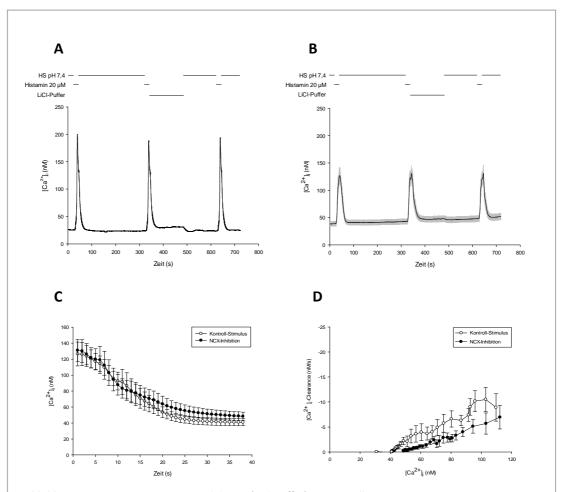


Abbildung 14: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCl-Puffer) an PC3-Zellen.

A: NCX-Inhibition an PC3-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=28 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{i}$ -Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter NCX-Inhibition (n=28 Zellen). Basale $[Ca^{2+}]_{i}$ unter NCX-Inhibition 6,5 nM höher als nach Kontroll-Stimulation. **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=28 Zellen). Clearance-Werte unter NCX-Inhibition marginal geringer.

4.2 PC3-Zellen – Kombinierte Inhibition

Um die Anteile unterschiedlicher Clearance-Mechanismen zu untersuchen, wurden mit jeder Zelllinie Messungen mit verschiedenen Inhibitoren, die bereits in der Einzelinhibition einen größeren Effekt auf die Clearance-Fähigkeit der Zellen gezeigt hatten. In den folgenden Kapiteln sind die kombinierten Inhibitions-Versuche an PC3-Zellen näher dargestellt.

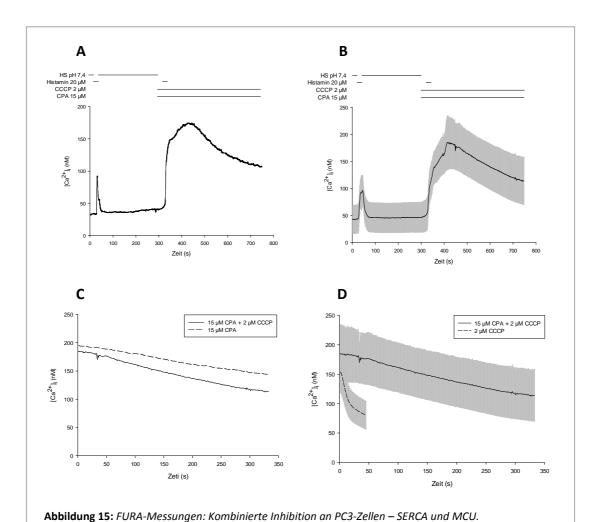
4.2.1 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und MCU

Um die Bedeutung von SERCA und MCU für die Ca^{2+} -Homöostase von PC3-Zellen darzustellen, wurde die Zelle in der Einzelmessung mit 15 μ M CPA und 2 μ M CCCP umspült. 300 s nach der Kontroll-Stimulation mit 20 μ M Histamin wurde ein zweites Mal mit Histamin stimuliert. Allerdings wurde die Zelle bereits 10 s vor Histamin-Gabe mit den beiden intrazellulär wirksamen Inhibitoren umspült. Nach Histamin-Stimulation und während Inhibitor-Applikation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ in der Zelle weiter an auf einen maximalen Wert von im Mittel 141,27 nM (SE = $\pm 43,88$) und fiel im weiteren Verlauf wieder langsam ab (Abb. 15A, B). Die Standardfehler der einzelnen gemittelten Messwerte schwankt im Verlauf der Messung zwischen minimal $\pm 28,81$ nM und maximal $\pm 49,79$ nM.

In einzelnen Messungen wurde nach 7 min Inhibitor-Gabe annähernd ein [Ca²⁺]_i-Plateau erreicht, in anderen Messungen dagegen zeigte sich nach dieser Zeit immer noch eine tendenziell sinkende [Ca²⁺]_i. Aufgrund der phototoxischen Wirkung von FURA-2-AM in Kombination mit den Inhibitoren – insbesondere mit dem irreversibel wirksamen CCCP – wurde die Messung nur über insgesamt 750 s durchgeführt und auf eine dritte Stimulation wurde verzichtet.

Die $[Ca^{2+}]_i$ unter Perifusion mit 15 μ M CPA in Ca^{2+} -haltigem Puffer (Abb. 12A) lag im gesamten Verlauf zwischen 9,74 nM und 28,11 nM über der $[Ca^{2+}]_i$ unter kombinierter Umspülung mit 15 μ M CPA und 2 μ M CCCP (Abb. 15C).

Während die [Ca²⁺]_i unter alleiniger CCCP-Applikation (Abb.) innerhalb von 45 s auf eine [Ca²⁺]_i, welche 26,9 nM über der Ruhe-Konzentration lag, abfiel, kam es unter kombinierte Inhibition mit CCCP und CPA zu einem verzögerten [Ca²⁺]_i-Abfall über 330 s. Auch nach dieser Zeit lag die [Ca²⁺]_i noch 68,97 nM über der ursprünglichen Ruhe-[Ca²⁺]_i der Versuchsreihe (Abb. 15D).



A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=8 Zellen). $[Ca^{2+}]_i$ bleibt nach 330 s Inhibitor-Gabe 68,97 nM über der basalen $[Ca^{2+}]_i$. **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall nach Histamin-Stimulation unter CPA-Perifusion versus Perifusion mit CPA und CCCP. Niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ unter kombinierter Inhibition. **D:** Gemittelter

 $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter CCCP-Perifusion versus Perifusion mit CPA und CCCP. Langsamer $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall unter kombinierter Inhibition.

4.2.2 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und PMCA

Bei der kombinierten Inhibition von SERCA und PMCA wurden gleichzeitig 15 μ M CPA und HS pH 8,6 auf die Zelle gegeben. Dabei wurde die CPA-Perifusion schon 10 s vor dem zweiten Stimulus gestartet. Mit der HS pH 8,6 Perifusion wurde erst im Anschluss an die Histamin-Applikation begonnen. Die gemittelten Messwerte sind in Abbildung 16A dargestellt. Der Standardfehler der einzelnen Messwerte schwankt - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal $\pm 5,44$ nM und maximal $\pm 61,8$ nM. Unter der kombinierten Inhibitor-Gabe zeigte sich ein massiver $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Dabei verlief dieser Anstieg zweiphasig. Im den ersten 54 s stieg die $[Ca^{2+}]_i$ sehr rasch und fast linear an und ging dann in eine exponentielle Phase über. Der Scheitelpunkt lag dabei im Mittel bei 239,32 nM (SE = $\pm 40,56$). Daraufhin kam es bis zum Ende der Messungen zu, weiteren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Eine maximale $[Ca^{2+}]_i$ war zum Ende der Messungen zum Zeitpunkt 600 s bei 291,56 nM (SE = $\pm 71,3$) erreicht.

Bei alleiniger Perifusion mit HS pH 8,6 ließ sich ein Abfall der [Ca²⁺]_i bis zu einem [Ca²⁺]_i-Plateau 97,9 nM über der Ruhe-Konzentration erkennen (Abb. 16C). Dagegen zeigte sich bei kombinierter Inhibitor-Gabe kein [Ca²⁺]_i-Abfall mehr. Die [Ca²⁺]_i stieg kontinuierlich an: anfangs steil, später flacher. Die maximale [Ca²⁺]_i unter kombinierte Inhibition zum Ende der Messung lag 286,86 nM höher als die Ruhe-Konzentration in den gemessenen Zellen.

Im Vergleich mit den Einzelinhibitionen zeigten sich große Unterschiede. Bei alleiniger SERCA-Inhibition in Ca²⁺-haltigem Puffer stieg die [Ca²⁺]_i zwar leicht an, aber sank dann kontinuierlich ab (Abb. 16D). Unter kombinierter Inhibition wurden durchschnittlich höhere [Ca²⁺]_i erreicht: maximal 103,55 nM höher als unter alleiniger CPA-Gabe.

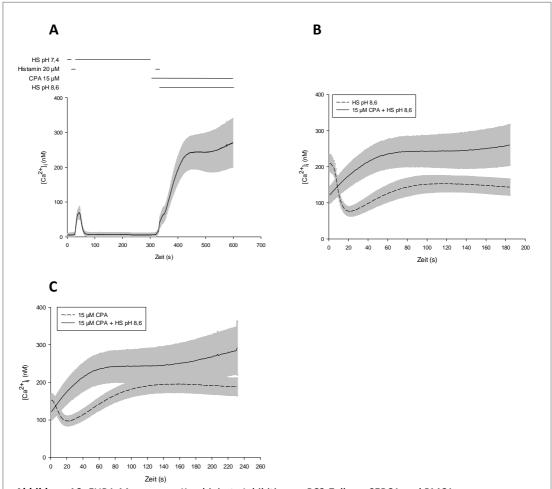


Abbildung 16: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA und PMCA.

A: Gemittelter Graph mit SE (n=8 Zellen). **B:** Gemittelter $[Ca^{2^+}]_{\Gamma}$ Anstieg mit SE nach Histamin-Stimulation unter HS pH 8,6 Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Höhere $[Ca^{2^+}]_i$ unter kombinierter Inhibition. **C:** Gemittelter $[Ca^{2^+}]_{\Gamma}$ Anstieg mit SE nach Histamin-Stimulation unter CPA-Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Höhere $[Ca^{2^+}]_i$ unter kombinierter Inhibition.

4.2.3 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – PMCA und MCU

Um bei PC3-Zellen eine kombinierte Inhibition von PMCA und MCU durchführen zu können, wurden auch die Messprotokolle der Einzelinhibitionen entsprechend kombiniert. Es wurden zwei Histamin-Stimuli gesetzt. 300 s nach der ersten Kontroll-Stimulation mit 10 µM Histamin (Zeitpunkt 20 s) erfolgte die zweite Histamin-Perifusion. 10 s zuvor wurde die Zelle bereits mit 2 μM CCCP umspült. Im Anschluss an die zweite Histamin-Stimulation wurde die Zelle zusätzlich mit HS pH 8,6 perifundiert. Sowohl in der dargestellten Einzelmessung (Abb. 17A) als auch im gemittelten Graphen (Abb. 17B) zeigte sich während der kombinierten Inhibition erst ein Abfall der [Ca²⁺]_i von 138,6 nM auf 90,52 nM, bzw. im Mittel von 64,2 nM (SE = ± 15.5) auf 57.1 nM (SE = ± 10.5). Daraufhin stieg die [Ca²⁺]_i wieder an, auf Werte von 185,3 nM bzw. im Mittel 149,2 nM (SE = ±14,9). Nach einem leichten Absinken pendelte sich die [Ca²⁺]_i annähernd auf einem Plateau ein. Dieses lag 88,2 nM über der Ruhe-Konzentration im exemplarischen Graphen, bzw. im Mittel 111,2 nM darüber. Der Standardfehler der gemittelten Messungen schwankt im Verlauf der Messung zwischen minimal ±8,58 nM und maximal ±22,9 nM - je nach Messzeitpunkt.

Unter kombinierter Inhibition lag die [Ca²⁺]_i insgesamt deutliche höher als bei alleiniger CCCP-Perifusion: im Mittel um maximal 77,87 nM höher (Abb. 17C).

Unter HS pH 8,6 wurde 184 s nach Histamin-Stimulation ein $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau bei 143,4 nM (SE = $\pm 21,85$) erreicht, während unter kombinierter Inhibition das $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau erst nach 255 s erreicht war (Abb. 17D). Die $[Ca^{2+}]_i$ lag zu diesem Zeitpunkt bei 112,65 nM (SE = $\pm 19,5$).

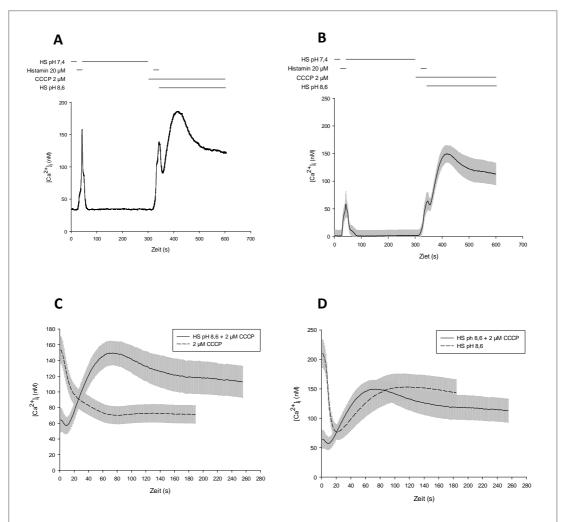


Abbildung 17: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – PMCA und MCU.

A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=7 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter Perifusion mit CCCP versus Perifusion mit CCCP in HS pH 8,6. Geringere Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$ bei kombinierter Inhibition. $[Ca^{2+}]_i$ höher als unter kombinierter Inhibition. **D:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter Perifusion mit HS pH 8,6 versus Perifusion mit CCCP in HS pH 8,6. Geringere Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$ bei kombinierter Inhibition. $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Plateau unter kombinierter Inhibition 30,75 nM niedriger als unter alleiniger PMCA-Inhibition.

4.2.4 Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA, PMCA und MCU

Bei der kombinierten Inhibition von PMCA, SERCA und MCU in PC3-Zellen wurden 2 μ M CCCP, 15 μ M CPA und HS pH 8,6 gleichzeitig eingesetzt. Es wurden zwei Stimulationen mit 10 μ M Histamin im Verlauf der Messung durchgeführt. 300 s nach dem standardisierten Kontroll-Stimulus (Zeitpunkt 20s) erfolgte die zweite Histamin-Perifusion. Beide Inhibitoren mit intrazellulärem Wirkungsort, wurden wie in den vorangegangenen Messprotokollen der Einzelinhibitionen bereits 10 s vor Stimulation appliziert. Die Perifusion mit HS pH 8,6 wurde direkt nach Ende der zweiten Histamin-Stimulation begonnen.

Es zeigte sich unter kombinierter Inhibition in einzelnen Messungen ein inkompletter Verlust der Ca^{2+} -Homöostase auf maximale Werte von 446,23 nM zum letzten Messzeitpunkt bei 566 s (Abb. 18A). Im Mittel erreichte die $[Ca^{2+}]_i$ jedoch nach einem ersten Abfall auf 87 nM (SE = $\pm 10,2$) ein Plateau bei 174,9 nM (SE = $\pm 25,2$) (Abb. 18B). Dieses $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau lag im Mittel 139,8 nM höher als die Ruhe-Konzentration der untersuchten Zellen. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte variiert je nach Messzeitpunkt zwischen $\pm 9,67$ nM und maximal $\pm 39,68$ nM.

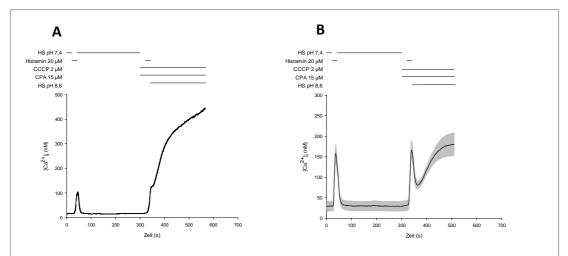


Abbildung 18: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an PC3-Zellen – SERCA, PMCA und MCU.

A: Einzelmessung. $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Anstieg unter kombinierter Inhibition maximal 446,23 nM zum letzten Messzeitpunkt. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=7 Zellen). $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Plateau bei 174,9 nM (SE = ±25,2) unter kombinierter Inhibition.

4.3 PC3-Zellen - Inhibition nach Androgen-Stimulation

Um die Aktivität der verschiedenen Ca²⁺-Clearance-Mechanismen in Abhängigkeit von Androgenen in PC3-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in der folgenden Versuchsreihe 72 h Stunden vor den FURA-Messungen mit 100 nM Dihydrotestosteron inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Androgendeprivierte PC3-Zellpopulation, die über 72 h in Medium kultiviert wurde, welches mit Aktivkohle-behandeltem FKS hergestellt wurde und damit Steroid-frei war.

4.3.1 PMCA-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation

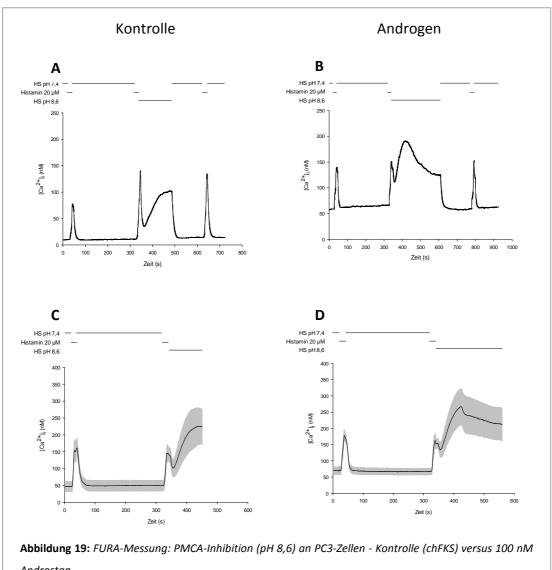
Nach 72-stündiger Dihydrotestosteron-Inkubation wurde eine PMCA-Inhibition mit HS pH 8,6 nach dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Sowohl bei den Androgen-stimulierten Zellen (Abb. 19B, D) als auch bei den Kontrollzellen (Abb. 19A, C) stellte sich unter Perifusion mit HS pH 8,6 ein [Ca²⁺]_i-Plateau ein. Die Abbildungen 19A und B zeigen Einzelmessungen, während in den Abbildungen 19C und D die entsprechenden Mittelwertgraphen zu finden sind. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte in der Androgen-Gruppe schwankt zwischen minimal ±9,3 nM und maximal ±57,2 nM - je nach Messzeitpunkt. In der Kontroll-Gruppe variiert er zwischen minimal ±14,7 nM und maximal ±59,6 nM.

Bei den Androgen deprivierten Kontrollzellen kam es nach Beginn der HS pH 8,6 Perifusion erst zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf 36,18 nM, bzw. im Mittel auf 101,6 nM (SE = ±26,5) (Abb. 19A, C). Ebenso verhielt es sich auch mit der $[Ca^{2+}]_i$ nach Histamin-Stimulation in der Androgen-Gruppe. Die $[Ca^{2+}]_i$ sank auf 110,96 nM, bzw. im Mittel auf 133,7 nM (SE = ±23,18) ab (Abb. 19B, D). Im weiteren Messverlauf zeigte sich bei beiden Zellpopulationen ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bis zu einem Plateau. In einzelnen Messungen wurde direkt ein Plateau erreicht (Abb. 19A). Andere Messungen zeigten nach einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg erst einen leichten Abfall, bevor sich die $[Ca^{2+}]_i$ auf einem Plateau einpendelte. Im Mittel stellte sich bei beiden untersuchten Gruppen ein $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau ein, das höher lag als die Reaktion auf den

vorangegangenen Histamin-Stimulus. In der Kontroll-Gruppe lag dieses bei im Mittel 223,4 nM (SE = ±50,3) und damit 175,2 nM über der Ruhe-Konzentration der Zellen. In der Androgen-Gruppe lag das Plateau bei im Mittel 212,7 nM (SE = $\pm 49,7$), bzw. um 145,5 nM höher als die basale [Ca²⁺]_i.

Eine 72-stündige Inkubation mit Dihydrotestosteron zeigte nur geringfügige Unterschiede in der Reaktion auf HS pH 8,6 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Bei beiden Gruppen wurde ein [Ca²⁺]_i-Plateau erreicht. Dieses lag in der Kontroll-Population 10,7 nM höher als in der Androgen-Gruppe.



A: Einzelmessung - Kontrolle: chFKS. B: Einzelmessung - 100 nM Androstan. C: Gemittelter Graph mit SE – Kontrolle chFKS (n=8 Zellen). $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Plateau bei 223,4 nM (SE = ±50,3). **D:** Gemittelter Graph mit SE – 100 nM Androstan (n=8 Zellen). $[Ca^{2+}]_{\bar{i}}$ Plateau bei 212,7 nM (SE = ±49,7).

4.3.2 SERCA-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation

Nach 72-stündiger Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron, bzw. in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FKS wurden FURA-Messungen mit 15 μ M CPA an PC3-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen insgesamt zweimal im Abstand von 300 s mit 10 μ M Histamin umspült. Die Histamin-Applikation erfolgte wie unter 4.1.3 in Ca²⁺-freiem Puffer. Die Perifusion mit Ca²⁺-freiem Puffer wurde bereits 20 s vor der Histamin-Stimulation begonnen. 10 s vor der zweiten Stimulation wurde die Zelle weiterhin mit 15 μ M CPA umspült.

Die Abbildungen 20A und B zeigen Einzelmessungen, während in den Abbildungen 20C und D die entsprechenden Mittelwertgraphen zu finden sind. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte in der Androgen-Gruppe schwankt zwischen minimal ±11,5 nM und maximal ±21,5 nM - je nach Messzeitpunkt. In der Kontroll-Gruppe variiert er zwischen minimal ±9,8 nM und maximal ±31,76 nM.

Unter Inhibitions-Bedingungen sank die $[Ca^{2+}]_i$ sowohl in der Kontroll-Gruppe (Abb. 120A, C) als auch in der Androgen-Gruppe (Abb. 20B, D) ab. In beiden Gruppen gab es anfangs im höheren $[Ca^{2+}]_i$ -Bereich einen steileren Abfall, während sich die $[Ca^{2+}]_i$ danach asymptotisch der Ruhe-Konzentration annäherte Der steilere Abfall zeigte sich in der Kontroll-Gruppe zwischen im Mittel 120,1 nM (SE = ±31,5) und 79,8 nM (SE = ±25,9). In der Androgen-Gruppe lag dieser steilere Abfall zwischen 97,8 nM (SE = ±17,9) und 47,1 nM (SE = ±17,5).

Vergleicht man den gemittelten [Ca²⁺]_i-Abfall beider Zellpopulationen miteinander, so ist auffällig, dass die Kurven unter einer [Ca²⁺]_i von 67 nM beinahe deckungsgleich verlaufen (Abb. 20E).

Die Clearance-Raten der beiden Zell-Gruppen wurden bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ und $[Ca^{2+}]_{i2t}$ miteinander verglichen (Abb. 20F). Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate der Kontroll-Zellen bei -0,6 nM/s, während die der Androgen-Gruppe bei -4,1 nM/s lag. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lagen die Clearance-Raten beider Gruppen <0,6 nM/s.

Die Behandlung der PC3-Zellen mit 100 nM Dihydrotestosteron über 72 h führte in Ca^{2+-} freiem Puffer bei einer Perifusion mit 15 μ M CPA zu einem $[Ca^{2+}]_{i^-}$ Abfall. Sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der Androgen-Gruppe näherte sich die $[Ca^{2+}]_{i}$ asymptotisch an ihren basalen Ausgangswert. Es zeigte sich bei den Androgen-behandelten Zellen in $[Ca^{2+}]_{i^-}$ Bereichen \geq 50 nM eine stärkere Clearance-Leistung.

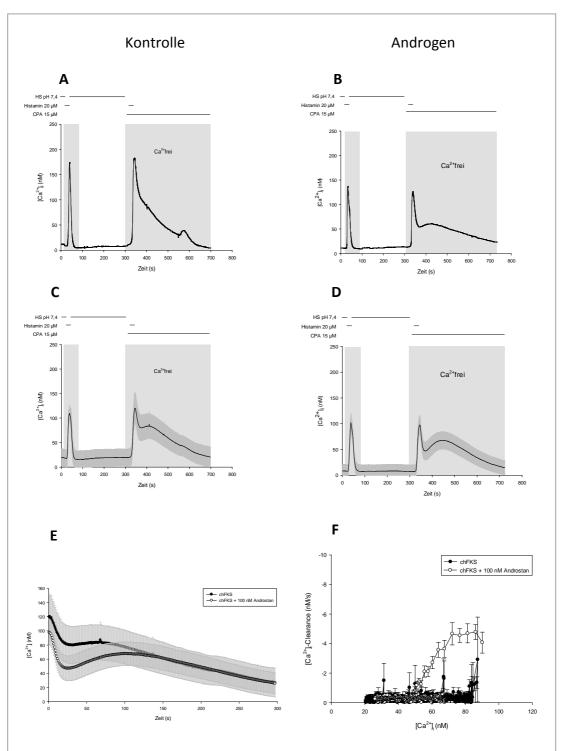


Abbildung 20: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an PC3-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Einzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph mit SE – Kontrolle chFKS (n=7 Zellen). **D:** Gemittelter Graph mit SE – 100 nM Androstan (n=10 Zellen). **E:** Gemittelter [Ca^{2+}]_i-Abfall mit SE unter SERCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. **G:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE unter SERCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. Effektivere Clearance in Androstan-Gruppe bei [Ca^{2+}]_{$i \ge 50$ nM.}

4.3.3 MCU-Inhibition an PC3-Zellen nach Androgen-Stimulation

Die Inhibition des MCU wurde nach demselben Protokoll wie unter 4.1.4 dargestellt mit 2 μ M CCCP sowohl an Dihydrotestosteron-stimulierten PC3-Zellen als auch an der Kontroll-Population durchgeführt.

Wie bereits zuvor beschrieben wurde auch in dieser Versuchsreihe die CCCP-Perifusion 10 s vor Histamin-Stimulation begonnen und weitergeführt bis annähernd die basale [Ca²+]_i wieder erreicht wurde. Abbildungen 21A und B zeigen exemplarische Graphen der Versuchsreihe. Abbildung 21A zeigt die Kontrolle, welche in Aktivkohle-behandeltem Medium wuchs und B die Zellpopulation, die über 72 h in Aktivkohle-behandeltem Medium mit 100 nM Dihydrotestosteron inkubiert wurde. In Abbildung 21C und D sind die zugehörigen Mittelwertgraphen bis zum Messzeitpunkt 450 s dargestellt. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte der Androgen-Gruppe schwankt zwischen minimal ±4,2 nM und maximal ±18,7 nM. In den Kontroll-Messungen schwankt er zwischen minimal ±4,2 nM und maximal ±26,2 nM.

Die Clearance-Raten der beiden Zell-Gruppen wurden bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ und $[Ca^{2+}]_{i2t}$ miteinander verglichen (Abb. 21F). Die Clearance-Rate der Androgen-behandelten Zellen lag bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ bei -2,9 nM/s, während die Kontroll-Gruppe bei -3,1 nM/s lag. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate der Androgen-Gruppe bei -1,2 nM/s, die der Kontroll-Zellen bei -0,9 nM/s.

Die Clearance-Raten der beiden Zellgruppen waren annähernd gleich.

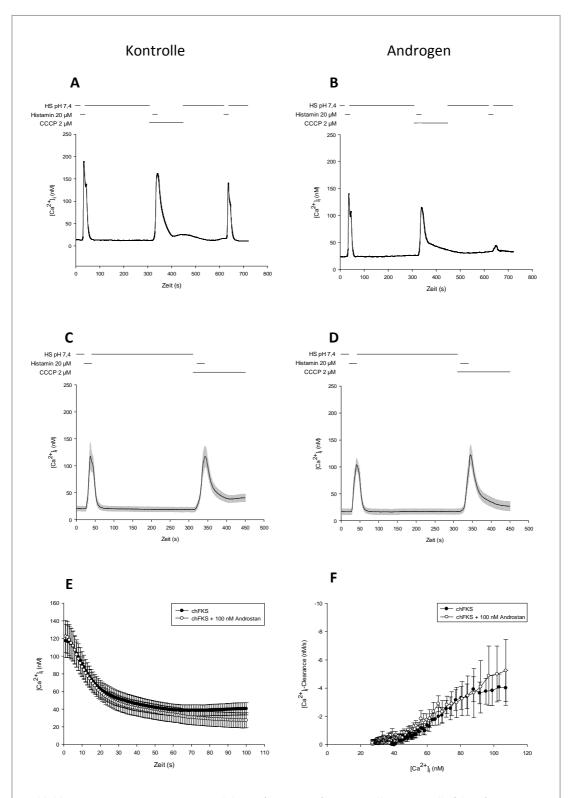


Abbildung 21: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an PC3-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Einzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph mit SE – Kontrolle: chFKS (n=7 Zellen). **D:** Gemittelter Graph mit SE – 100 nM Androstan (n=10 Zellen). **E:** Gemittelter [Ca^{2+}]_r-Abfall mit SE unter MCU-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. **F:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE unter MCU-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan.

4.4 PC3-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung

Die Stimulation mit 20 μ M Histamin führte in PC3-Zellen zu einem reproduzierbaren reversiblen [Ca²⁺]_i-Anstieg.

Die Inhibition von PMCA und SERCA hatte den größten Einfluss auf den Ca²⁺-Haushalt in PC3-Zellen. Die [Ca²⁺]_i-Homöostase konnte unter PMCA-Inhibition nicht mehr Aufrechterhalten werden. Auch unter SERCA-Inhibition zeigte sich die Clearance-Rate im gesamten untersuchten [Ca²⁺]_i-Bereich deutlich langsamer als nach Kontroll-Stimulation. Gleichermaßen zeigte sich unter MCU-Inhibition sich eine Einschränkung der Clearance-Rate, während eine NCX-Inhibition nur einen minimalen Einfluss auf die Clearance hatte.

Eine kombinierte Inhibition von mehr als zwei Pumpen führte in PC3-Zellen zur kompletten Entgleisung des Ca²⁺-Haushaltes.

Eine Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron über 72 h resultierte in einer Veränderung der $[Ca^{2+}]_{i}$ -Homöostase unter SERCA-Inhibition. Die Clearance-Fähigkeit der Androgen-behandelten Zellen in $[Ca^{2+}]_{i}$ -Bereichen \geq 50 nM war der Kontrolle überlegen.

4.5 DU 145-Zellen - Einzelinhibition

4.5.1 Kontroll-Stimulation an DU 145-Zellen

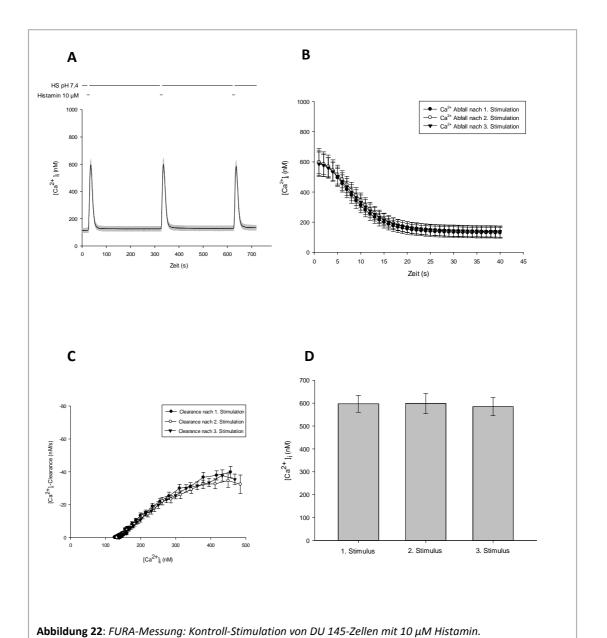
Auch in der Versuchsreihe der DU 145-Zelllinie wurde im Rahmen von Vorversuchen die Wirkung von Histamin auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Zelllinie untersucht. Die Zellen wurden im Abstand von jeweils 300 s für 10 s mit 10 μ M Histamin perifundiert (Abb. 22A). Zwischen den drei Stimulations-Zeitpunkten wurde die Zelle jeweils mit dem physiologischen HS-Puffer pH 7,4 umspült. Der Standardfehler der gemittelten Messungen in Abb.22A liegt bei minimal $\pm 16,29$ nM und maximal ± 50 nM - je nach Messzeitpunkt.

Bei der ersten Stimulation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ auf 597,14 (SE = ±36,9) nM, bei der 2. Stimulation auf 598,67 nM (SE = ±43,81) und bei der 3. Stimulation auf 584,86 nM (SE = ±39,5) (Abb. 22D).

Der Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ nach allen drei Stimulationen verlief annähernd deckungsgleich (Abb. 22B). Ebenso unterschieden sich die Clearance-Raten nach wiederholter Histamin-Stimulation an DU 145-Zellen nicht wesentlich (Abb. 22C). Die $[Ca^{2+}]_i$ sank nach allen drei Stimulation auf ihre Ruhe-Konzentration, von im Mittel 132,39 nM ab: nach 1. Stimulation auf 128,9 nM (SE = ± 17 ,3), nach 2. Stimulation auf 133,14 nM (SE = ± 17 ,8) und nach dem 3. Stimulus auf 135,13 nM (SE = ± 18 ,2).

Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate des ersten Peaks bei -37,8 nM/s, die des zweiten bei -33,1 nM/s, die des dritten Peaks bei -32,9 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate des ersten Peaks bei -23,8 nM/s, die des zweiten bei -22,8 nM/s und des dritten Peaks bei -21,9 nM/s.

Histamin verursachte in DU 145-Zellen einen reversiblen und reproduzierbaren $[Ca^{2^+}]_{i}$ -Anstieg. Auch nach mehrmaligen Histamin-Stimulationen verringerte sich die Clearance-Rate nicht wesentlich.



A: Gemittelter Graph mit SE (n=28 Zellen). **B:** Gemittelter [Ca²⁺]_{Γ}-Abfall mit SE nach 1., 2. und 3. Stimulation. **C:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=28 Zellen). **D:** Gemittelte maximale Stimulation mit SE nach 1. Stimulation (597,14, SE = \pm 36,9 nM), 2. Stimulation (598,67, SE = \pm 43,81 nM) und 3. Stimulation (584,86, SE = \pm 39,5 nM) mit Histamin (n=28 Zellen).

4.5.2 PMCA-Inhibition an DU 145-Zellen

Die Hemmung der PMCA erfolgte auch bei der DU 145-Zelllinie durch eine Reduktion der extrazellulären Protonen-Konzentration (pH 8,6). In Abbildung 23A ist eine Einzelmessung dargestellt. Kontroll-Stimulus und inhibierter Stimulus (pH 8,6) erfolgten nach 20 s Vorlauf mit HS pH 7,4 im Abstand von 300 s mit 10 μM Histamin. Direkt im Anschluss an die zweite Histamin-Applikation wurde die Zelle mit HS pH 8,6 umspült. Nach einem raschen Abfall stieg die [Ca²+]_i erneut an und näherte sich einem Plateau bei 193,6 nM. Wurde die Zelle wieder mit HS pH 7,4 umspült, sank die [Ca²+]_i wieder auf seinen ursprünglichen basalen Ausgangswert von 29,6 nM. Auch bei einer erneuten Perifusion mit HS pH 8,6 ohne vorherige Stimulation kam es zu einem [Ca²+]_i-Anstieg wie bei vorangegangener Stimulation.

Der gemittelte Graph mit einem Standardfehler zwischen minimal $\pm 9,93$ nM und maximal $\pm 80,6$ nM (je nach Messzeitpunkt) in Abbildung 23B ist bis zum Messzeitpunkt 580 s dargestellt. Eine Clearance unter Perifusion mit HS pH 8,6 erfolgte im Mittel nur bis zu einer [Ca²⁺]_i = 329,6 nM (SE = $\pm 33,7$). Ab diesem Punkt stellte sich ein Plateau ein.

Vergleicht man den gemittelten Abfall der [Ca²⁺]_i nach Kontroll-Stimulus bei pH 7,4 mit dem Abfall bei pH 8,6 (Abb. 23C), zeigt sich, dass unter PMCA-Inhibition die basale [Ca²⁺]_i nicht mehr erreicht wird. Es kommt zu einem Zusammenbruch der Ca²⁺-Homöostase.

Die Clearance-Rate unter PMCA-Inhibition lag in allen [Ca²⁺]_i-Bereichen deutlich unter der des Kontroll-Stimulus (Abb. 23D). Es wurden die Clearance-Raten bei [Ca²⁺]_{i1t} und [Ca²⁺]_{i2t} miteinander verglichen. Bei [Ca²⁺]_{i1t} lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -56,2 nM/s und die des inhibierten Peaks bei -27,2 nM/s. Bei [Ca²⁺]_{i2t} war die Clearance-Rate der Kontrolle bei -32,1 nM/s, während unter Inhibitions-Bedingungen keine Clearance mehr stattfand.

Die Umspülung von DU 145-Zellen mit HS pH 8,6 führte zu einer deutlichen Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance – vor allem im Bereich der basalen [Ca²⁺]_i.

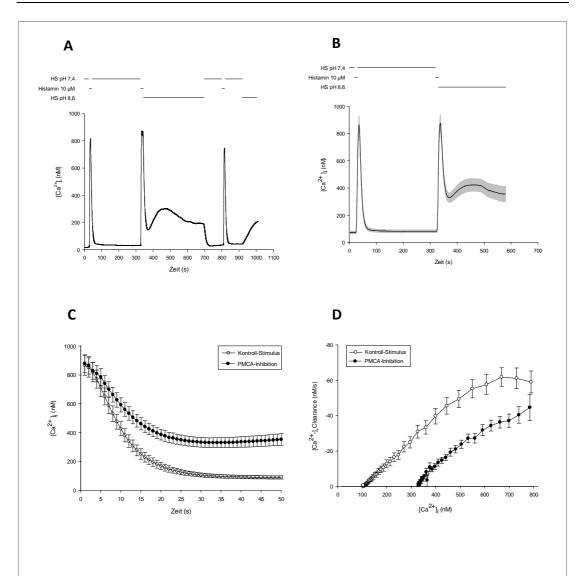


Abbildung 23: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an DU 145-Zellen.

A: Einzelmessung: $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Plateau nach zweiter Stimulation unter HS pH 8,6 Umspülung bei 193,6 nM. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=27 Zellen). $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Plateau unter Inhibition bei 356,8 nM (SE = ±56,8 nM). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter PMCA-Inhibition (n=27 Zellen) mit größtem Unterschied im basalen $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Bereich. **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=27 Zellen).

4.5.3 SERCA-Inhibition an DU 145-Zellen

Die Inhibition der SERCA erfolgte – wie bei der PC3-Zelllinie – in Ca²⁺-freiem Medium. Denn auch bei DU 145-Zellen zeigte sich in Vorversuchen eine massive [Ca²⁺]_i-Verschiebung, die zu einem prolongierten Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führte. Am wahrscheinlichsten liegt die Ursache hierfür in der Aktivierung der sogenannten *store operated channels*.

Abbildung 24A zeigt einen gemittelten Graphen einer SERCA-Inhibition mit 15 μΜ CPA in Ca²⁺-haltigem Medium mit einem Standardfehler bei minimal ±17,11 nM und maximal ±83,04 nM - je nach Messzeitpunkt. Es konnte nach massiver [Ca²⁺]_i-Verschiebung kein weiterer [Ca²⁺]_i-Anstieg durch Histamin mehr induziert werden. Aus den genannten Gründen erfolgte die Inhibierung der SERCA in DU 145-Zellen, wie in Abbildung 24B exemplarisch dargestellt, in Ca²⁺-freiem Medium. Die Zelle wurde dreimal über 10 s mit 10 μM Histamin stimuliert. Die beiden ersten Stimulationen erfolgten in Ca²⁺-freiem Puffer. 10 s vor der zweiten Stimulation wurde bereits die Perifusion mit 15 µM CPA begonnen, um sicherzustellen, dass CPA bereits direkt im Anschluss an die Histamin-Applikation am ER wirken kann. Der zweite [Ca²⁺]_i-Anstieg lag in dieser Einzelmessung mit maximal 839,29 nM höher als der Kontroll-Stimulus mit maximal 782,48 nM. Nachdem die [Ca²⁺]_i wieder annähernd die basale Konzentration erreicht hatte, wurde die Zelle wieder mit Ca²⁺haltigem Puffer ohne CPA umspült. Nach einem erneuten [Ca²⁺];-Anstieg auf maximal 1556,04 nM und folgender Abfall wurde die Zelle zum dritten Mal mit Histamin stimuliert. Der Effekt der dritten Stimulation fiel mit einem [Ca²⁺]_i-Anstieg auf maximal 65,69 nM nur sehr gering aus.

Gemäß diesem Messprotokoll wurden insgesamt 28 Messungen durchgeführt. Da die [Ca²⁺]_i-Verschiebungen beim Wechsel von Ca²⁺-freien in Ca²⁺-haltigen Puffer nicht immer das gleiche Ausmaß hatten, wird der gemittelte Graph in Abbildung 25A nur bis zum Messzeitpunkt 800 s gezeigt. Der Standardfehler der gemittelten Messungen lag zwischen minimal ±4,42 nM und maximal ±81,7 nM - je nach Messzeitpunkt.

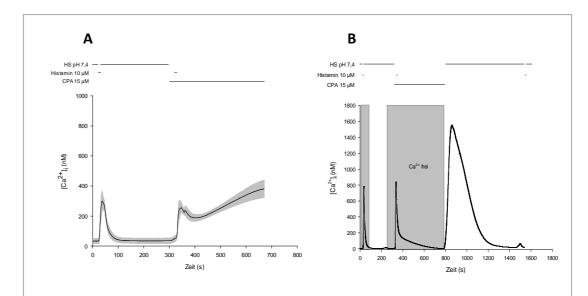


Abbildung 24: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen.

A: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen in Ca²⁺-haltigem Puffer – gemittelter Graph mit SE (n=12 Zellen). [Ca²⁺]_r-Anstieg unter CPA nach 670 s auf maximal 384,24 nM (SE = \pm 57,76). **B**: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen in Ca²⁺-freiem Puffer – Einzelmessung. Unter CPA-Perifusion deutlich flacherer Abfall des [Ca²⁺]_i ab [Ca²⁺]_i < 300 nM.

Das $[Ca^{2+}]_{i}$ -Maximum beider Stimuli war im Mittel mit 909,3 nM (SE = \pm 50,7) und 902,6 nM (SE = \pm 50,3 nM) $[Ca^{2+}]_{i}$ gleich hoch. Der $[Ca^{2+}]_{i}$ -Abfall unter Inhibitions-Bedingungen zeigte sich bis zu einer $[Ca^{2+}]_{i}$ von 426,78 nM (SE = \pm 76,11) vergleichbar mit dem Kontroll-Stimulus. Unterhalb dieses Wertes verlief der $[Ca^{2+}]_{i}$ -Abfall unter CPA-Perifusion deutlich langsamer (Abb. 25B).

Die Clearance-Raten des Kontroll-Stimulus und des Stimulus unter CPA-Perifusion sind in Abbildung 25C dargestellt. Die Clearance-Rate unter CPA-Umspülung war insgesamt deutlich langsamer als die des Kontroll-Stimulus – vor allem in niedrigeren $[Ca^{2+}]_{i}$ -Bereichen. Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -53,0 nM/s und die des inhibierten Peaks bei -34,6 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ war die Clearance-Rate der Kontrolle bei -32,5 nM/s unter Inhibitions-Bedingungen bei -12,2 nM/s. Unterhalb einer $[Ca^{2+}]_{i}$ von 160 nM fand unter SERCA-Inhibition nur noch eine Clearance von < -0,79 nM/s statt.

Eine Perifusion mit 15 μ M CPA führte in Ca²⁺-freiem Puffer im Vergleich zum Kontroll-Stimulus zu einer langsameren Clearance-Rate in allen [Ca²⁺]_i-Bereichen.

Der auffälligste Unterschied der Clearance-Rate zum Kontroll-Stimulus fand sich aber unterhalb einer $[Ca^{2+}]_i$ von 160 nM.

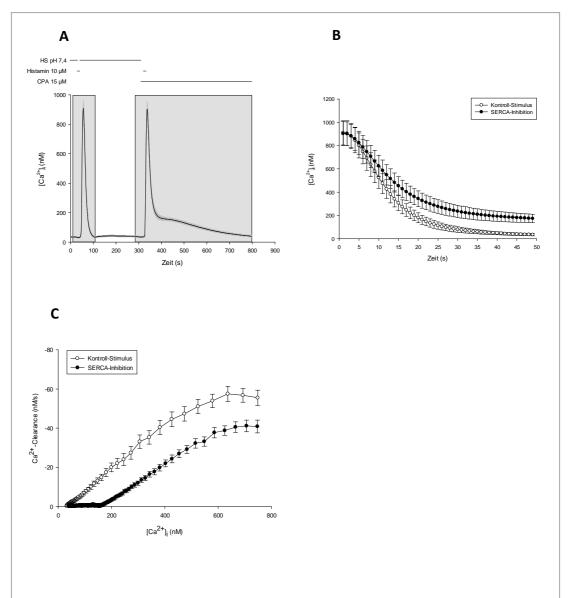


Abbildung 25: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen.

A: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen – gemittelter Graph mit SE (n=28 Zellen). **B:** Gemittelter [Ca²⁺]_{\(\infty\)} Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter SERCA-Inhibition (n=28 Zellen). Unter CPA-Perifusion deutlich flacherer Abfall der [Ca²⁺]_{\(\infty\)} ab [Ca²⁺]_{\(\infty\)} < 426,78 nM (SE = ±76,11). **C:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=28 Zellen). [Ca²⁺]_{\(\infty\)} \(\leq 160 nM Clearance-Rate w\(\alpha\)hrend SERCA-Inhibition < -0,79 nM/s.

4.5.4 MCU-Inhibition an DU 145-Zellen

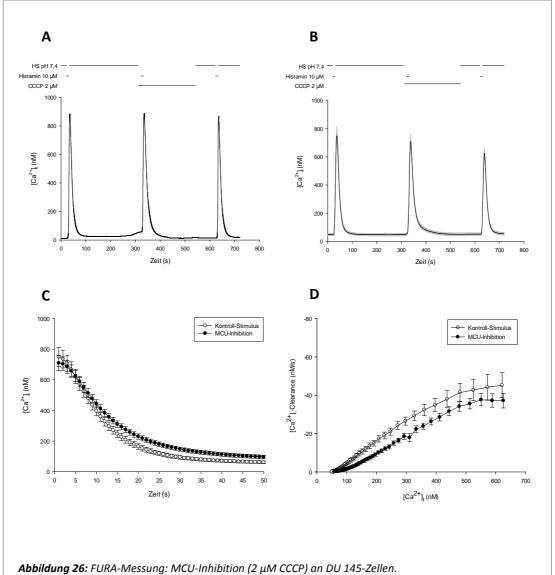
Der MCU wurde in der DU 145-Zelllinie wurde durch 2 μ M CCCP gehemmt (Abb. 21A und 21B). Die Zelle wurde insgesamt dreimal über 10 s mit 10 μ M Histamin stimuliert. 10 s vor der zweiten Stimulation wurde bereits die Perifusion mit 2 μ M CCCP begonnen. Nachdem die basale [Ca²+] $_i$ wieder annähernd erreicht war, wurde die Zelle erneut mit HS pH 7,4 perifundiert. Die dargestellte Einzelmessung zeigt keine Veränderung der [Ca²+] $_i$ unter Inhibition (Abb. 21A). Es konnte im Mittel eine leichte Verringerung maximalen [Ca²+] $_i$ -Anstiegs nach zweiter und dritter Stimulation im Vergleich zum Kontroll-Stimulus beobachtet werden. Der Kontroll-Stimulus lag bei 749,02 nM (SE = \pm 63,01), die beiden folgenden Peaks bei 709,7 nM (SE = \pm 49,5), bzw. bei 626,4 nM (SE = \pm 39,2). Im Verlauf der Messung lag der Standardfehler bei minimal \pm 8,08 nM und maximal \pm 80,3 nM - je nach Messzeitpunkt.

Der $[Ca^{2+}]_{i-}$ Abfall unter Inhibitions-Bedingungen zeigte sich bis zu einer $[Ca^{2+}]_{i}$ von 588,19 nM (SE = ±33,90) vergleichbar mit dem Kontroll-Stimulus. Unterhalb dieses Wertes verlief der $[Ca^{2+}]_{i-}$ Abfall unter CCCP-Perifusion flacher (Abb. 21C).

Bei 52 nM (SE = $\pm 8,7$), ist sowohl beim Kontroll-Stimulus als auch unter CCCP-Applikation die basale [Ca²⁺]; erreicht.

Die Clearance-Rate unter MCU-Inhibition ist in Abbildung 21D dargestellt. Die Clearance-Rate unter Hemmung ist insgesamt langsamer als die des Kontroll-Stimulus - vor allem in höheren [Ca²⁺]_i-Bereichen über 300 nM. Bei e[Ca²⁺]_{i1t} lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -38,0 nM/s und die des inhibierten Peaks bei -31,8 nM/s. Bei [Ca²⁺]_{i1t} war die Clearance-Rate der Kontrolle bei -24,0 nM/s und unter Inhibition bei -16,6 nM/s.

Eine CCCP-Perifusion nach Histamin-Stimulation hatte einen minimalen Einfluss auf die [Ca²⁺]_i-Clearance der DU 145-Zelle.



A: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an DU 145-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=30 Zellen). **C:** Gemittelter [Ca²⁺]_{Γ}Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter CCCP-Perifusion (n=30 Zellen).

D: Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=30 Zellen).

4.5.5 NCX-Inhibition an DU 145-Zellen

Die Hemmung des NCX in DU 145 wurde mit einem ähnlichen Protokoll durchgeführt wie bei der PC3-Zelllinie (Abb. 27A). Der Mittelwertgraph der Versuchsreihe ist in Abbildung 27B mit Standardfehler zwischen minimal $\pm 6,0$ nM und maximal $\pm 77,3$ nM dargestellt. Die einzelne Zelle wurde jeweils insgesamt dreimal über 10 s mit 10 μ M Histamin stimuliert. Direkt nach der zweiten Stimulation wurde die Zelle mit LiCl-Puffer umspült. Nachdem sich nach 8 min eine stabile $[Ca^{2+}]_i$ bei 72,25 nM, bzw. im Mittel 60,5 nM (SE = $\pm 6,8$) eingestellt hatte, wurde die Zelle wieder mit HS pH 7,4 perifundiert. Ein dritter Stimulus wurde nach insgesamt 620 s gesetzt. Es zeigte sich im Mittel eine geringe Abnahme des maximalen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs nach Histamin-Stimulation von 841 nM (im Mittel 784 nM, SE = $\pm 70,7$) auf 793,4 nM (im Mittel 711,1 nM, SE = $\pm 53,4$) beim zweiten, bzw. 651,1 nM (598,3 nM, SE = $\pm 50,2$) beim dritten Stimulus. Der Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ unter NCX-Inhibition wies insgesamt keinen Unterschied zum Kontroll-Stimulus auf (Abb. 27C). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ wurde nach beiden Stimuli mit 72,2 nM (im Mittel 63,03 nM, SE = $\pm 6,7$), wieder erreicht.

Die Clearance-Rate unter NCX-Inhibition war annähernd genauso wie die des Kontroll-Stimulus (Abb. 27D). Bei [Ca²⁺]_{i1t} lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -39,9 nM/s und die des inhibierten Peaks bei -40,0 nM/s. Bei [Ca²⁺]_{i2t} war die Clearance-Rate der Kontrolle bei -20,2 nM/s und unter Inhibition bei -21,4 nM/s.

Eine Perifusion von DU 145-Zellen mit LiCl-Puffer im Anschluss an eine Histamin-Stimulation zeigte in den gemessenen [Ca²⁺]_i-Bereichen keinen Effekt auf die Clearance der Zelle im Vergleich zum Kontroll-Stimulus.

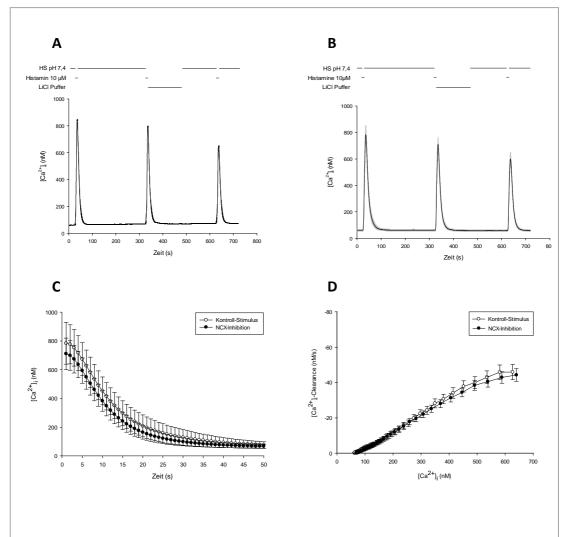


Abbildung 27: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCl-Puffer) an DU 145-Zellen.

A: NCX-Inhibition an DU 145-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=28 Zellen). **B:** Gemittelter [Ca^{2+}]_i-Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter NCX-Inhibition (n=28 Zellen). **C:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=28 Zellen) – kein Unterschied zwischen Clearance-Raten des Kontroll-Stimulus und unter LiCl-Puffer-Perifusion.

4.6 DU 145-Zellen - Kombinierte Inhibition

Wie unter 4.2 für die PC3-Zelllinie beschrieben, wurden auch an DU 145-Zellen FURA-Messungen mit kombinierter Inhibition unterschiedlicher Clearance-Mechanismen durchgeführt. Auch mit dieser Zelllinie wurden Inhibitionen der Pumpen miteinander verknüpft, die bereits in den Einzelinhibitionen die [Ca²⁺]_i-Homöostase der DU 145-Zellen beeinflusst hatten.

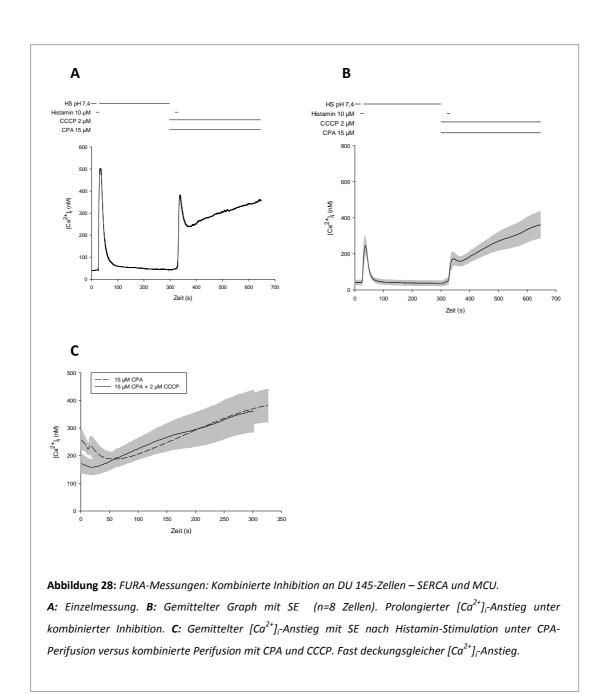
4.6.1 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen - SERCA und MCU

Um SERCA und MCU gleichzeitig zu inhibieren, wurde die Zelle sowohl mit 15 μM CPA als auch mit 2 μM CCCP umspült. Abbildung 28A zeigt das Messprotokoll einer Einzelmessung. Es wurde nach 20 s Vorlauf mit HS pH 7,4 ein Stimulus mit 10 μM Histamin über 10 s gesetzt. 300 s nach diesem Kontroll-Stimulus erfolgte die zweite Histamin-Applikation. Bereits 10 s vor Histamin-Gabe wurde die Zelle schon mit CPA und CCCP umspült, um sicherzustellen, dass beide Inhibitoren zum Ende der Histamin-Stimulation zu ihrem intrazellulären Wirkort gelangen konnten. Auf eine dritte Stimulation wurde aus zwei Gründen verzichtet: Zum Einen zeigte sich in den beschriebenen Versuchen unter Inhibition ein langsamer Anstieg der [Ca²+]i. Durch Perifusion mit HS pH 7,4 würde die [Ca²+]i zwar wieder absinken, jedoch so langsam, dass die gesamte Messdauer aufgrund der phototoxischen Eigenschaften von FURA für die Zelle nicht mehr tolerabel ist. Zum Anderen beeinflusst CCCP als irreversibler Entkoppler der Atmungskette in Kombination mit CPA die Zelle so nachhaltig, dass keine physiologische Reaktion auf Histamin mehr eintritt.

In Abbildung 28B ist ein gemittelter Graph von insgesamt 8 Messungen dargestellt. Der Standardfehler variiert – je nach Messzeitpunkt – zwischen minimal ±10,7 nM und maximal ±74,54 nM. Sowohl aus der exemplarischen Messung als auch aus dem Mittelwertgraphen geht hervor, dass die [Ca²⁺]_i unter CPA- und CCCP-Gabe nach Histamin-Stimulation zu einem [Ca²⁺]_i-Abfall um 143,27 nM in der dargestellten Einzelmessung bzw. im Mittel um 14,3 nM führte (Abb. 28A, 28B). Nach diesem Scheitelpunkt kam es zu einem prolongierten [Ca²⁺]_i-Anstieg. Nach 646 s war im

Mittel ein maximaler Wert von 360,52 nM (SE = $\pm 73,88$) erreicht. Der Kurvenverlauf ähnelte grundsätzlich dem einer alleinigen CPA-Gabe in Ca²⁺-haltigem Puffer (Abb. 24A). Vergleicht man [Ca²⁺]_i-Anstieg unter kombinierter Inhibition mit alleiniger CPA-Perifusion, stieg die [Ca²⁺]_i bei beiden Experimenten gleichermaßen an (Abb. 28C).

Eine kombinierte Perifusion mit 15 μ M CPA und 2 μ M CCCP zeigte keinen Unterschied zur alleinigen CPA-Gabe.

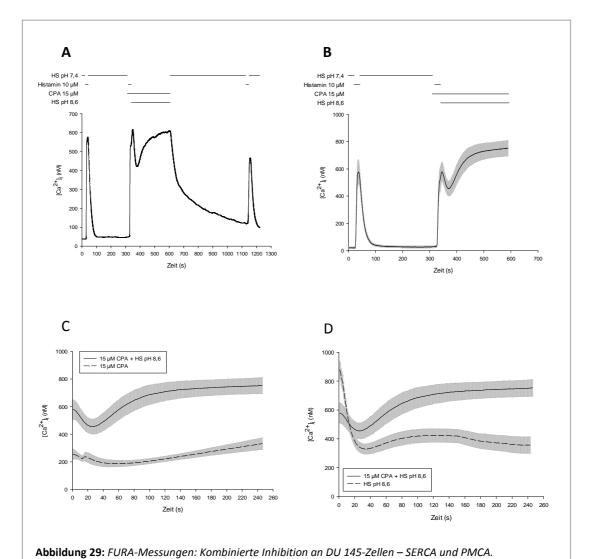


4.6.2 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA und PMCA

15 μ M CPA wurde mit HS pH 8,6 kombiniert, um eine gleichzeitige Inhibierung von SERCA und PMCA zu erreichen. In Abbildung 29A ist eine Einzelmessung dargestellt. Wie in allen Experimenten wurde nach 20 s HS pH 7,4 Umspülung eine Kontroll-Stimulation mit 10 μ M Histamin. Eine zweite Histamin-Gabe erfolgte nach 300 s. Die CPA-Perifusion wurde bereits 10 s vor Histamin-Stimulation begonnen. Mit HS pH 8,6 wurde direkt im Anschluss an den Stimulus gespült.

Unter kombinierter Inhibitor-Gabe sank die [Ca²+]_i nach Stimulation in der dargestellten Einzelmessung auf 426,56 nM, stieg aber im weiteren Messverlauf wieder an und pendelte sich auf einem Plateau bei 606,55 nM ein (Abb. 29A). Nach Erreichen des Plateaus wurde die Zelle erneut mit HS pH 7,4 umspült. Ein dritter Stimulus wurde gesetzt, nachdem annähernd die basale [Ca²+]_i wieder erreicht wurde. Die Antwort fiel in der Regel geringer aus, als die zwei Vorangegangenen. In der dargestellten Einzelmessung lagen die maximalen [Ca²+]_i-Anstiege nach Histamin-Gabe bei 576,55 nM, 617,32 nM und 465,68 nM. Im Mittelwertgraph – Abbildung 29B – sind nur Messwerte bis zum Zeitpunkt 590 s dargestellt, da zum einen das Plateau zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde und zum anderen der [Ca²+]_i-Abfall unter HS pH 7,4 unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nahm. Der Standardfehler aller durchgeführten Messungen lag - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal ±6,14 nM und maximal ±99,35 nM. Im Mittel zeigte sich unter kombinierter Inhibition ein [Ca²+]_i-Plateau bei 752,54 nM (SE = ±57,2).

Eine kombinierte Gabe von 15 μ M CPA in HS pH 8,6 führte nach Histamin-Stimulation zu einer $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung auf ein Plateau. Dieses Plateau wurde im Mittel 270 s nach Histamin-Stimulation erreicht. Nach dieser Zeit wurden bei alleiniger CPA-Gabe in Ca^{2+} -haltigem Puffer nur $[Ca^{2+}]_i$ -Werte von im Mittel 330,7 nM (SE = $\pm 41,14$) erreicht (Abb. 29C). Weiterhin lag das Plateau im Vergleich zur alleinigen Perifusion mit HS 8,6 um 364 nM höher (Abb. 29D).



A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=12 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{r}$ -Anstieg nach Histamin-Stimulation unter CPA-Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Höhere $[Ca^{2+}]_{i}$ unter kombinierter Inhibition. **D:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{r}$ -Anstieg mit SE nach Histamin-Stimulation unter HS pH 8,6 Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Höhere $[Ca^{2+}]_{i}$ unter kombinierter Inhibition.

4.6.3 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – PMCA und MCU

Bei der kombinierten Inhibition von PMCA und MCU wurden auch die Messprotokolle der Einzelinhibitionen entsprechend kombiniert. 300 s nach standardisierter Kontroll-Stimulation mit 10 μ M Histamin (Zeitpunkt 20 s) erfolgte eine zweite Histamin-Gabe. 10 s zuvor wurde die Zelle bereits mit 2 μ M CCCP umspült. Direkt nach der zweiten Histamin-Stimulation wurde die Zelle zusätzlich mit HS pH 8,6 perifundiert. Sowohl in der exemplarisch dargestellten Einzelmessung (Abb. 30A) als auch im gemittelten Graphen (Abb. 30B) sieht man unter Inhibitions-Bedingungen einen Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf 171,55 nM, bzw. im Mittel auf 139,4 nM (SE = \pm 19). Im Anschluss blieb die $[Ca^{2+}]_i$ auf einem Plateau, das im Mittel 70 nM über der basalen $[Ca^{2+}]_i$ lag. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte liegt - je nach Messzeitpunkt zwischen minimal \pm 15,85 nM und maximal \pm 36,25 nM.

Im Vergleich zu einer alleinigen Inhibition mit HS pH 8,6 zeigten sich zwei große Unterschiede (Abb. 30C). Zum einen war der maximale [Ca²⁺]_i-Anstieg nach Histamin-Gabe in den Einzelinhibitions-Experimenten im Mittel um 539,68 nM höher. Zum Anderen wurde zwar in beiden Versuchsreihen unter Inhibition ein [Ca²⁺]_i-Plateau erreicht, jedoch lag dieses unter kombinierter Inhibition um 280,51 nM niedriger als bei alleiniger Perifusion mit HS pH 8,6.

Ähnliches wurde auch im Vergleich mit alleiniger CCCP-Perifusion beobachtet (Abb. 26D). Der maximale [Ca²⁺]_i-Anstieg unter Histamin-Stimulation lag bei der Einzelinhibition mit CCCP um 371,88 nM höher als bei kombinierter Inhibition. Im Vergleich zur alleinigen CCCP-Gabe sank die [Ca²⁺]_i jedoch bei kombinierter Inhibition nicht mehr auf die basale Konzentration ab, sondern blieb leicht erhöht (s.o.).

Eine kombinierte Inhibition von PMCA und MCU nach Histamin-Stimulation führte zu einem [Ca²⁺]_i-Plateau, das etwa auf 26% des vorangegangen [Ca²⁺]_i-Anstiegs lag.

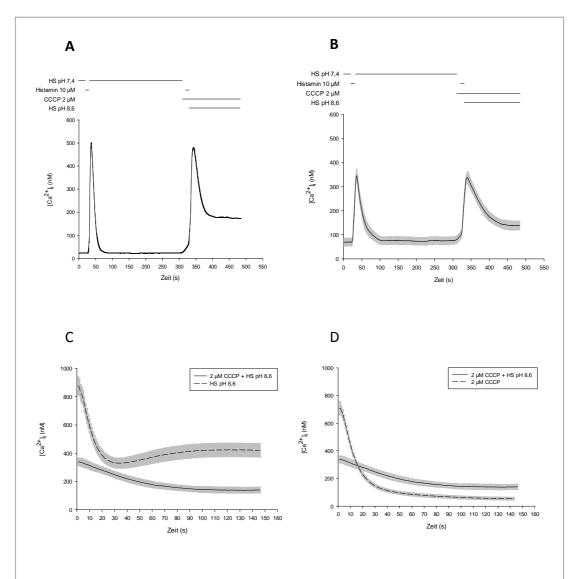


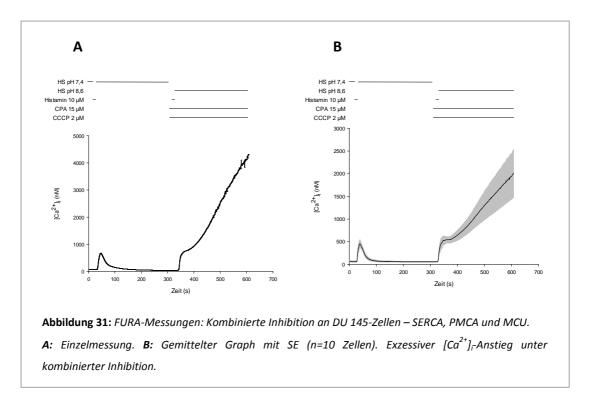
Abbildung 30: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – PMCA und MCU.

A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=10 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\vdash}$ Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter Perifusion mit HS pH 8,6 versus Perifusion mit CCCP in HS pH 8,6. Geringere Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$ bei kombinierter Inhibition. $[Ca^{2+}]_i$ bleibt unter kombinierter Inhibition niedriger als bei alleiniger PMCA-Inhibition. **D:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter CCCP-Perifusion versus Perifusion mit CCCP in HS pH 8,6. Geringere Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$ bei kombinierter Inhibition. $[Ca^{2+}]_i$ bleibt unter kombinierter Inhibition höher als bei alleiniger MCU-Inhibition.

4.6.4 Kombinierte Inhibition an DU 145-Zellen – SERCA, PMCA und MCU

Eine Inhibierung aller Pumpen – ausgenommen NCX – ist in Abbildung 31 dargestellt. Dabei wurden 2 μ M CCCP, 15 μ M CPA und HS pH 8,6 kombiniert. 300 s nach dem standardisierten Kontroll-Stimulus erfolgte die zweite Histamin-Perifusion. Die beiden Inhibitoren mit intrazellulärem Wirkungsort, wurden – wie in den vorangegangenen Messprotokollen – bereits 10 s vor Stimulation gegeben. HS pH 8,6 wurde direkt nach Ende der Histamin-Perifusion appliziert. Der Standardfehler der gemittelten Messungen in Abbildung 31B schwankte zwischen minimal $\pm 9,3$ nM und maximal $\pm 523,71$ nM - je nach Messzeitpunkt. Es zeigte sich in allen Messungen ein exzessiver Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter kombinierter Inhibition. Dabei wurde zum letzten Messzeitpunkt bei 608 s eine maximale $[Ca^{2+}]_i$ von im Mittel 2010,56 nM (SE = $\pm 523,71$) gemessen. Bei einer alleinigen Inhibition der SERCA in Ca^{2+} -haltigem Puffer kam es zwar ebenfalls zu einem massiven $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, jedoch auf Werte von 345,36 nM (SE = $\pm 45,65$) beim Zeitpunkt 608 s.

Eine Umspülung von DU 145-Zellen mit 2 μ M CCCP, 15 μ M CPA in HS pH 8,6 nach Histamin-Stimulation führte zu einem Zusammenbruch der [Ca²⁺]_i-Homöostase.



4.7 DU 145-Zellen – Inhibition nach Androgen-Stimulation

Nach 72 h Stunden Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron wurden FURA-Messungen an DU 145-Zellen durchgeführt, mit dem Ziel auftretende Aktivitätsveränderungen der untersuchten Pumpen nach Androgen-Behandlung (chFKS + 100 nM Dihydrotestosteron) im Vergleich zu einer Androgen-deprivierten Kontrolle (chFKS) messen zu können.

4.7.1 PMCA-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation

Die Inhibierung der PMCA erfolgte mit HS pH 8,6 nach dem gleichen Messprotokoll, wie es bereits in Kapitel 4.5.2 beschrieben wurde. Wie in den vorangegangenen Versuchen mit PMCA-Inhibition an DU 145-Zellen stellte sich auch in diesen Experimenten ein [Ca²⁺]_i-Plateau unter Perifusion mit HS pH 8,6 ein. In Abbildung 32A und B sind Einzelmessungen der Versuchsreihe dargestellt. Dabei handelt es sich bei A um die Kontrolle, welche in Aktivkohle-behandeltem Medium wuchs und bei B um die Zellpopulation, die über 72 h in Aktivkohle-behandeltem Medium mit 100 nM Dihydrotestosteron inkubiert wurde. In Abbildung 32C und D sind die entsprechenden Mittelwertgraphen dargestellt. Die Standardfehler der einzelnen Messwerte variieren im Verlauf der Messung. In der Kontroll-Gruppe (Abb. 32C) liegt dieser zwischen minimal ±5,37 nM und maximal ±63,73 nM. In der Androgen-Gruppe (Abb. 32D) liegt er zwischen minimal ±9,17 nM und maximal ±52,73 nM.

Beim Vergleich der Versuche mit und ohne Androgen zeigten sich schon grundsätzliche Veränderungen der [Ca²⁺]_i. Zum einen lag die Ruhe-Konzentration in der Dihydrotestosteron-Stimulierten Zell-Population im Mittel um 25 nM niedriger als bei den Kontroll-Zellen. Zum anderen fiel der [Ca²⁺]_i-Anstieg der Androgenbehandelten Zellen auf die Histamin-Applikation sowohl beim ersten als auch beim zweiten Stimulus um 98,44 nM, bzw. 95,36 nM geringer aus als bei der Kontroll-Zellpopulation.

Das $[Ca^{2+}]_{i}$ -Plateau lag bei der Kontroll-Gruppe bei 359,19 nM (SE = \pm 78,7), bei der Androgen-Gruppe bei 355,46 nM (SE = \pm 55,0).

Die Clearance-Raten der beiden Zellpopulationen wurden bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ und $[Ca^{2+}]_{i2t}$ miteinander verglichen (Abb. 32F). Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate der Androgenbehandelten Zellen unter Inhibition bei -10,7 nM/s und die der Kontroll-Gruppe bei -10,1 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ war die Clearance-Rate der Androgen-deprivierten Kontrolle bei -5,2 nM/s, während diese in den Androgen-behandelten Zellen bei 5,5 lag.

Es zeigte sich beim Vergleich der Clearance-Raten (Abb. 32F) unter Androgeneinfluss kein Unterschied.

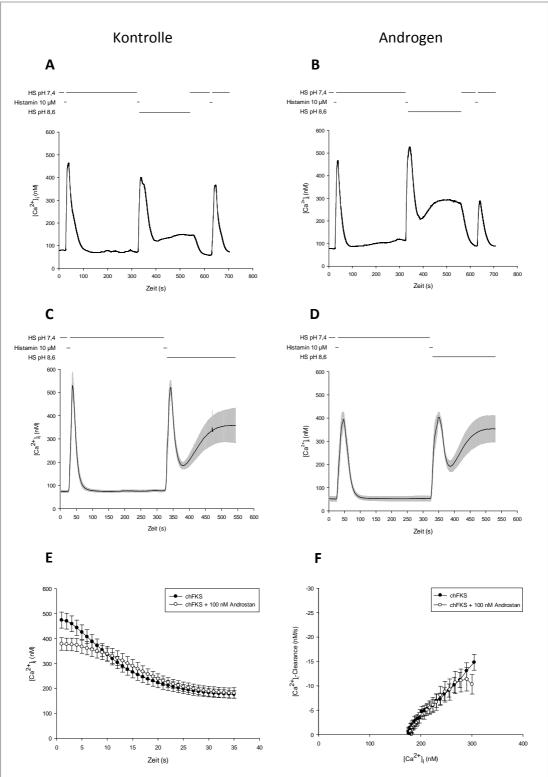


Abbildung 32: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an DU 145-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Elnzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph – Kontrolle chFKS mit SE (n=17 Zellen). **D:** Gemittelter Graph – 100 nM Androstan mit SE (n=17 Zellen). **E:** Gemittelter [Ca^{2+}]_r-Abfall mit SE unter PMCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. **F:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE unter PMCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan.

4.7.2 SERCA-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation

Die Inhibierung der SERCA erfolgte mit 15 μ M CPA in Ca²⁺-freiem Puffer nach ähnlichem Messprotokoll, wie es bereits in Kapitel 4.5.3 beschrieben wurde.

300 s nach einem Kontroll-Stimulus in Ca²⁺-freiem Puffer wurden zum zweiten Mal 10 μM Histamin appliziert. 20 s zuvor wurde die Zelle bereits mit Ca²⁺-freiem Puffer umspült. 10 s vor Stimulation wurde mit der CPA-Umspülung begonnen. In Abbildung 34A und B sind Einzelmessungen der Versuchsreihe dargestellt. Dabei zeigt A die Androgen-deprivierte Kontrolle und B eine Messung einer Androgenstimulierten Zelle. In Abbildung 34C und D sind die entsprechenden Mittelwertgraphen dargestellt. Die Standardfehler der einzelnen Messwerte schwankten im Verlauf der Messung. In der Kontroll-Gruppe (Abb. 34C) lag dieser zwischen minimal ±6,92 nM und maximal ±50,11 nM. In der Androgen-Gruppe (Abb. 34D) lag er zwischen minimal ±8,37 nM und maximal ±47,86 nM.

Der [Ca²⁺]_i-Anstieg der Androgen-behandelten Zellen unter Histamin-Perifusion lag sowohl beim ersten als auch beim zweiten Stimulus im Mittel um 79,98 nM, bzw. 71,56 nM niedriger aus als bei der Kontroll-Zellpopulation.

Unter CPA-Perifusion sank die [Ca²⁺]_i sowohl in der Kontroll-Gruppe also auch bei den Androgen-behandelten Zellen auf ein Plateau, welches leicht über der basalen [Ca²⁺]_i lag.

Die $[Ca^{2+}]_{i}$ -Clearance-Rate der Androgen-behandelten Zellen lag bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ bei -7,1 nM/s, während die Kontroll-Gruppe bei -13,6 nM/s lag (Abb. 35B). Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate beider Zellpopulationen <1,5 nM/s.

Es zeigte sich sowohl im Abfall der [Ca²⁺]_i als auch in den berechneten Clearance-Raten ein Unterschied zwischen den Zellen, die unter Androgen-Entzug und Androgen-Stimulation kultiviert wurden (Abb. 35A, 35B). Die Differenz zwischen den Clearance-Raten ist vor allem in einem [Ca²⁺]_i-Bereich von 150 bis 250 nM zu erkennen. Hier sieht man, dass die Clearance unter SERCA-Inhibition in Androgenstimulierten Zellen weniger effektiv war als in Androgen-deprivierten Zellen.

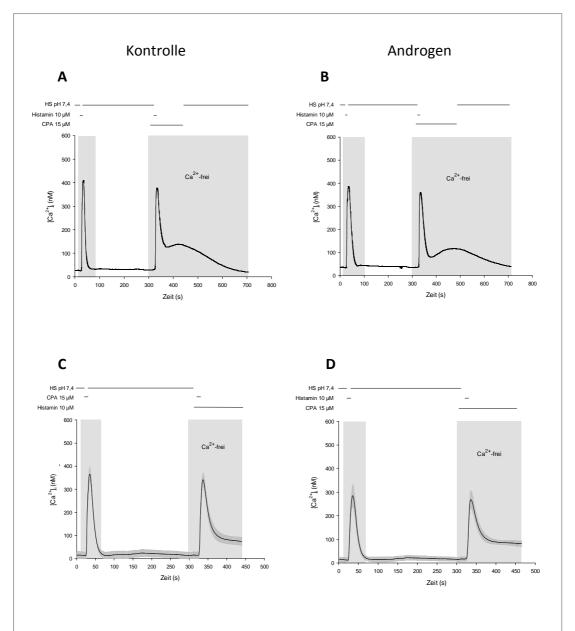


Abbildung 33: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Einzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph – Kontrolle chFKS mit SE (n=8 Zellen). Unter 15 μ M CPA [Ca²⁺]_{Γ}Plateau bei im Mittel 73,83 nM (SE = $\pm 11,56$). **D:** Gemittelter Graph – 100 nM Androstan mit SE (n=11 Zellen). Unter 15 μ M CPA [Ca²⁺]_{Γ}Plateau bei im Mittel 82,3nM (SE = $\pm 11,56$).

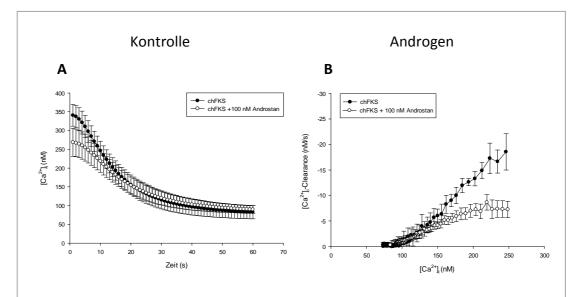


Abbildung 34: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an DU 145-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\vec{l}}$ Abfall mit SE unter SERCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. **B:** Gemittelte Clearance-Raten unter SERCA-Inhibition mit SE – chFKS vs. chFKS +100 nM Androstan. Proportional ansteigende Differenz der Clearance-Raten ab > 150 nM $[Ca^{2+}]_{\vec{l}}$.

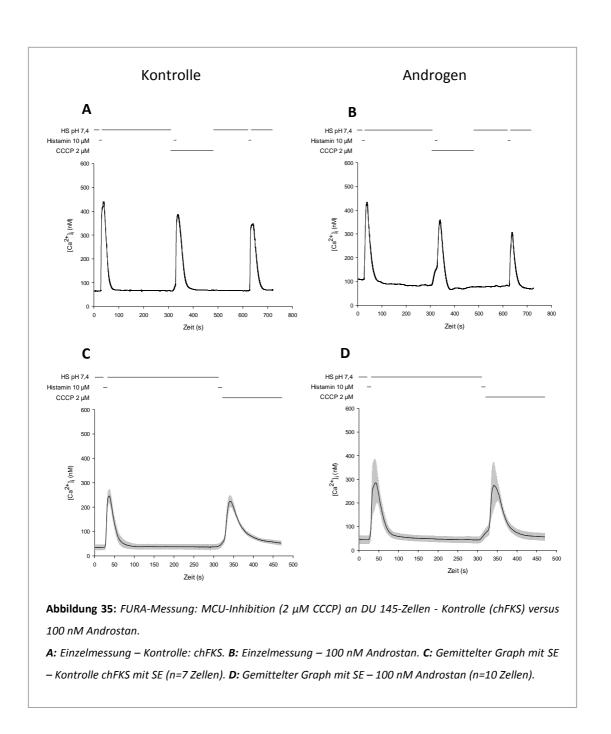
4.7.3 MCU-Inhibition an DU 145-Zellen nach Androgen-Stimulation

Der MCU wurde sowohl in Androgen-stimulierten DU 145 als auch in der Kontroll-Gruppe, wie bereits in Kapitel 4.5.4 beschrieben, mit 2 μ M CCCP inhibiert.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde die CCCP-Perifusion 10 s vor Histamin-Stimulation bereits begonnen und weitergeführt bis die basale [Ca²+]i wieder erreicht war, mindestens aber bis zum Zeitpunkt 480 s. Die Abbildungen 36A und B zeigen Einzelmessungen der Versuchsreihe. Abbildung 36A zeigt die Kontrolle, welche in Aktivkohle-behandeltem Medium wuchs und B die Zell-Population, die über 72 h in Aktivkohle-behandeltem Medium mit 100 nM Dihydrotestosteron inkubiert wurde. In Abbildung 36C und D sind die zugehörigen Mittelwertgraphen bis zum Messzeitpunkt 470 s dargestellt. Die Standardfehler der gemittelten Messwerte variierten im Verlauf der Messung. In der Kontroll-Gruppe (Abb. 36C) lag dieser zwischen minimal ±5,79 nM und maximal ±34,71 nM. In der Androgen-Gruppe (Abb. 36D) lag er zwischen minimal ±11,76 nM und maximal ±107,53 nM.

Die [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate der Androgen-behandelten Zellen lag bei [Ca²⁺]_{i1t} bei -5,4 nM/s, während die Kontroll-Gruppe bei -4,5 nM/s lag (Abb. 37B). Bei [Ca²⁺]_{i2t} war die Clearance-Rate der Androgen-Gruppe bei -3,4 nM/s, die der Kontrolle bei -2,5nM/s.

Die [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate der Dihydrotestosteron-behandelten Zellen war in allen [Ca²⁺]_i-Bereichen annähernd gleich.



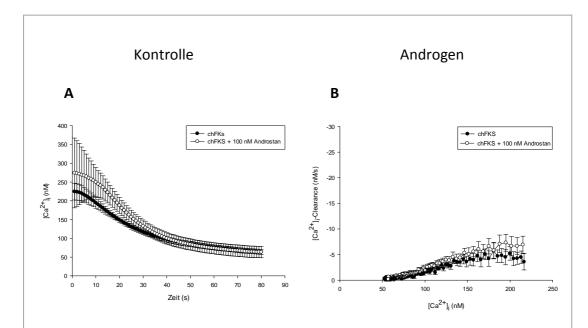


Abbildung 36: FURA-Messung: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an DU 145-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall mit SE unter MCU-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. **B:** Gemittelte Clearance-Raten unter MCU-Inhibition mit SE – chFKS vs. chFKS +100 nM Androstan.

4.8 DU 145-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung

Die Stimulation mit 10 μ M Histamin führte in DU 145-Zellen zu einem reproduzierbaren reversiblen [Ca²⁺]_i-Anstieg.

Auch in der DU 145-Zelllinie hatten sowohl SERCA als auch PMCA-Inhibition den größten Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zellen. Eine PMCA-Inhibition führte zu einer deutlichen Einschränkung der $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance in allen $[Ca^{2+}]_i$ -Bereichen. Die Ca^{2+} -Homöostase konnte nicht aufrecht erhalten werden. Auch durch Inhibition der SERCA sank die $[Ca^{2+}]_i$ unter CPA-Umspülung in allen $[Ca^{2+}]_i$ -Bereichen deutlich langsamer ab (größter Unterschied bei $[Ca^{2+}]_i \le 160$ nM).

Die irreversible Inhibition des MCU führte nur zu einer marginalen Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate. NCX-Inhibition hatte unter Standardbedingungen keinen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase.

Eine kombinierte Inhibition von mehr als zwei Pumpen führte ebenso wie bei den PC3-Zellen zur kompletten Entgleisung der Ca²⁺-Homöostase.

Eine 72h Kultivierung von DU 145-Zellen mit 100 nM Dihydrotestosteron konnte die Aktivität der SERCA beeinflussen. Vor allem in einem [Ca²⁺]_i-Bereich von 150 bis 250 nM war die Clearance-Leistung der Androgen-behandelten Zellen geringer.

4.9 P21-Zellen – Einzelinhibition

4.9.1 Kontroll-Stimulation an P21-Zellen

Auch die P21-Zelllinie reagierte auf 10 μ M Histamin mit einem deutlichen Anstieg der [Ca²+]_i. Der gemittelte Graph in Abbildung 37A zeigt eine dreimalige Perifusion mit 10 μ M Histamin über jeweils 10 s. Der Standardfehler der gemittelten [Ca²+]_i in Abb. 37A lag - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal ±21,3 nM und maximal ±118,6 nM. Zwischen den Histamin-Applikationen wurden die Zellen jeweils mit HS pH 7,4 umspült. Nach der ersten Stimulation war ein [Ca²+]_i-Anstieg auf 612,4 (SE = ±93,2) zu verzeichnen. Der zweite und dritte Anstieg lagen bei 640,9 (SE = ±89,5) und bei 676,9 (SE = ±96) (Abb. 37D).

Auch der Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ unterschied sich nach dreimaliger Stimulation nicht (Abb. 37B). Es kam zu einem leichten Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ nach wiederholter Stimulation. Nach dem ersten Stimulus wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ mit 165 nM (SE = $\pm 23,76$) erreicht, nach dem zweiten bei 179 nM (SE = $\pm 25,18$) und nach der dritten Histamin-Gabe bei 196 nM (SE = $\pm 27,49$).

Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lagen die Clearance-Raten des ersten Stimulus bei -37,4 nM/s, die des zweiten bei -34,7 nM/s und die des dritten Stimulus bei -32,1 nM/s (Abb. 37C). Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lagen die Clearance-Raten bei -24,3 nM/s beim ersten, bei -23,1 nM/s beim zweiten und bei -23,4 nM/s beim dritten Stimulus.

P21-Zellen reagierten auf eine Perifusion mit 10 μ M Histamin mit einem gleichmäßigen, reversiblen und reproduzierbarem [Ca²+]_i-Anstieg. Die Clearance-Raten der drei aufeinanderfolgenden Stimuli unterschieden sich nicht.

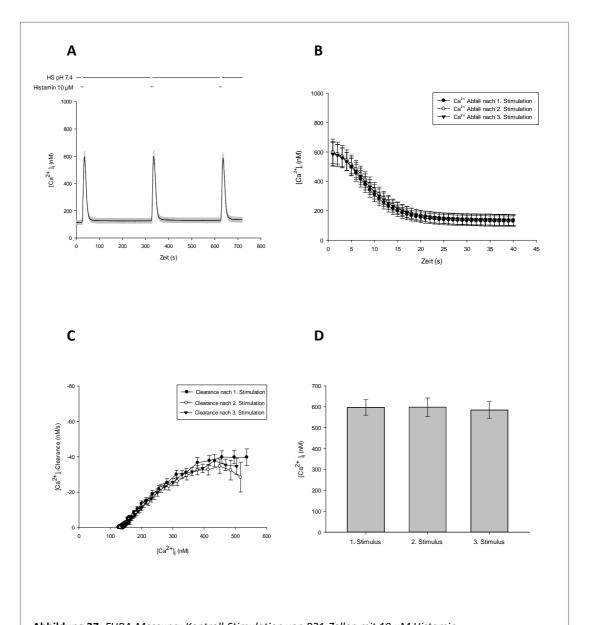


Abbildung 37: FURA-Messung: Kontroll-Stimulation von P21-Zellen mit 10 μ M Histamin. **A**: Gemittelter Graph mit SE (n=30 Zellen). **B**: Gemittelter [Ca²⁺]_i-Abfall mit SE nach 1., 2. und 3. Stimulation. **C**: Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=30 Zellen). **D**: Gemittelte maximale Stimulation mit SE nach 1. Stimulation (612,4 nM, SE = \pm 93,2), 2. Stimulation (640,9 nM, SE = \pm 89,5 nM) und 3. Stimulation (676,9 nM SE = \pm 96 nM) mit Histamin (n=28 Zellen).

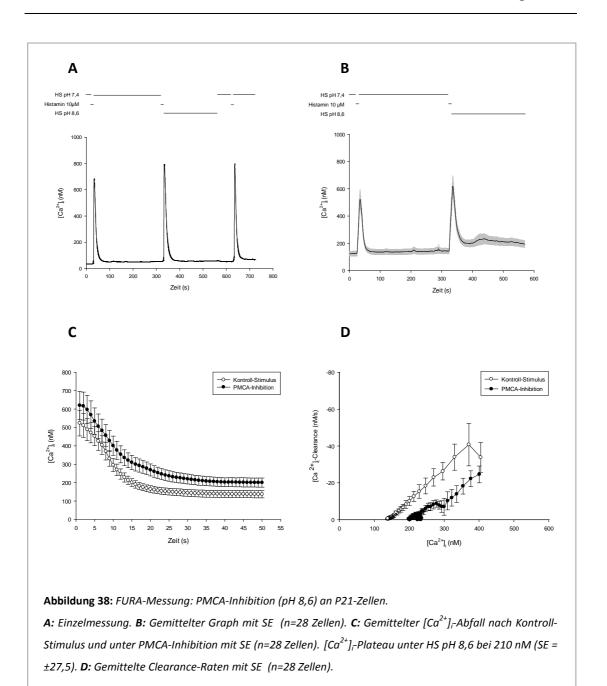
4.9.2 PMCA-Inhibition an P21-Zellen

Die Hemmung der PMCA in P21-Zellen wurde nach demselben Protokoll wie an PC3-Zellen oder DU 145-Zellen vorgenommen (siehe auch 4.4.2). Abbildung 38A zeigt eine Einzelmessung. Die Histamin-Stimulation erfolgte mit 10 μ M über 10 s im Abstand von 300 s. Im Anschluss an die zweite Histamin-Applikation wurde die Zelle mit HS pH 8,6 umspült, bis ein $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau erreicht war. Danach wurde die Zelle wieder mit HS pH 7,4 umspült und ein dritter Stimulus gesetzt.

Da unter Perifusion mit pH 8,6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein Plateau erreicht wurde, ist der Mittelwertgraph in Abb. 38B nur bis zum Messzeitpunkt 580 s dargestellt. Der Standardfehler der gemittelten $[Ca^{2+}]_i$ lag zwischen minimal $\pm 17,9$ nM und maximal $\pm 138,3$ nM - je nach Messzeitpunkt. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ lag nach dem Kontroll-Stimulus bei im Mittel 137,3 nM (SE = $\pm 19,9$). Im Mittel erfolgte eine $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance unter PMCA-Inhibition bis zu einer $[Ca^{2+}]_i$ von 210 nM (SE = $\pm 27,5$). Danach blieb die $[Ca^{2+}]_i$ auf diesem Plateau, bis wieder erneut mit HS pH 7,4 umspült wurde.

Bei einer $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -40,2 nM/s und unter PMCA-Inhibition bei -22,7 nM/s (Abb. 38C). Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Kontroll-Clearance-Rate bei -15,3 nM/s, während die Clearance-Rate unter Inhibition bei -5,5 nM/s lag.

Die Hemmung der PMCA bedingte eine deutliche Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance in allen Konzentrationsbereichen (Abb. 38D). Vor allem in basalen [Ca²⁺]_i-Bereichen der P21-Zellen wirkte sich eine Inhibition der PMCA merklich aus.



4.9.3 SERCA-Inhibition an P21-Zellen

Im Gegensatz zu der SERCA-Hemmung in den bereits beschriebenen Zelllinien, konnte eine Inhibition bei der P21-Zelllinie in Ca²⁺-haltigem Medium durchgeführt werden. In Vorversuchen zeigte sich keine übermäßige [Ca²⁺]_i-Verschiebung in P21-Zellen. Wie in Abbildung 39A dargestellt, wurden die Einzelmessungen durchgeführt. Die Zelle wurde insgesamt dreimal – im Abstand von 300 s - über 10 s mit 10 μM Histamin stimuliert. 10 s bevor die zweite Stimulation durchgeführt wurde, wurde die Zelle mit 15 μM CPA umspült, um zu gewährleisten, dass CPA bei einem maximalen [Ca²⁺]_i-Anstieg unter Histamin-Stimulation auch in ausreichender Konzentration am ER wirken konnte. Die Zelle wurde im weiteren Verlauf so lange mit CPA umspült, bis sich ein Plateau eingestellt hatte. In der exemplarischen Messung lag dies bei 151,4 nM. Anschließend erfolgte nach einer Umspülung mit HS pH 7,4 eine dritte Stimulation.

Der Mittelwertgraph in Abb. 39B ist bis zum Messpunkt 600 s dargestellt. Der Standardfehler dieser gemittelten Werte lag zwischen minimal $\pm 13,5$ nM und maximal $\pm 112,8$ nM - je nach Messzeitpunkt. Dabei lag das erreichte $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau im Mittel bei 247,65 nM (SE = $\pm 22,28$). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ erreichte unter CPA-Perifusion nicht mehr das Ausgangsniveau von 119,54 nM (SE = $\pm 13,93$). Die maximale $[Ca^{2+}]_i$ unter Histamin-Stimulation lag im Mittel bei 692,9 nM (SE = $\pm 82,9$) bei dem Kontroll-Stimulus und bei 850,5 nM (SE = $\pm 94,4$) unter Inhibition.

In den aus Abb. 39C berechneten Clearance-Raten zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Kontroll-Stimulus und SERCA-Inhibition. Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -42,7 nM/s und unter Inhibition bei -14,5 nM/s. Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ erfolgte der $[Ca^{2+}]_{i}$ -Abfall nach dem Kontroll-Stimulus mit -18,5 nM/s, während der unter SERCA-Inhibition mit -13,9 nM/s erfolgte.

Die Umspülung von P21-Zellen mit 15 μ M CPA führte zu einer deutlichen Einschränkung der $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance – vor allem im Bereich der basalen $[Ca^{2+}]_i$.

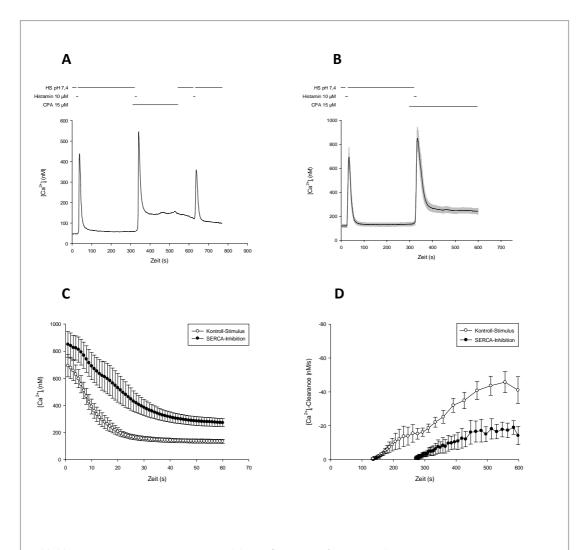


Abbildung 39: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an P21-Zellen.

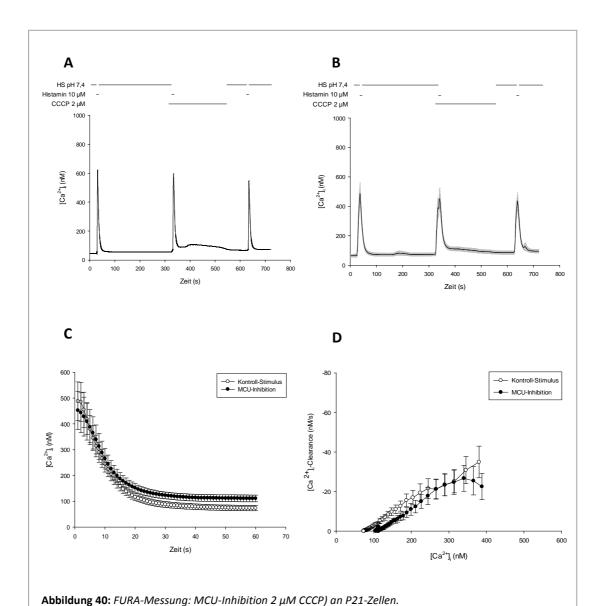
A: Einzelmessung. **B**: Gemittelter Graph mit SE (n=33 Zellen. **C**: Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ -Abfall nach Kontroll-Stimulus und unter SERCA-Inhibition mit SE (n=33 Zellen). $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Plateau unter CPA-Perifusion 247,65 nM (SE = $\pm 22,28$). **D**: Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=33 Zellen). Clearance-Raten unterscheiden sich in allen $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Bereichen. Die basale $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ wird nicht mehr erreicht.

4.9.4 MCU-Inhibition an P21-Zellen

Eine Hemmung des mitochondrialen Uniporters erfolgte nach demselben Protokoll wie bei der DU 145-Zelllinie (siehe auch 4.4.4). Es wurden drei Histaminstimuli (10 μ M) von jeweils 10 s in Abstand von 300 s gesetzt (Abb.40A). 10 s vor der zweiten Histamin-Gabe erfolgte die Perifusion mit 2 μ M CCCP, bis eine stabile [Ca²+] $_i$ erreicht war. Im Anschluss wurde die Zelle erneut mit HS pH 7,4 umspült, bevor der dritte Stimulus gesetzt wurde. Während der CCCP-Perifusion zeigten die P21-Zellen eine hohe Rate an spontanen [Ca²+] $_i$ -Anstiegen. Diese Messungen wurden bewusst nicht in die Auswertung mit eingeschlossen, da ansonsten keine Auswertung der Clearance-Rate mehr möglich gewesen wäre. Bei den gemittelten Messungen in Abbildung 40B lag der Standardfehler zwischen minimal \pm 10,3 nM und maximal \pm 81 nM. Insgesamt zeigte sich ein Abfall der der [Ca²+] $_i$ nach Histamin-Stimulation unter Inhibition im Vergleich zum Kontroll-Stimulus fast deckungsgleich (Abb.36A und 40C). Allein im basalen Bereich lag die [Ca²+] $_i$ unter CCCP-Perifusion um 37,43 nM höher als beim Kontroll-Stimulus.

Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ lag die Clearance-Rate des Kontroll-Stimulus bei -23,2 nM/s und unter Inhibitionsbedingungen bei -23,8 nM/s (Abb. 40D). Vergleicht man die Clearance bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$, so lag hier die Clearance des Kontroll-Stimulus bei -14,3 nM/s und unter Inhibition bei -9,4 nM/s.

Unter MCU-Inhibition zeigte sich die [Ca²⁺]_i-Clearance von P21-Zellen in den annähernd vergleichbar zur Kontroll-Clearance.



A: MCU-Inhibition (2 μ M CCCP) an P21-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=19 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall mit SE nach Kontroll-Stimulus und unter MCU-Inhibition mit SE (n=19 Zellen). Basale $[Ca^{2+}]_i$ unter CCCP-Gabe um 37,34 nM höher als unter Kontrollbedingungen. **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=19 Zellen).

4.9.5 NCX-Inhibition an P21-Zellen

Eine Hemmung des NCX wurde in P21-Zellen nach demselben Protokoll wie in DU 145 vorgenommen (Abb. 41A). Der Mittelwertgraph ist in Abbildung 41B dargestellt. Der Standardfehler schwankte bei diesen Messungen zwischen minimal $\pm 12,11$ nM und maximal $\pm 117,18$ – je nach Messzeitpunkt. 300 s nach dem Kontroll-Stimulus, wurde die Zelle erneut über 10 s mit 10 μ M Histamin stimuliert. Direkt im Anschluss wurde die Zelle mit einem LiCl-Puffer umspült, um den NCX zu inhibieren. Diese erfolgte bis zum Messpunkt 500 s. Nach einer Messzeit von insgesamt 620 s wurde ein dritter Stimulus gesetzt. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall nach Histamin-Stimulation zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf unter Inhibitions-Bedingungen wie unter Kontroll-Bedingungen (Abb. 41C). Allerdings lagen die gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Werte unter Inhibition zwischen 60 und 33 nM höher als bei dem Kontroll-Stimulus. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ nach dem Kontroll-Stimulus lag bei 25,4 nM (im Mittel 110,49 nM, SE = 12,26), unter LiCl-Perifusion bei 41,5 nM (im Mittel 122,27 nM, SE = 12,70).

Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ betrug die Kontroll-Clearance-Rate -37,0 nM/s, unter Inhibition -32,2 nM/s (Abb. 41D). Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate nach Kontroll-Stimulation bei -19,2 nM/s und unter LiCl-Perifusion bei -14,7 nM/s.

Der NCX hatte in P21-Zellen in den untersuchten [Ca²⁺]_i-Bereichen einen sehr geringen Einfluss auf die [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate. Die basale Ruhe-[Ca²⁺]_i wurde jedoch noch annähernd erreicht.

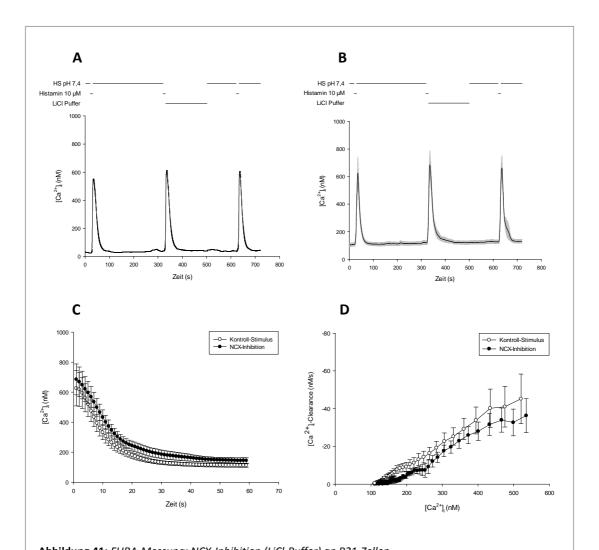


Abbildung 41: FURA-Messung: NCX-Inhibition (LiCI-Puffer) an P21-Zellen. **A:** NCX-Inhibition an P21-Zellen - Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=24 Zellen) **C:** Gemittelter [Ca^{2+}]_{Γ}-Abfall nach Kontroll-Stimulus und unter NCX-Inhibition mit SE (n=24 Zellen). **D:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE (n=24 Zellen).

4.10 P21-Zellen – Kombinierte Inhibition

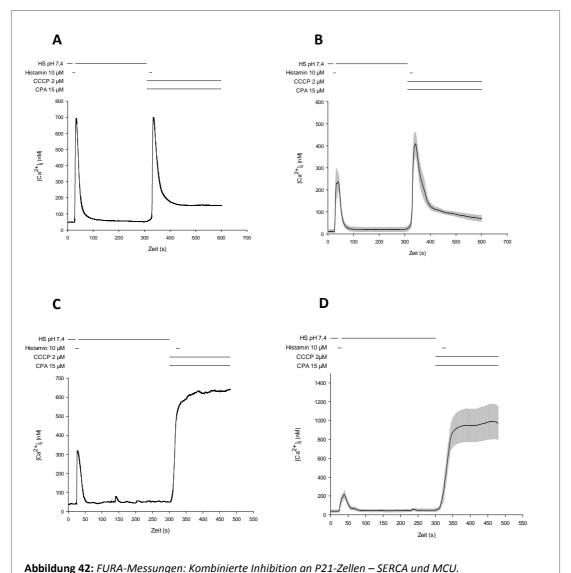
Im Rahmen einer kombinierten Inhibition wurden an der P21-Zelllinie die Clearance-Mechanismen untersucht, die bereits in den Einzel-Inhibitionsversuchen einen größeren Effekt auf die [Ca²⁺]_i-Homöostase der Zellen zeigten.

4.10.1 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen - SERCA und MCU

Bei der kombinierten Inhibition von SERCA und MCU wurden 15 μ M CPA und 2 μ M CCCP gleichzeitig eingesetzt. Weiterhin wurden die Messprotokolle aus Kapitel 4.9.3 und 4.9.4 miteinander kombiniert. 300 s nach dem Kontroll-Stimulus wurde ein zweiter Stimulus gesetzt. Die Zelle wurde jeweils schon 10 s vor dem zweiten Stimulus mit beiden Inhibitoren umspült. Insgesamt wurden 23 Messungen durchgeführt. Entsprechend der Reaktion auf die kombinierte Perifusion mit CCCP und CPA wurden die Ergebnisse in zwei Gruppen unterteilt. Da CCCP ein irreversibler Inhibitor ist und P21-Zellen nach kombinierter Behandlung mit CPA und CCCP nicht mehr auf Histamin reagierten, wurde auf eine dritte Stimulation verzichtet. Gruppe 1 vergleichbare zeigte eine Reaktion zu den Einzelinhibitionsversuchen. Dieser Gruppe waren 14 Messungen zuzuordnen (Abb. 42A,B). Unter Perifusion mit den beiden Inhibitoren fiel die [Ca²⁺]_i bis auf einen Wert von 122,8 nM (SE = ±13,8) ab und blieb im weiteren Verlauf tendenziell auf einem Plateau, 47,75 nM über der basalen [Ca²⁺]_i. Der Standardfehler der gemittelten Messungen schwankt - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal ±8,5 nM und maximal ±71,15 nM.

Zellen, deren Messung zur Gruppe 2 zugeordnet wurden, zeigten unter kombinierter Inhibitor-Gabe einen massiven Anstieg auf eine $[Ca^{2+}]_i$ von im Mittel 972,76 nM (SE = $\pm 171,56$). In Abbildung 42D ist der gemittelte Graph der 9 Messungen, welche diese Reaktion zeigten, dargestellt. Der Standardfehler dieser gemittelten Messungen schwankt - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal $\pm 11,58$ nM und maximal $\pm 184,78$ nM.

Beim Vergleich des gemittelten [Ca²⁺]_i-Abfalls dieser kombinierten Messungen mit alleiniger SERCA-Inhibition zeigten sich deutliche Unterschiede. Das [Ca²⁺]_i-Plateau, welches Gruppe 1 unter Inhibition erreichte, lag um 177,08 nM niedriger als bei alleiniger SERCA-Inhibition. Dagegen liegt es bei der Gruppe 2 um 725,1 nM höher als in den Einzel-Inhibitionsversuchen mit CPA.



A: Einzelmessung: Gruppe 1. **B:** Gemittelter Graph Gruppe 1 mit SE (n=14 Zellen). $[Ca^{2+}]^i$ erreicht annähernd ein Plateau bei 122,8 nM (SE = ±13,8). **C:** Einzelmessung: Gruppe 2. **D:** Gemittelter Graph Gruppe 2 mit SE (n=9 Zellen). $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auf im Mittel 972,76 nM (SE = ±171,56).

4.10.2 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA und PMCA

15 μM CPA wurden in HS pH 8,6 gelöst, um eine kombinierte Inhibition von SERCA und PMCA zu untersuchen. Auch hier erfolgt eine Perifusion mit dem inhibitorisch wirksamen Puffer erst beim zweiten Stimulus. Dieser wurde 300 s nach dem ersten Kontroll-Stimulus gesetzt. Dabei wurde die Perifusion mit CPA 10 s vor Histamin-Applikation, die Umspülung mit HS pH 8,6 direkt im Anschluss an die Stimulation gestartet.

Abbildung 43B zeigt die gemittelten Messwerte mit einem Standardfehler zwischen minimal $\pm 17,52$ nM und maximal $\pm 192,0$ nM - je nach Messzeitpunkt. Die $[Ca^{2+}]_i$ fiel unter Inhibitor-Perifusion auf Werte von im Mittel 235,65 nM (SE = $\pm 42,4$) ab und blieb auf diesem Plateau bis wieder mit HS pH 7,4 umspült wurde. Das $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau lag damit im Mittel 152,74 nM höher als die basale $[Ca^{2+}]_i$ der gemessenen Zellen. Ein dritter Stimulus wurde nach mindestens 630 s gesetzt (Abb. 43A). Da das $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde, ist der Mittelwert-Graph in Abbildung 43B nur bis zum Zeitpunkt 450 s dargestellt.

Das [Ca²⁺]_i-Plateau lag im Mittel um 12 nM niedriger als bei alleiniger Perifusion mit CPA und um 25,65 nM höher als bei alleiniger Perifusion mit HS pH 8,6 (Abb. 43C, 43D).

Die Clearance-Raten unter kombinierter Inhibition sind ähnlich denen bei alleiniger CPA-Perifusion (Abb. 43E). Allein im $[Ca^{2+}]_{i}$ -Bereich ≥ 500 nM ist die errechnete Clearance-Rate unter kombinierter Inhibition effektiver als unter alleiniger Inhibition der SERCA. Bei einer $[Ca^{2+}]_{i}$ von 550 nM beträgt die Clearance-Rate unter kombinierter Inhibition -26,73 nM/s und unter SERCA-Inhibition -17,9 nM/s.

Im Vergleich zur alleinigen PMCA-Inhibition ist der Clearance-Effekt bei $[Ca^{2+}]_i \leq 500$ nM bei kombinierter PMCA-SERCA-Inhibition deutlich geringer (Abb. 43F). Es wurden die Clearance-Raten bei einer $[Ca^{2+}]_i$ von 500 nM, 400 nM und 300 nM verglichen. Diese lagen bei der kombinierten Inhibition bei: -17,2 nM/S, -11,0 nM/s und -5,5 nM/s. Unter PMCA-Inhibition bei -23,9 nM/s, -24,5 nM/s und -7,6 nM/s.

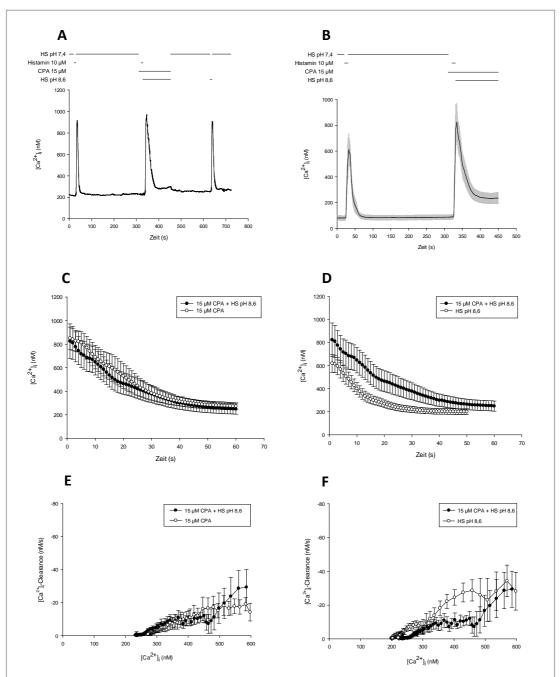


Abbildung 43: FURA-Messungen: Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA und PMCA.

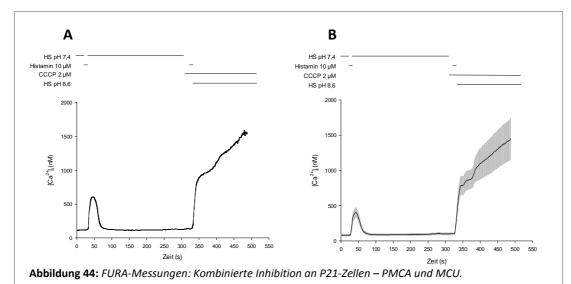
A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=15 Zellen). **C:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter CPA-Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau um 12 nM niedriger bei kombinierter Inhibition . **D:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall mit SE nach Histamin-Stimulation unter HS pH 8,6 Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Um 25,65 nM höheres $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau bei kombinierter Inhibition. **E:** Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance-Rate mit SE nach Histamin-Stimulation unter CPA-Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. \geq 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ Clearance-Rate unter kombinierter Inhibition höher. **F:** Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance-Rate mit SE nach Histamin-Stimulation unter HS pH 8,6 Perifusion versus Perifusion mit CPA in HS pH 8,6. Geringere $[Ca^{2+}]_i$ -Clearance-Rate bei $[Ca^{2+}]_i$

4.10.3 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – PMCA und MCU

Eine kombinierte Inhibition von PMCA und MCU erfolgte durch 2 μ M CCCP in HS pH 8,6. CCCP wurde allerdings 10 s vor dem zweiten Stimulus appliziert. Die Perifusion mit HS pH 8,6 wurde erst direkt nach dem Histamin-Stimulus begonnen.

Abbildung 44A zeigt einen Mittelwertgraphen der 12 durchgeführten Messungen. Der Standardfehler schwankt - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal $\pm 15,85$ nM und maximal $\pm 36,25$ nM. Unter kombinierter Inhibition stieg die $[Ca^{2+}]_i$ kontinuierlich an bis zu einem maximalen Wert von 1554,9 nM, bzw. im Mittel von 1428,3 nM (SE = $\pm 278,7$) zum Ende der Messung.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zu den Einzelinhibitionen mit CCCP und HS pH 8,6. Bei alleiniger Inhibition von MCU und PMCA blieb die Clearance-Rate – wenn auch verlangsamt – erhalten, so dass sich die [Ca²⁺]_i unter Perifusion mit dem Inhibitor auf leicht erhöhte Werte eingependelt hatte. Unter kombinierter Applikation von CCCP und HS pH 8,6 dagegen stieg die [Ca²⁺]_i immer weiter an. Es fand keine Clearance mehr statt.



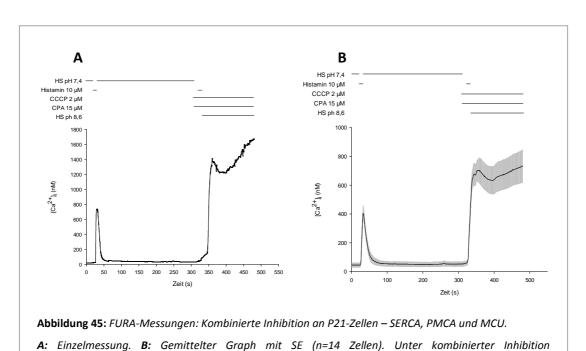
A: Einzelmessung. **B:** Gemittelter Graph mit SE (n=12 Zellen). Kontinuierlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter kombinierter Inhibition, letzter Messpunkt bei 1428,3 nM (SE = \pm 278,7).

4.10.4 Kombinierte Inhibition an P21-Zellen – SERCA, PMCA und MCU

Mit einer Kombination aus 2 μ M CCCP, 15 μ M CPA und HS pH 8,6 wurde SERCA, PMCA und MCU gleichzeitig inhibiert. Die Umspülung mit CCCP und CPA wurde, wie bereits in den anderen Messprotokollen beschrieben, 10 s vor der zweiten Histamin-Stimulation begonnen. Die Perifusion mit HS pH 8,6 wurde dagegen direkt nach Histamin-Gabe gestartet.

Abbildung 45A zeigt den Mittelwertgraphen von insgesamt 14 Messungen. Der Standardfehler schwankt - je nach Messzeitpunkt - zwischen minimal $\pm 10,35$ nM und maximal $\pm 280,17$ nM. Unter Perifusion mit den drei inhibitorisch wirksamen Substanzen stieg die $[Ca^{2+}]_i$ nach Histamin-Stimulation weiter an. Es zeichnete sich erst ein Abfall von 1410,3 nM auf 1218,1 nM ab, bzw. im Mittel von 702,9 nM (SE = $\pm 76,9$) auf 633,1 nM (SE = $\pm 94,8$), dann stieg die $[Ca^{2+}]_i$ weiter bis auf einen maximalen Wert zum Ende der Messung von 1661,7 nM, bzw. 731,6 nM (SE = $\pm 111,6$) (Abb.45).

Unter diesen inhibitorischen Bedingungen findet in P21-Zellen keine Clearance mehr statt. Die [Ca²⁺]_i steigt kontinuierlich an.



kontinuierlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_{i,}$ letzter Messpunkt bei 731,6 nM (SE = ±111,6).

4.11 P21-Zellen – Inhibition nach Androgen-Stimulation

Auch bei der P21-Zelllinie wurde die Aktivität der Ca²⁺-Clearance-Mechanismen in Abhängigkeit von Androgenen untersucht. Aus diesem Grund wurden nach 72 h Stunden Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron FURA-Messungen durchgeführt. Im Vergleich zu dieser Zellgruppe wurde eine andere P21-Zellpopulation über 72 h in Steroid-freiem Medium kultiviert. Es wurden nur die Clearance-Mechanismen bereits untersucht, welche in der Einzelinhibitionsversuchen unter Standardbedingungen einen Effekt auf die [Ca²⁺]_i-Clearance zeigten.

4.11.1 PMCA-Inhibition an P21-Zellen nach Androgen-Stimulation

Die Inhibition der PMCA nach Androgen-Inkubation wurde wie unter 4.9.2 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 46B ist eine exemplarische Messung einer Zelle nach 72 h Androgen-Inkubation dargestellt. Abbildung 46A zeigt den korrespondierenden Graphen einer Zelle der Kontroll-Population, welche in Steroidfreiem chFKS-Medium kultiviert wurde. Es zeigte sich bei beiden exemplarischen Messungen ein Abfall der [Ca²⁺]_i nach Histamin-Stimulation und Perifusion auf ein Plateau von 92,67 nM bei der Kontrolle und 143,64 nM nach Androgen-Inkubation. Die entsprechenden Mittelwertgraphen sind mit Standardfehler in den Abbildungen 46C und D dargestellt. Dieser schwankt je nach Messzeitpunkt: in der Kontroll-Gruppe zwischen minimal ±6,9 nM und maximal ±51,35 nM. In der Androgen-Gruppe schwankt er zwischen minimal ±9,16 nM und maximal ±122,9 nM.

Die Ruhe- $[Ca^{2+}]_i$ der Kontroll-Gruppe lag im Mittel bei 44,8 nM (SE = ±17,6) (Abb. 46C). Nach Androgen-Inkubation lag diese bei im Mittel 42,6 nM (SE = ±11,9) (Abb. 46D). Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Kontroll-Stimulation sowie vor Inhibition lagen bei annähernd ähnlichen Werten. Bei der ersten Stimulation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ der Kontrolle auf 340,86 nM (SE = ±44,12), der Androgen-Gruppe auf 315,56 nM (SE = ±44,2). Bei der zweiten Stimulation zeigte sich ein Peak von 429,7 nM (SE = ±41,38) in der Kontroll-Gruppe, von 429 nM (SE = ±112,8) bei den Androgen-inkubierten

Zellen. Unter Perifusion mit HS pH 8.6 sank die $[Ca^{2+}]_i$ bei der Kontroll-Gruppe auf ein $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau bei im Mittel 105,5 nM (SE = ±22,5), bei den Androgenbehandelten Zellen auf 180 nM (SE = ±40,5). Vergleicht man den Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ in Abbildung 46E so zeigt sich ein Auseinanderweichen der beiden Kurven ab einer $[Ca^{2+}]_i$ von \leq 280 nM.

Die Clearance-Raten unter Inhibition verliefen bis zu einer [Ca²⁺]_i von 230 nM annähernd identisch (Abb. 46F). Im höheren [Ca²⁺]_i-Bereich war die Clearance-Leistung der Androgen-deprivierten Zellen stärker. Bei [Ca²⁺]_{i1t} war die Clearance-Rate der Androgen-Gruppe bei -8,3 nM/s, die der Kontrolle-Gruppe bei -14,1 nM/s. Bei [Ca²⁺]_{i2t} lag die Clearance-Rate der Androgen-stimulierten Zellen bei -3,1 nM/s, die der Kontroll-Population bei -2,8 nM/S.

Eine 72-stündige Inkubation mit Dihydrotestosteron führte zu einer herabgesetzten Clearance-Rate unter PMCA-Inhibition in [Ca²⁺]_i-Bereichen > 230 nM. Bei beiden Zell-Populationen wurde ein [Ca²⁺]_i-Plateau erreicht. In der Androgen-Gruppe lag dieses jedoch im Mittel 74,5 nM höher.

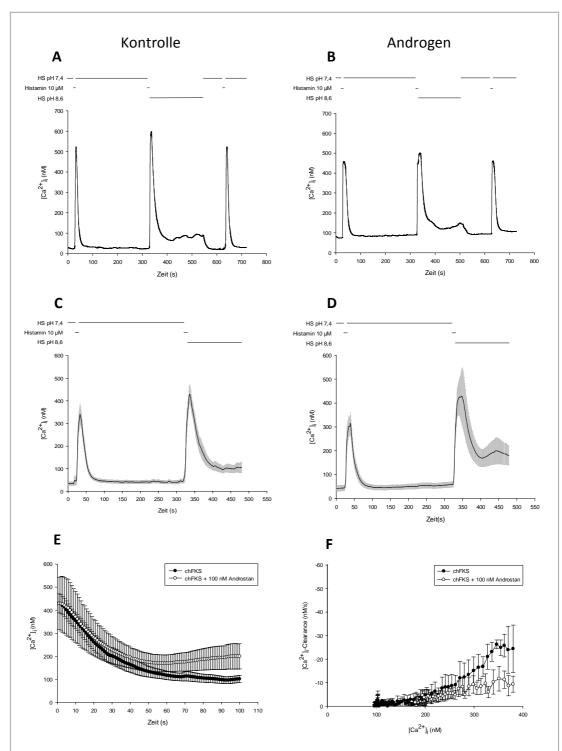


Abbildung 46: FURA-Messung: PMCA-Inhibition (pH 8,6) an P21-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Einzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph mit SE – Kontrolle chFKS (n=16 Zellen). **D:** Gemittelter Graph mit SE – 100 nM Androstan (n=14 Zellen). **E:** Gemittelter [Ca^{2+}]_{Γ}Abfall mit SE unter PMCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. [Ca^{2+}]_{Γ} Plateau in Androstan-Gruppe 74,5 nM höher als in Kontroll-Gruppe. **F:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE unter PMCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. Herabgesetzten Clearance-Rate unter PMCA-Inhibition in [Ca^{2+}]_{Γ}Bereichen > 230 nM bei Androgen-behandelten Zellen.

4.11.2 SERCA-Inhibition an P21-Zellen nach Androgen-Stimulation

Nach 72-stündiger Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron, bzw. in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FKS, wurden FURA-Messungen mit einer SERCA-Inhibition durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen insgesamt zweimal im Abstand von 300 s mit 10 μM Histamin umspült. 10 s vor der zweiten Stimulation wurde die Zelle mit 15 μM CPA perifundiert. Unter CPA-Umspülung sank die [Ca²+]_i sowohl in der Kontroll-Gruppe (Abb. 47A, C) als auch in der Androgen-Gruppe (Abb. 47B, D). Es stellte sich näherungsweise ein [Ca²+]_i-Plateau ein. Da dies zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand, sind die Mittelwertgraphen in Abbildung 47C und 47D nur bis zum Messzeitpunkt 480 s dargestellt. Der Standardfehler der gemittelten Messwerte schwankt je nach Messzeitpunkt: in der Kontroll-Gruppe zwischen minimal ±16,7 nM und maximal ±68,7 nM (Abb. 47C). In der Androgen-Gruppe schwankt er zwischen minimal ±11,0 nM und maximal ±125,6 nM (Abb. 47D).

Die mittlere basale $[Ca^{2+}]_i$ lag bei der Kontrolle bei 55,74 nM (SE = ±17,99), in der Androgen-Gruppe bei 28,91 nM (SE = ±12,25). Nach Kontroll-Stimulation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ der Kontrollepopulation im Mittel auf 434,63 nM (SE = ±37,1), der Androgenbehandelten Zellen auf 528 nM (SE = ±107,98). Unter der zweiten Histamin-Applikation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ in der Kontroll-Gruppe auf 461,53 nM (SE = ±35,3), bei den Androgen-behandelten Zellen auf 519 nM (SE = ±102,97). Unter Perifusion mit 15 μ M CPA stellte sich ein $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau von im Mittel 126,7 nM (SE = ±20,8) bei den Kontroll-Zellen ein, von 90,46 nM (SE = ±16,3) bei der Androgen-Gruppe (Abb. 47E).

Bei $[Ca^{2+}]_{i1t}$ fand sich bei der Androgen-Gruppe eine Clearance-Rate von -20,2 nM/S, bei der Kontrolle von -16,0 nM/s (Abb. 47F). Bei $[Ca^{2+}]_{i2t}$ lag die Clearance-Rate der Androgen-stimulierten Zellen bei -10,7 nM/s, die der Kontrolle bei -8,6 nM/s.

Eine Inkubation mit 100 nM Dihydrotestosteron führte in P21-Zellen bei einer Perifusion mit 15 μ M CPA zu einem [Ca²+]_i-Plateau, welches 61,55 nM über der basalen [Ca²+]_i der Versuchsreihe lag. In der Kontroll-Gruppe lag das Plateau 70,96 nM über der ursprünglichen Ruhe-Konzentration. Die Clearance-Rate unter CPA-

Perifusion zeigte sich rechnerisch in den Androgen-stimulierten Zellen einzig in den höheren $[Ca^{2+}]_{i}$ -Bereichen um wenige Einheiten erhöht.

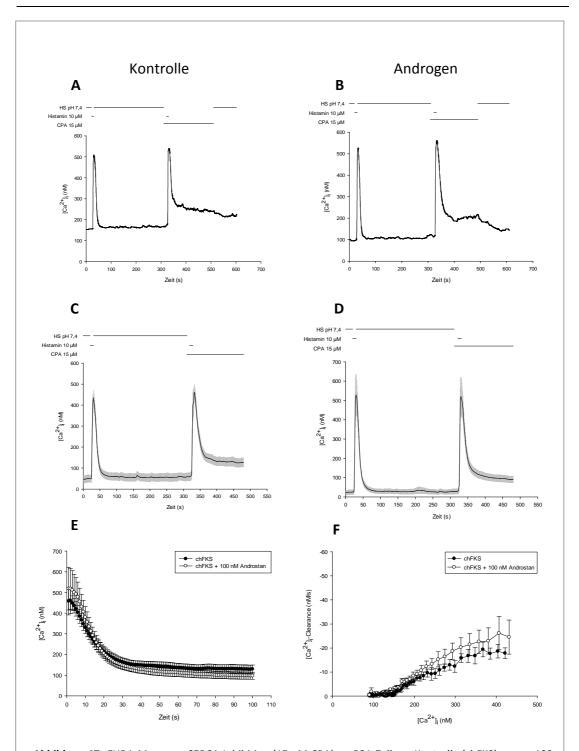


Abbildung 47: FURA-Messung: SERCA-Inhibition (15 μ M CPA) an P21-Zellen - Kontrolle (chFKS) versus 100 nM Androstan.

A: Einzelmessung – Kontrolle: chFKS. **B:** Einzelmessung – 100 nM Androstan. **C:** Gemittelter Graph mit SE – Kontrolle: chFKS (n=8 Zellen). **D:** Gemittelter Graph mit SE – 100 nM Androstan (n=10 Zellen). **E:** Gemittelter $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Abfall mit SE unter SERCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan. $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ Plateau 61,55 nM über der basalen $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ in der Kontroll-Gruppe, 70,96 nM über basaler $[Ca^{2+}]_{\Gamma}$ in Androgen-Gruppe. **F:** Gemittelte Clearance-Raten mit SE unter SERCA-Inhibition – chFKS vs. chFKS + 100 nM Androstan.

4.12 P21-Zellen: Ergebnis-Zusammenfassung

Die Stimulation der P21-Zellen mit 10 μ M Histamin führte zu einem reversiblen und gleichermaßen reproduzierbaren [Ca²⁺]_i-Anstieg.

Auch in dieser Zelllinie hatten PMCA und SERCA den größten Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase. Die Inhibition beider ATPasen führte zu einer deutlichen Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance in allen Konzentrationsbereichen. Die basale [Ca²⁺]_i wurde nicht mehr erreicht. Die Inhibition des MCU oder NCX zeigten nur eine geringfügige erniedrigte Clearance-Leistung.

Eine kombinierte Inhibition von SERCA und MCU führte zu unterschiedlichen Messergebnissen. Unter Inhibition kam es zu einem [Ca²⁺]_i-Plateau oder zu einem massiven [Ca²⁺]_i-Anstieg auf ein Plateau weit über der ursprünglichen Reaktion auf Histamin. Sowohl die kombinierte Inhibition von PMCA und MCU als auch von PMCA, SERCA und MCU führten zu einem massiven [Ca²⁺]_i-Anstieg. Dieser Anstieg zeigte sich bis zum Ende der Messungen.

Die Inkubation über 72 h mit 100 nM Androstan führte zu einer herabgesetzten Clearance-Rate unter PMCA-Inhibition in $[Ca^{2+}]_{i-}$ Bereichen > 230 nM.

4.13 LNCaP-Zellen - Einzelinhibition

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch fluoreszenzphotometrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ an LNCaP-Zellen durchgeführt. Allerdings kam es in dieser Zelllinie zu keinem reversiblen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Histamin. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Messungen an LNCaP-Zellen durchgeführt.

4.14 Qualitative PCR (cDNA): Nachweis der Ca²⁺-Transporter-Isoformen

Um zu untersuchen, welche Isoformen der Ca²⁺-Transporter in PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen exprimiert werden, wurde eine konventionelle qualitative PCR mit cDNA durchgeführt. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich das Expressionsmuster in Abhängigkeit von Androgen ändert. In den Experimenten wurden jeweils – nach RNA-Aufreinigung und reverser Transkription – cDNA von Androgen stimulierten (100 nM Dihydrotestosteron über 72 h) sowie Androgen deprivierten Zellen (Medium mit chFKS über 72 h) eingesetzt. Alle PCR-Analysen wurden mindestens dreimal wiederholt.

4.14.1 PMCA-Isoformen

Es gibt insgesamt vier verschiedene Isoformen der PMCA. In den Abbildung 48 bis 51 ist die Verteilung der Isoformen in den untersuchten Prostatazelllinien – nach Androgen-Stimulation versus Kontrolle - dargestellt. PMCA1 konnte in allen untersuchten Prostata-Zellen sicher nachgewiesen werden (Abb. 48). Im Bezug auf PMCA1 zeigte sich in keiner Zelllinie ein qualitativer Unterschied zwischen Androgen-stimulierten und –unstimulierten Zellen. Eine Expression von PMCA2 konnte in keiner der untersuchten Zelllinien festgestellt werden (Abb. 49). PMCA3 konnte wurde ebenfalls weder in Androgen-stimulierten noch Androgendeprivierten Zellen exprimiert (Abb. 50). PMCA4 war in allen untersuchten Zelllinien – unabhängig von Androgen – nachweisbar (Abb. 51).

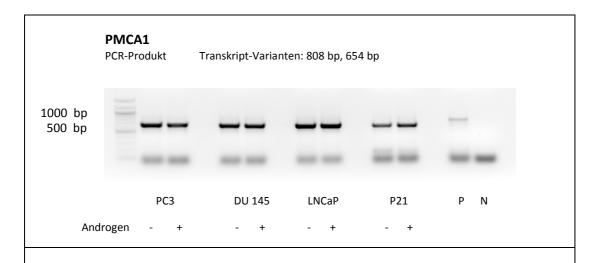


Abbildung 48: Expression von PMCA1 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), N= Negativkontrolle. PMCA1 wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

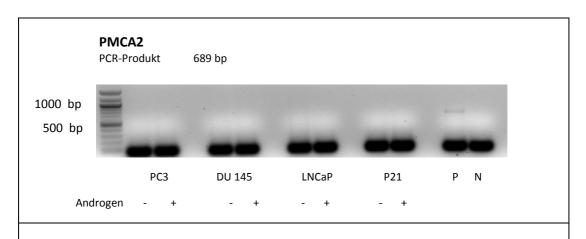


Abbildung 49: Expression von PMCA2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

 $\textbf{\textit{P}=Positivk} ontrolle~(\textit{ZNS}),~\textbf{\textit{N}=Negativk} ontrolle.~PMCA2~wurde~in~keiner~der~untersuchten~Zelllinien~exprimiert.$

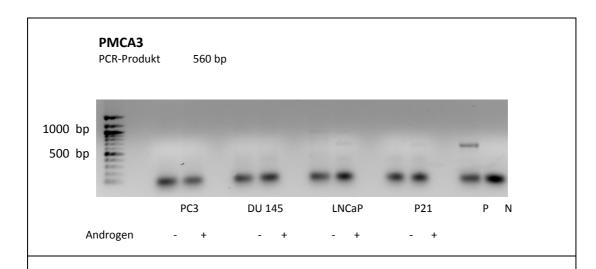


Abbildung 50: Expression von PMCA3 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. PMCA3 wurde in keiner der untersuchten Zelllinien exprimiert.

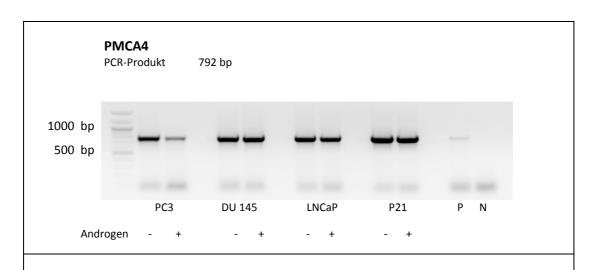


Abbildung 51: Expression von PMCA4 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. PMCA4 wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

4.14.2 SERCA-Isoformen

Die SERCA unterteilt sich in drei verschiedene Isoformen. Ihr Expressionsmuster unterscheidet sich, wie in den Abbildung 52 bis 54 dargestellt. Die Isoform SERCA1 ließ sich im Rahmen der PCR mit cDNA einzig mit sehr schwachen Banden im Bereich der P21-Zellen nachweisen (Abb. 52). SERCA2 dagegen zeigte sich deutlich in allen Zelllinien – unabhängig ob mit oder ohne Androgen-Stimulation (Abb. 53). Auch SERCA3 konnte unabhängig von der Androgen-Inkubation in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 54).

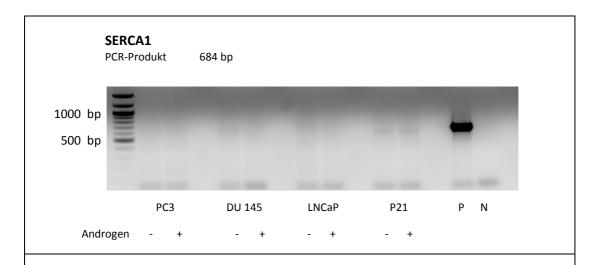


Abbildung 52: Expression von SERCA1 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (Skelettmuskel), **N**= Negativkontrolle. SERCA1 war mit sehr schwachen Banden ini P21-Zellen nachweisbar.

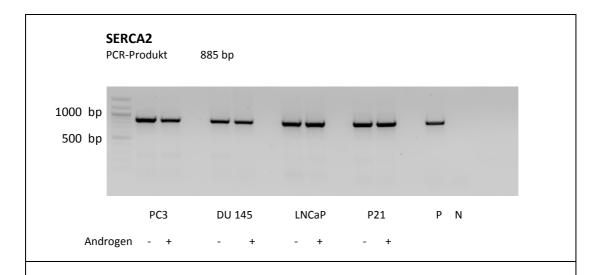


Abbildung 53: Expression von SERCA2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (Skelettmuskel), **N**= Negativkontrolle. SERCA2 wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

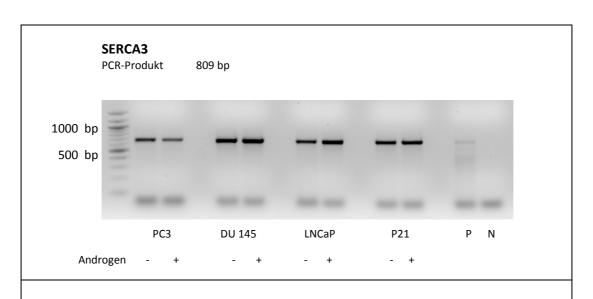


Abbildung 54: Expression von SERC31 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. SERCA3 wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

4.14.2 NCX-Isoformen

Auch die drei Isoformen des NCX zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster in den untersuchten Prostata-Zelllinien. NCX1 war sowohl in PC3-, DU 145- als auch in P21-Zellen nachweisbar (Abb. 55). Es zeigt sich dabei kein Unterschied zwischen Androgen-Stimulation und Kontrolle. LNCaP-Zellen dagegen exprimierten NCX1 nur nach Androgen-Stimulation.

NCX2 konnte mit sehr schwachen Banden in DU 145-Zellen, P21-Zellen und nicht mit Androgen-behandelten LNCaP-Zellen nachgewiesen werden. (Abb. 56). Die Expression von NCX3 konnte einzig in Androgen-deprivierten LNCaP-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 57).

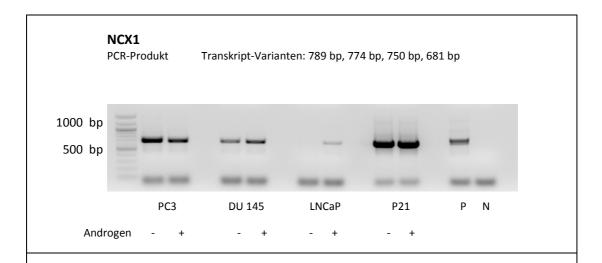


Abbildung 55: Expression von NCX1 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. NCX1 wurde in LNCaP-Zellen nur nach Androgen-Stimulation exprimiert.

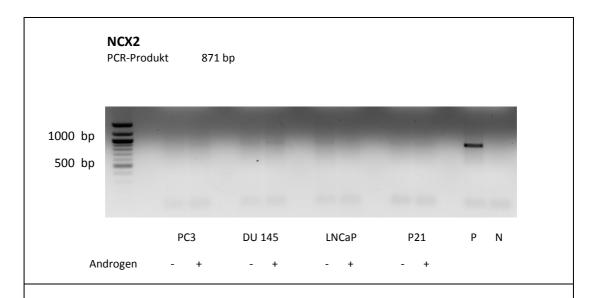


Abbildung 56: Expression von NCX2 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. Sehr schwache Banden waren bei DU 145-Zellen, P21-Zellen und nicht Androgen-behandelten LNCaP-Zellen nachweisbar.

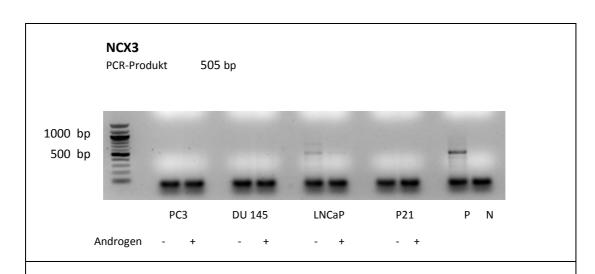


Abbildung 57: Expression von NCX3 in PC3, DU 145, LNCaP und P21.

P= Positivkontrolle (ZNS), **N**= Negativkontrolle. NCX3 wurde allein in Androgen-deprivierten LNCaP-Zellen exprimiert.

4.15 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Nachdem das Expressionsmuster der unterschiedlichen Ca²⁺-Transporter-Isoformen in den Zelllinien untersucht wurde, konnte gezielt eine Genexpressionsanalyse der entsprechenden Isoformen erfolgen. Da sich in den Fluoreszenz-Messungen sowohl PMCA als auch SERCA als Haupt-Clearance-Mechanismen gezeigt hatten, wurden die androgen-abhängige Expression von PMCA1, SERCA2 und SERCA3 in PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen gemessen. Dies geschah, wie bereits bei der qualitativen PCR, mit cDNA von Androgen stimulierten sowie Androgen deprivierten (über jeweils 72 h) Zellen. Die qRT-PCR-Analysen wurden insgesamt jeweils dreimal wiederholt. Pro Analyse wurden jeweils Triplikate gemessen, deren Mittelwerte für die Analyse benutzt wurden.

Sowohl in der PC3 als auch in der LNCaP Zelllinie zeigten sich für PMCA1 hoch (p=0,00542), bzw. höchst signifikante (p=0,000459) Expressionsunterschiede beim Vergleich vor und nach Androgen-Stimulation (Abb. 55). In PC3-Zellen war PMCA1 durch Androgen-Stimulation geringer exprimiert als unter Androgen-Deprivation. Dagegen zeigten die LNCaP-Zellen im Vergleich zur Androgen-Deprivation eine erhöhte Expression von PMCA1 durch Androgen-Stimulation. Weder DU 145 noch P21 Zellen zeigten einen signifikanten Expressions-Unterschied nach Androgen-Stimulation (p=0,544, bzw. p=0,750). Die relative Expression wurde in Bezug gesetzt zu einer Referenz-Probe (ZNS), deren Expressionswert aus Vergleichsgründen auf 1 gesetzt wurde. Die relativen PMCA1-Expressionswerte sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Relative Expression von PMCA1

Die relative Expression ist als Mittelwert ± SE im Bezug auf die Referenzprobe ZNS (=1) dargestellt (n=3 unabhängige Experimente). + = 72 h Dihydrotestosteron; - = 72 h chFKS.

	PC3	PC3	DU 145	DU 145	LNCaP	LNCaP	P21	P21
	-	+	-	+	-	+	-	+
relative Expression	0,728	0,382	0,376	0,419	0,539	1,920	0,733	0,761
(Mittelwert ± SE)	±0,0598	±0,0203	±0,0309	±0,0565	±0,0394	±0,125	±0,0452	±0,0674

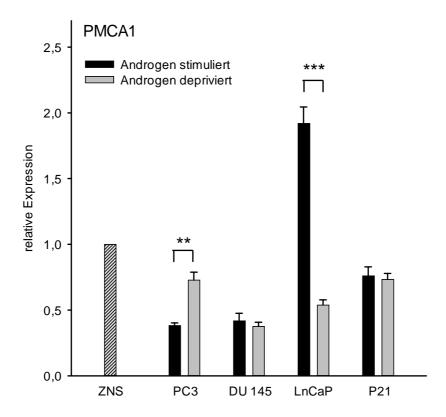


Abbildung 58: qRT-PCR-Analyse mit PMCA1-Assay an Androgen stimulierten und deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen.

Relative Expression in Bezug auf die Positivkontrolle ZNS (Expression=1). PMCA1 war in PC3 Zellen nach Androgen-Stimulation hoch signifkant geringer exprimiert als unter Androgen-Deprivation (p=0,00542). Innerhalb der LNCaP Zellen zeigte sich ein höchst signifkanter Unterschied (p=0,000459). DU 145 sowie P21 Zellen zeigten keine signifikanten Expressionunterschiede durch Androgen-Stimulation (p>0,05).

Die Analyse der SERCA2-Expression wurde auf die Referenz-Probe Muskel bezogen (relative Expression siehe Tab.15). Im Bezug auf Androgen-Abhängigkeit zeigte sich bei keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikanter Unterschied (Abb.56; PC3 p=0,0953; DU 145 p=0,851; LNCaP p=0,259; P21 p=0,113).

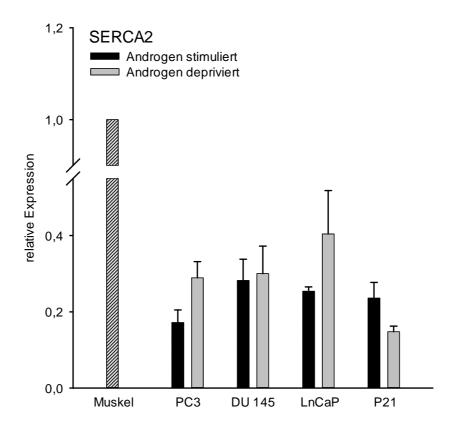


Abbildung 59: qRT-PCR-Analyse mit SERCA2-Assay an Androgen stimulierten und deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen.

Relative Expression in Bezug auf die Positivkontrolle Muskel (Expression=1). In keiner Zelllinie zeigten sich signifikanten Unterschiede der SERCA2-Expression durch Androgenstimulation (p>0,05).

Tabelle 15: Relative Expression von SERCA2

Die relative Expression ist als Mittelwert \pm SE im Bezug auf die Referenzprobe Muskel (=1) dargestellt (n=3 unabhängige Experimente). + = 72 h Dihydrotestosteron; - = 72 h chFKS.

	PC3	PC3	DU 145	DU 145	LNCaP	LNCaP	P21	P21
	-	+	-	+	-	+	-	+
relative Expression	0,289	0,172	0,300	0,282	0,404	0,254	0,148	0,236
(Mittelwert ± SE)	±0,0426	±0,0330	±0,0722	±0,0559	±0,114	±0,0116	±0,0144	±0,0410

Die qRT-PCR-Analyse von SERCA3 offenbarte eine Androgen-abhängige Expression in PC3 und LNCaP Zellen (Abb. 57). Die relative Expression der ATPase innerhalb der PC3 Zellen war durch Androgenstimulation signifikant geringer (p=0,022), während diese in LNCaP Zellen signifikant erhöht war (p=0,012). Weder in DU 145 Zellen noch in P21 Zellen konnte ein signifikanter Expressionsunterschied durch Androgen-Behandlung nachgewiesen werden (p=0,873; bzw. p=0,107). Die relativen Expressionswerte zeigt Tabelle 16 im Bezug auf die Referenz-Probe Muskel (=1).

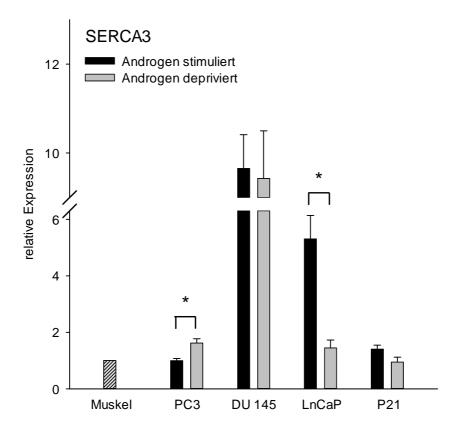


Abbildung 60: qRT-PCR-Analyse mit SERCA3-Assay an Androgen stimulierten und deprivierten PC3, DU 145, LNCaP und P21 Zellen.

Relative Expression in Bezug auf die Positivkontrolle Muskel (Expression=1). SERCA3 war in PC3 Zellen nach Androgen-Stimulation signifikant geringer exprimiert als unter Androgen-Deprivation (p=0,022). Auch innerhalb der LNCaP Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p=0.012). DU 145 sowie P21 Zellen zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede durch Androgenstimulation (p>0,05).

Tabelle 16: Relative Expression von SERCA3

Die relative Expression ist als Mittelwert \pm SE im Bezug auf die Referenzprobe Muskel (=1) dargestellt (n=3 unabhängige Experimente). + = 72 h Dihydrotestosteron; - = 72 h chFKS.

	PC3	PC3	DU 145	DU 145	LNCaP	LNCaP	P21	P21
	-	+	-	+	-	+	-	+
relative Expression	1,621	0,996	9,430	9,654	1,449	5,307	0,948	1,405
(Mittelwert ± SE)	±0,152	±0,0778	±1,067	±0,759	±0,279	±0,830	±0,172	±0,139

4.16 Fluoreszenzmarkierung der SERCA

Um die Lokalisation und Verteilung der SERCA innerhalb der Zelle zu untersuchen, wurde eine Fluoreszenzmarkierung mittels 1 μ M Bodipy-Thapsigargin in den unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt (Abb. 61). Das Fluoreszenz-Signal zeigte sich bei allen vier Zellarten netzartig im gesamten Zytosol verteilt. Ein besonders dichter SERCA-Besatz findet sich ringförmig unmittelbar um den Zellkern. Dies entspricht einer typischen Verteilung des Endoplasmatischen Retikulums.

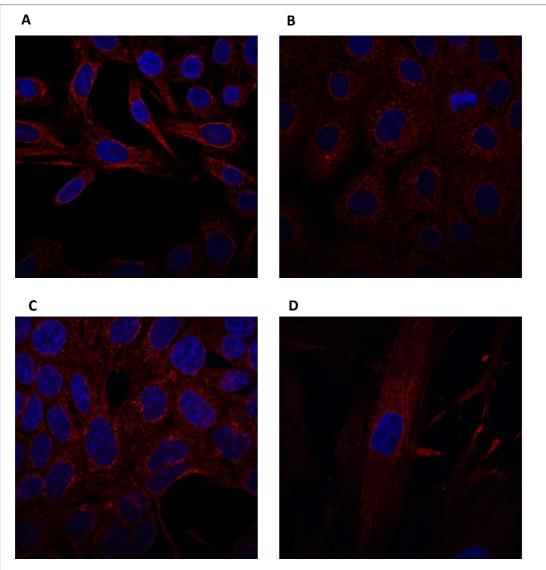


Abbildung 61: Fluoreszenzmarkierung der SERCA

Die Abbildung wurde in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen wurden nach Ethanolfixierung mit 1 μM Bodipy-Thapsigargin (rotes Signal) und DAPI(blaues Signal) behandelt. **A:** PC3-Zelllinie. **B:** LNCaP-Zelllinie. **C:** DU 145-Zelllinie. **D:** P21-Zelllinie.

5 Diskussion

Im Rahmen unterschiedlicher zellulärer Prozesse kann Ca²⁺ sehr vielseitig und komplex interagieren [Berridge et al., 2003]. Dies geschieht über eine Aktivierung oder Inhibierung zellulärer Signalwege, bzw. Ca²⁺-bindender Proteine. Umso weniger ist es daher verwunderlich, dass Ca²⁺ auch im Rahmen der Tumorgenese eine Rolle zu spielen scheint [Lee et al., 2011; Monteith et al., 2012; Monteith et al., 2007; Parkash et al., 2010]. Denn Ca²⁺ kontrolliert eine Vielzahl an Abläufen, die für die Tumorgenese relevant sind, wie Angiogenese, Proliferation, Gentranskription oder auch Apoptose. Eine Reihe von Studien zeigen bereits Veränderungen in Expression oder Aktivität verschiedener Ca²⁺-Transporter in unterschiedlichen Karzinom-Typen [Lee et al., 2011]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität solcher Pumpen, die für die Ca²⁺-Clearance verantwortlich sind (PMCA, SERCA, MCU und NCX), in stromalen und karzinoiden Zelllinien der Prostata untersucht.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen:

- (I.) PMCA und SERCA sind die wichtigsten Ca²⁺-Clearance-Mechanismen in PC3-, DU145- und P21-Zellen.
- (II.) Eine Inkubation mit Androgen führt zu einer veränderten Ca²⁺-Clearance-Leistung, bzw. Expression beider ATPasen in PC3 und/oder DU 145 führt, obwohl diese Zellen eigentlich als Androgen-unabhängig gelten.
- (III.) Die unterschiedlichen Prostata-Zelllinien weisen enorme Unterschiede in der Regulation ihres Ca²⁺-Haushaltes auf.

Obwohl es sich bei drei der vier untersuchten Zelllinien um epitheliale Zellen der Prostata handelte, zeigten diese untereinander und im Vergleich zur stromalen P21-Zelllinie bereits ohne Inhibitions-Bedingungen Unterschiede. Mit der LNCaP-Zelllinie konnten gar keine Messungen der Ca²⁺-Clearance-Leistung erfolgen, da diese Zellen keinen [Ca²⁺]_i-Anstieg nach Histamin-Applikation zeigten. Auch andere extrazellulär verabreichte Substanzen/Puffer (z.B. hoch Kalium-haltiger Puffer, Menthol, ATP

oder Dihydrotestosteron) konnten in den androgen-abhängigen epithelialen Zellen keinen reversiblen und reproduzierbaren [Ca²⁺]_i-Anstieg evozieren. Diese Beobachtungen wurden bereits von Wasilenko et al. beschrieben [Wasilenko et al., 1997]. Ein weiterer großer Unterschied innerhalb der untersuchten Prostata-Zelllinien war die basale [Ca²⁺]_i sowie die maximale [Ca²⁺]_i nach Histamin-Stimulation. Beides fiel bei den PC3-Zellen wesentlicher geringer aus als in DU 145. Wasilenko et al. beschrieben zwar bereits, dass die basale [Ca²⁺]_i in DU 145-Zellen höher liegt als in PC3-Zellen. Allerdings beobachteten sie - im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit - einen geringeren [Ca²⁺]_i-Anstieg nach Histamin-Gabe in PC3 und eine höheren in DU 145. In den beschriebenen Experimenten umspülten Wasilenko und Kollegen die Zellen mit 100 µM Histamin, während in dieser Arbeit maximal 20 μM eingesetzt wurden. Die basale und maximale [Ca²⁺]_i in P21-Zellen war vergleichbar mit den in DU 145 gemessenen Werten. Lee et al. konnten zeigen, dass der [Ca²⁺]_i-Anstieg in PC3-Zellen durch Histamin H1-Rezeptor vermittelt ist [Lee et al., 2001]. So kommt es G-Protein-vermittelt über den Inositolphospholipid-Signalweg zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER [Jutel et al., 2009]. Weiterhin konnten Lee und Kollegen zeigen, dass ein Teil des [Ca²⁺]_i-Anstieges durch den Einstrom extrazellulären Ca²⁺ hervorgerufen wird. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt, da die maximale [Ca²⁺]_i nach Histamin-Applikation in Ca²⁺freiem Milieu nicht signifikant geringer ausfiel als unter Standardbedingungen.

Obwohl PC3-, DU 145- und LNCaP-Zellen denselben epithelialen Ursprung haben, zeigten sie dennoch massive Unterschiede in der Ruhe-[Ca²+]_i sowie in der Reaktion auf Histamin. Dies lässt den Schluss zu, dass sich diese Zellen im Rahmen der Tumorgenese, des Tumorprogress und des damit verbundenen Selektionsdruckes zunehmend voneinander entfernt haben. Eine Sonderstellung nehmen die P21-Zellen ein. Diese stromale Zelllinie, welche sich aus myoiden und fibroiden Zellen zusammensetzt, zeigte im Verlauf der Messungen immer wieder [Ca²+]_i-Anstiege ohne vorangegangen Stimulation. Solche Messungen wurden, sofern diese Spontan-Aktivität in den Inhibitions-Zeitraum fiel, von der Auswertung ausgeschlossen. Die basale und maximale [Ca²+]_i nach Histamin-Applikation zeigte sich vergleichbar mit den gemessen Werten in DU 145-Zellen.

PMCA und SERCA zeigten sich als Haupt-Clearance-Mechanismen in allen untersuchten Zelllinien. Dennoch fanden sich auch hier Unterschiede. Für die [Ca²+]_i-Homöostase in der PC3-Zelllinie sind vor allem SERCA und PMCA wichtig. Eine - im Vergleich zum Einfluss der beiden genannten ATPasen - moderate Einschränkung der Clearance-Rate zeigte sich unter MCU-Inhibition. Den geringsten Einfluss hat NCX im untersuchten [Ca²+]_i-Bereich auf die Clearance-Rate der PC3-Zellen. Auch in der DU 145-Zelllinie sind PMCA und SERCA die Haupt-Clearance-Mechanismen. MCU ist nur in geringem Maße beteiligt, NCX gar nicht. In der P21-Zelllinie haben ebenfalls PMCA und SERCA den größten Einfluss auf die [Ca²+]_i-Clearance. MCU sowie NCX scheinen gar keine Rolle im untersuchten [Ca²+]_i-Bereich zu spielen.

In allen drei Zelllinien stellte sich im Verlauf der PMCA-Inhibition ein Plateau ein. Dabei sank die [Ca²⁺]_i bei Normalisierung der extrazellulären Protonenkonzentration wieder auf ihren Ausgangswert. Auch ohne vorangegangen Stimulation durch Histamin führte eine Inhibition der PMCA zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i. Dieses Verhalten zeigt eindrücklich die zentrale Rolle von PMCA in der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase. Ohne die Ca²⁺-Clearance-Leistung der ATPase konnte in keiner der untersuchten Zelllinien die basale [Ca²⁺]_i aufrecht erhalten werden. Die gleiche Reaktion der [Ca²⁺]_i auf PMCA-Inhibitions-Bedingungen mit erniedrigter Protonenkonzentration konnte bereits in murinen Spermatozoen gezeigt werden [Wennemuth et al., 2003]. Auch hier stellt PMCA den Hauptclearance-Mechanismen dar. Ebenso zeigte sich bei der Untersuchung der Clearance-Mechanismen in neurohypophysären Nervenendigungen von Ratten eine Beteiligung der PMCA [Sasaki et al., 2005]. Sasaki et al. inhibierten die PMCA jedoch durch die Applikation von 300 μM La³⁺ und nicht durch eine erniedrigte Protonenkonzentration. Die Inhibition führte jedoch ebenfalls zu einem erhöhten [Ca²⁺]_i-Plateau. Allerdings kam es ohne vorangegangenen [Ca²⁺]_i-Anstieg zu keiner Reaktion auf La³⁺. PMCA wurde bereits in einer Reihe anderer Zellen als einer der Haupt-Clearance-Mechanismen nachgewiesen: z.B. murine Kleinhirn-Neuronen [Ivannikov et al., 2010]PC12-Zelllinie [Duman et al., 2008] und humane Thrombozyten [Redondo et al., 2005].

Die Clearance-Rate unter PMCA-Inhibition war bei DU 145-Zellen und P21-Zellen im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich eingeschränkt. Bei den untersuchten PC3-Zellen zeigte sich keine Clearance-Einschränkung im hohen [Ca²+]_i-Bereich. Während das [Ca²+]_i-Plateau bei PC3 und DU 145 3-mal bzw. 3,5-mal höher lag, als die ursprüngliche Ruhe-Konzentration, lag das Plateau nur 1,5-fach erhöht bei P21-Zellen. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass PMCA in den untersuchten Zelllinien den größten Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Ruhe-[Ca²+]_i in DU 145-Zellen hat. Dass die PMCA in den untersuchten Zelllinien vor allem bei der Aufrechterhaltung der basalen [Ca²+]_i agiert, entspricht dem bisherigen Wissen über PMCA. Dieser membranständige Transporter besitzt eine hohe Affinität aber nur eine geringe Transport-Kapazität für Ca²+ [Brini, 2009].

In den drei untersuchten Zelllinien zeigte neben PMCA auch SERCA eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der [Ca²⁺]_i-Clearance. Die am ER lokalisierte ATPase ist bekanntermaßen v.a. in Muskelzellen hauptsächlich in die Ca²⁺-Clearance involviert. Abhängig von der Spezies werden in Kardiomyozyten 70% - 92% der [Ca²⁺]_i durch die SERCA transportiert [Bers, 2002].

Eine Inhibition von SERCA durch CPA führt, abhängig vom Zell-Typ, zu einem unterschiedlichen Verhalten der [Ca²⁺]_i. Zum einen besteht eine kontinuierliche Ca²⁺-Leckage am ER. Diese kommt erst bei einer Inhibition der SERCA zum Tragen, welche der Leckage eigentlich entgegenwirkt. So kommt es zu einer Entleerung des ERs. Weiterhin konnte in vielen Zell-Typen bereits sog. "Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current" (CRAC) nachgewiesen werden [Lewis, 2011]. So ein "store-operated Ca²⁺ entry" (SOCE) wurde bereits in LNCaP-, PC3- und DU 145-Zellen beobachtet [Furuya et al., 1994; Skryma et al., 2000] . Auch in der vorliegenden Arbeit führte die Inhibtion von SERCA zu einem massiven [Ca²⁺]_i-Anstieg. Diese Erhöhung wurde am ehesten durch einen Ca²⁺-Einstrom verursacht. Eine CPA-Applikation in Ca²⁺-freiem Milieu konnte nämlich den zuvor beobachteten [Ca²⁺]_i-Anstieg verhindern. In P21-Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Dies könnte am ehesten auf die myoide Abstammung der Zelllinie zurückzuführen sein. Physiologischerweise ist die SOC-Aktivität und Expression – im Gegensatz zum Skelettmuskel - in glatten

Muskelzellen und adulten Kardiomyozyten nur gering oder gar nicht nachweisbar [Trebak et al., 2013].

Sowohl in PC3-Zellen als auch in DU 145-Zellen zeigte der [Ca²⁺]_i-Abfall unter CPA-Gabe in Ca²⁺-freiem Puffer zwei Phasen: eine steile Phase in höheren [Ca²⁺]_i-Bereichen, gefolgt von einer flacheren exponentiellen Abfall mit einer Clearance-Rate < 1 nM/s bis zur basalen [Ca²⁺]_i. Letzt genannte Phase nimmt bei PC3-Zellen 60% des gesamten [Ca²⁺]_i-Abfalls ein, in DU 145-Zellen jedoch nur 15%. Allerdings zeigt sich in beiden epithelialen Zelllinien eine Einschränkung der Ca²⁺-Clearance im gesamten [Ca²⁺]_i-Bereich. In P21-Zellen fiel die [Ca²⁺]_i unter Inhibition mit geminderter Clearance-Rate auf ein Plateau ab. Dabei lag das Plateau 17% höher als die basale [Ca²⁺]_i. Innerhalb der untersuchten Zelllinien hat SERCA den größten Einfluss in PC3-Zellen hat. Auch Purkinje-Zellen von Ratten ist SERCA als Haupt-Clearance-Mechanismus beschrieben [Fierro et al., 1998]. Allerdings blieb bei diesen Zellen die basale [Ca²⁺]_i unbeeinflusst durch die Inhibition der SERCA, so dass die Versuche in Ca²⁺-haltigem Puffer durchgeführt werden konnten. SERCA-Pumpen dominieren ebenfalls die [Ca²⁺]_i-Clearance in murinen β-Zellen des Pankreas [Chen et al., 2003]. Auch in den Versuchen von Chen und Kollegen wurde die Ruhe-[Ca²⁺]_i der Zellen durch die SERCA-Inhibition nicht verändert. Der [Ca²⁺]_i-Anstieg durch Depolarisation fiel jedoch in deren Experimenten unter CPA-Gabe doppelt so hoch aus wie in den Kontrollstimuli. Auch in PC3-Zellen fiel der [Ca²⁺]_i-Anstieg durch Histamin unter CPA-Gabe 1,6-fach höher aus, als bei dem Kontroll-Stimulus. In P21-Zellen fiel der Peak unter Inhibition 1,3-fach höher aus. In DU 145-Zellen war kein Unterschied zu verzeichnen. Das lässt den Schluss zu, dass die [Ca²⁺]_i in DU 145-Zellen nach Histamin-Stimulation in so hohe Bereiche ansteigt, dass der Einfluss der SERCA auf die Clearance nur noch gering ausgeprägt ist. Dagegen scheint der maximale [Ca²⁺]_i-Anstieg unter Histamin in den anderen beiden Zelllinien in einem Bereich zu liegen, in dem die SERCA noch maßgeblich an der [Ca²⁺]_i-Clearance beteiligt ist, vor allem in PC3-Zellen. Der enorme Einfluss von SERCA auf die Ca²⁺-Homöostase sowie deren Verbindung zu SOCE und damit einhergehender Apoptose sind derzeit im Fokus der Forschung. Eine mögliche Behandlung des Prostatakarzinoms bietet der Einsatz Thapsigargin (irreversibler Inhibitor der SERCA) oder dessen Analoga. Als PSA-aktiviertes Therapeutikum kann diese Substanzgruppe in Prostata-Krebs-Zellen die Apoptose einleiten[Christensen et al., 2009; Furuya et al., 1994]. Im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie soll der Nutzen des Einsatzes eines Thapsigargin-Derivates in der palliativen Karzinomtherapie untersucht werden (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01056029).

Der Einfluss von MCU auf die Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase zeigt innerhalb der untersuchten Zelllinien deutliche Unterschiede. Einzig in PC3-Zellen konnte eine Einschränkung der [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate unter MCU-Inhibition (CCCP-Applikation) über den gesamten untersuchten Ca²⁺-Bereich beobachtet werden. Weiterhin kam es in dieser Zelllinie zu einer deutlichen Erhöhung der Ruhe-[Ca²⁺]_i. Diese blieb unter Inhibition doppelt so hoch wie die ursprüngliche basale [Ca²⁺]_i. In DU 145-Zellen zeigte sich nur ein geringer Effekt auf die Ca²⁺-Clearance durch MCU-Inhibition. Die basale [Ca²⁺]; wurde wieder erreicht. In P21-Zellen blieb die Clearance-Rate unverändert. Der Einfluss des Protonophores CCCP auf die Ca²⁺-Clearance ist auch in anderen Zellen sehr unterschiedlich, vor allem der Einfluss auf die basale [Ca²⁺]_i. In Ratten-Purkinje-Zellen [Fierro et al., 1998] sowie Säugetier-Neuronen aus dem Ncl. basalis [Tatsumi et al., 1993] oder Hippocampus [Nowicky et al., 1998] zeigte sich ein Anstieg der basalen [Ca²⁺], durch Protonophore/ Entkoppler der Atmungskette. Fierro et al. konnten den Anstieg der Ruhe-[Ca²⁺]_i durch extrazelluläre Ca²⁺-freie Bedingungen nicht verhindern. Es kam also im Rahmen dieser Studie zu einer Entleerung intrazellulärer Speicher. Um auszuschließen, dass diese Entleerung durch einen ATP-Mangel und den damit verbundenen Ausfall ATP-abhängiger Ca²⁺-Pumpen verursacht wurde, wurden die Zellen zum Teil zusätzlich mit ATP-haltigem Puffer durchspült. Dabei zeigte sich keine Veränderung des [Ca²⁺]_i-Anstiegs auf CCCP. Nowicky und Duchenne dagegen konnten in hippocampalen Neuronen den [Ca²⁺]_i-Anstieg unter CCCP-Applikation durch Ca²⁺-freie Bedingungen extrazellulär unterdrücken. In differenzierten PC12-Zellen konnten Duman et al. eine verminderte Clearance unter CCCP-Gabe beobachten, jedoch nicht bei undifferenzierten PC12-Zellen [Duman et al., 2008]. In chromaffinen Zellen der Nebennieren von Ratten konnte gezeigt werden, dass MCU [Ca²⁺]_i-Clearance maßgeblich beeinflusst [Park et die al., 1996].

neurohypophysären Nervenendigungen von Ratten konnten Sasaki und Kollegen ebenfalls eine Beteiligung von MCU an der [Ca²⁺]_i-Clearance feststellen. Auch in diesen Zellen lag die basale [Ca²⁺]_i unter CCCP-Gabe höher als unter Standardbedingungen. In Spermatozoen zeigte sich eine Beteiligung des MCU nur in hohen [Ca²⁺]_i-Bereichen, wenn zusätzlich NCX und PMCA geblockt waren.

Ein Erklärungsansatz für die vergleichsweise geringe Beteiligung des MCU an der Ca²⁺-Clearance in epithelialen Prostatazellen könnte eine daraus resultierende Apoptose-Resistenz sein [Marchi et al., 2013]. Marchi und Kollegen zeigten, dass die Karzinom-spezifische microRNA miR-25 MCU als Ziel hat. Es konnte eine inverse Korrelation zwischen miR-25 Level und MCU mRNA - u. a. in PC3-Zellen - im Vergleich zu primär nicht malignen Zellen nachgewiesen werden. Eine Änderung des miR-25 Levels führte in den beschrieben Experimenten zu einer deutlichen Resistenz bzw. Anfälligkeit für Apoptose-Stimuli.

Den geringsten Einfluss auf die [Ca²⁺]_i-Clearance-Rate der untersuchten Zellen hatte eine Inhibition des NCX durch LiCl-Puffer. Allein in PC3-Zellen zeigte sich eine marginale Einschränkung der Clearance im gesamten gemessenen [Ca²⁺]_i-Bereich. Weder in DU 145-Zellen noch in P21-Zellen konnte ein Einfluss von NCX auf die [Ca²⁺]_i-Clearance sicher nachgewiesen werden. In P21-Zellen zeigten sich zwar geringe Unterschiede in den kalkulierten Clearance-Werten, jedoch ist eine tatsächliche Beteiligung von NCX durch den überlappenden Standardfehler (Kontroll-Clearance vs. Inhibition) fraglich. NCX besitzt als membranständiger Austauscher zwar eine geringe Ca²⁺-Affinität, jedoch eine sehr große Transportkapazität [Brini et al., 2011]. Daher ist dieser Austauscher speziell für die Clearance großer Mengen intrazellulären Ca²⁺ geeignet, ohne Energie in Form von ATP zu verbrauchen. Von besonderer Bedeutung ist dieser Transporter für erregbare Zellen, da in dieser Zellgruppe supramikromolare [Ca²⁺]_i-Anstiege entstehen. So massive Ca²⁺-Verschiebungen wurden in den durchgeführten Versuchen innerhalb der Prostata-Zellen nicht gemessen. Eine Beteiligung des NCX an der [Ca²⁺]_i-Clearance konnte in murinen Spermatozoen [Wennemuth et al., 2003] und β-Zellen des Pankreas [Chen et al., 2003, in der PC12-Zelllinie [Duman et al., 2008], sowie in Purkinje-Zellen [Fierro et al., 1998] und chromaffinen Zellen von

Ratten gezeigt werden [Park et al., 1996]. In neurohypophysären Nervenendigungen von Ratten dagegen konnten Sasaki et al. keinen Einfluss des NCX auf die [Ca²⁺]_i-Clearance feststellen [Sasaki et al., 2005]. Allerdings waren die gemessenen [Ca²⁺]_i-Anstiege auch hier nur im nM-Bereich. Bemerkenswert ist jedoch in diesem Kontext, dass in PC3-Zellen, obwohl die [Ca²⁺]_i weit unter dem μM-Bereich lag, eine marginal verringerte Clearance-Rate durch NCX-Inhibition gemessen wurde. Diese Beobachtung kann verschiedene Ursachen haben. Es ist bereits bekannt, dass es bei einem Abfall der extrazellulären [Ca²⁺] zu einer Funktions-Umkehr des NCX kommen kann [Allen et al., 2003]. Dies lässt vermuten, dass auch wenn der NCX nicht maßgeblich an der Clearance beteiligt ist, ein plötzlicher zusätzlicher Influx von Ca²⁺ zu einer abgeschwächten Netto-Clearance-Rate führen kann. Weiterhin könnte Li⁺, welches die Zelle permiiert, die [Ca²⁺]_i-Homöostase in PC3-Zellen unabhängig von NCX modulieren. Li⁺ kann zu einem Anstieg des second messengers Inositol 1,4,5-Triphosphat (InsP₃) führen. Dieser wiederum kann seinerseits Ca²⁺ aus dem ER freisetzen kann [Dixon et al., 1994; Hokin, 1993]. Warum solche Effekte nur in den PC3-Zellen beobachten waren und nicht in DU 145- oder P21-Zellen, könnte an den vergleichsweise niedrigen [Ca2+];-Werten liegen. Somit können in PC3-Zellen unter Umständen auch kleinste Veränderungen der [Ca²⁺]_i-Homöostase augenscheinlich werden.

Die kombinierte Inhibition mehrerer Ca²⁺-Transporter konnte die im Rahmen der Einzel-Inhibition gewonnen Resultate bestätigen. Die epithelialen Zelllinien (PC3 und DU 145) konnten bei einer kombinierten Inhibition von mindestens zwei Ca²⁺-Transportern ihre basale [Ca²⁺]_i nicht wieder erreichen. In der stromalen P21-Zelllinie war die Ca²⁺-Homöostase der Zelle bei gleichzeitiger Blockade von SERCA und MCU sowie von SERCA und PMCA nur gering beeinflusst. In beiden Versuchsreihen waren die Zellen in der Lage, die [Ca²⁺]_i wieder zu senken. Bei gleichzeitiger Inhibition von allen drei Transportern, oder bei einer Kombination von PMCA- und MCU-Inhibition war keine Ca²⁺-Clearance mehr möglich. Im Gegensatz zu den epithelialen Zellen scheinen die stromalen Zellen den Ausfall eines zweiten Ca²⁺-Transporters also grundsätzlich besser zu verkraften. Warum jedoch sowohl in der PC3-Zelllinie, als auch in der P21-Zelllinie die maximale [Ca²⁺]_i unter dreifacher

Inhibition geringer ausfiel, als wenn nur zwei Transporter blockiert wurden, bleibt fraglich. Möglicherweise kann es zu Wechselwirkungen zwischen CPA, CCCP und einer erniedrigten Protonenkonzentration kommen. Im Rahmen der kombinierten Inhibition von PMCA und MCU zeigte sich innerhalb der P21-Zellen eine unterschiedliche Reaktion. Am wahrscheinlichsten ist diese Reaktion auf die zwei unterschiedlichen Zellarten innerhalb der P21-Zelllinie (myoid und fibroid) zurückzuführen.

Testosteron und dessen Derivate nehmen im Bereich der Prostata-Erkrankungen eine besondere Rolle ein [Imamoto et al., 2008; Nicholson et al., 2011]. Auch wenn die genaue Rolle von Androgenen in der Entwicklung des Prostatakarzinoms noch nicht genau geklärt ist, wirkt eine Androgendeprivation dem Krankheitsprogress entgegen. Ähnliches gilt auch für die BPH. Insbesondere der 10-fach potentere Metabolit Dihydrotestosteron (DHT), welcher lokal durch das Enzym $5-\alpha$ -Reduktase aus Testosteron gebildet wird, ist Angriffspunkt des Therapieregimes beider o.g. prostatischen Erkrankungen.

Es ist daher naheliegend, dass eine Inkubation mit DHT über 72 h unter Umständen auch Einfluss auf den Ca²⁺-Haushalt haben könnte. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass DHT die Aktivität und Expression der untersuchten Ca²⁺-Clearance-Mechanismen beeinflussen kann. Die Clearance-Aktivität von PMCA in P21-Zellen und SERCA in DU 145-Zellen zeigte sich durch DHT-Inkubation vermindert. Im Gegensatz dazu wurde eine effektivere Clearance-Leistung von SERCA nach DHT-Behandlung in PC3 gemessen. Auch im Rahmen molekularbiologischen Untersuchung zeigten sich Unterschiede. konventionellen PCR konnte einzig in LNCaP ein Unterschied in der Isoformen-Verteilung von NCX in Folge von DHT nachgewiesen werden. Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR zeigten eine signifikant geringere Expression von SERCA3 in DHT-behandelten PC3-Zellen und signifikant höhere Expression in DHT-behandelten LNCaP-Zellen. Hochsignifikant waren auch die Expressionsunterschiede von PMCA1 in beiden Zelllinien.

Es ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass DHT die Genexpression über die Bindung an den Androgenrezeptor (AR) verändern kann. Durch die Bindung von Androgenen an den AR kommt es zu dessen Konformations-Änderung innerhalb der Ligandenbindungs-Domäne sowie zur Phoshporylierung des AR. Dies führt zur Translokation des Rezeptors in den Nucleus, wo die Bindung sog. *androgen response elements* die Transkription spezifischer Gene einleitet [Brinkmann et al., 1999]. Diese Tatsache erklärt, warum in der Androgen-abhängigen LNCaP- und P21-Zelllinie oben genannte Veränderungen durch DHT zu beobachten waren. Umso erstaunlicher ist es, dass DHT in PC3 und auch in DU 145-Zellen eine Wirkung zeigte. In beiden Zelllinien konnte nämlich bisher ein AR weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden [van Bokhoven et al., 2003].

Eine Erklärung dieses - auf den ersten Blick - widersprüchlichen Sachverhaltes findet sich im Abbauweg von DHT innerhalb des Prostata-Epithels. DHT wird durch die Enzym-Gruppe der Aldo-Keto-Reductasen (AKR) inaktiviert [Luu-The et al., 2008; Penning et al., 2009]. In der Prostata wurden drei verschiedene Isoformen dieses Enzyms exprimiert: AKR1C2 metabolisiert DHT zu 3α -Androstanediol, AKR1C1 bildet 3β -Androstanediol und AKR1C3 reduziert Δ 4-Androstene-3,17-dion zu Testosteron.

Es ist bekannt, dass 3α -Androstanediol nur eine geringe Affinität zum AR hat. Diesem Derivat wird eigentlich keine androgene Wirkung zugesprochen. Dennoch gibt es einige Studien, die einen androgenen Effekt von 3α -Androstanediol zeigten. Walsh und Wilson konnten bereits 1976 durch 3α -Androstanediol eine Prostatahypertrophie in kastrierten Hunden hervorrufen [Walsh et al., 1976]. Shaw et al. zeigten eine virilisierende Wirkung in Beuteltieren [Shaw et al., 2006]. Es ist also ein naheliegender Schluss, dass 3α -Androstanediol zum hochwirksamen DHT oxidiert werden kann. Dieser Schritt wird durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) katalysiert, die überwiegend oder ausschließlich oxidativ arbeiten. Mohler und Kollegen identifizierten das Enzym 17β -HSD6 in der Prostata als DHT-Produzenten [Mohler et al., 2011]. Daher kann 3α -Androstanediol über die Rückführung in DHT also eine androgene Wirkung zur Folge haben. Allerdings beobachteten Yang et al. AR-unabhängige Änderungen der Genexpression durch 3α -Androstanediol in PC3-Zellen und AR-silenced LNCaP-Zellen [Yang et al., 2008].

Über welche AR-unabhängigen Signalwege diese Änderungen vermittelt wurden, ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

3β-Androstanediol, das Produkt der AKR1C1, gilt als potenter Ligand des Östrogen β Rezeptors (ERβ) in der Prostata [Dondi et al., 2010; Guerini et al., 2005]. ERβ wird auch in PC3-, DU 145- und LNCaP-Zellen exprimiert [Lau et al., 2000]. Janssen und Kollegen wiesen auch in der P21-Zelllinie Östrogen-Rezeptoren nach, jedoch ohne genaue Unterscheidung der Isoformen [Janssen et al., 2000]. Als Mitglied der Familie der nukleären Rezeptoren ist auch ERβ in der Lage, als Transskriptionsfaktor zu agieren und somit die Genexpression spezifischer Gene zu beeinflussen.

Sowohl 3α -Androstanediol, als auch 3β -Androstanediol könnten also im Rahmen der gezeigten Experimente für Veränderungen der Aktivität und Genexpression von SERCA und PMCA verantwortlich sein.

Weiterhin beobachteten Antognelli et al. eine veränderte Genexpression von Glyoxalase durch Testosteron in der LNCaP-Zelllinie, aber auch in der AR-negativen PC3-Zelllinie [Antognelli et al., 2007]. Die Änderungen der Genexpression wurde durch die Induktion von oxidativem Stress, bzw. durch die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erklärt. Tatsächlich kann v.a. bei einer Androgen-Ablation, aber auch durch Androgen-Stimulation der Level von ROS signifikant ansteigen [Shiota et al., 2011]. Allerdings setzt dieser Erklärungsansatz die Existenz eines Androgenrezeptors voraus. Dies wiederum kann die Androgen-abhängigen Veränderungen der Ca²⁺-Clearance-Aktivität und Genexpression von PMCA, bzw. SERCA in LNCaP- und P21-Zellen erklären. Solche Änderung wurden als Folgen von oxidativem Stress bereits für PMCA und SERCA in unterschiedlichen Zell-Arten beschrieben: humane Linsen-Epithelial-Zellen, pankreatische Acinus-Zellen, glatte Muskelzellen und Neuronen [Baggaley et al., 2008; Marian et al., 2008; Trebak et al., 2010; Zaidi, 2010]. Abhängig von der Konzentration, kann ROS entweder stimulierend oder inhibitorisch auf PMCA und SERCA wirken. Weiterhin sind nicht alle Isoformen dieser Transporter im selben Maße betroffen.

Epitheliale und stromale Prostata-Zellen zeigten Ähnlichkeiten in der Art und Weise, wie sie ihren Ca²⁺-Haushalt regulieren, aber auch Unterschiede. Insbesondere

innerhalb der schon Jahrzehnte etablierten epithelialen Prostata-Zelllinien, die als in-vitro-Modell des Prostatakarzinoms genutzt werden, fanden sich enorme Abweichungen. Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit, dass Androgene einen Effekt auf eigentlich als Androgen-unabhängig bekannte Zellen haben. Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit, die Rolle von Androgenen in der Entwicklung und dem Progress von prostatischen Erkrankungen zu überdenken und gibt diesem Themenkreis damit auch eine neue Perspektive.

6 Literaturverzeichnis

- Algarte-Genin M, Cussenot O, Costa P (2004) Prevention of prostate cancer by landrogens: experimental paradox or clinical reality. Eur Urol 46: 285-294; discussion 294-285
- 2. Allen DG, Xiao XH (2003) Role of the cardiac Na+/H+ exchanger during ischemia and reperfusion. Cardiovasc Res 57: 934-941
- 3. Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004) Pharmacology of brain Na+/Ca2+ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. Pharmacol Rev 56: 633-654
- 4. Antognelli C, Del Buono C, Baldracchini F, Talesa V, Cottini E, Brancadoro C, Zucchi A, Mearini E (2007) Alteration of glyoxalase genes expression in response to testosterone in LNCaP and PC3 human prostate cancer cells. Cancer Biol Ther 6: 1880-1888
- 5. Arbabian A, Brouland JP, Gelebart P, Kovacs T, Bobe R, Enouf J, Papp B (2010) Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. Biofactors 37: 139-149
- 6. Aumuller G (1983) Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. Prostate 4: 195-214
- 7. Bachert C (2002) The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. Allergy 57: 287-296
- 8. Baggaley EM, Elliott AC, Bruce JI (2008) Oxidant-induced inhibition of the plasma membrane Ca2+-ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria. Am J Physiol Cell Physiol 295: C1247-1260
- 9. Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 226: 1209-1211
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature 476: 341-345

- 11. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 517-529
- 12. Berry PA, Maitland NJ, Collins AT (2008) Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. Mol Cell Endocrinol 288: 30-37
- 13. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 415: 198-205
- 14. Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2007) Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. J Clin Invest 117: 1647-1657
- 15. Bonkhoff H, Remberger K (1998) Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. Virchows Arch 433: 195-202
- 16. Bostwick DG (1996) Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. Cancer 78: 330-336
- 17. Brini M (2009) Plasma membrane Ca(2+)-ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role. Pflugers Arch 457: 657-664
- 18. Brini M, Carafoli E (2009) Calcium pumps in health and disease. Physiol Rev 89: 1341-1378
- Brini M, Carafoli E (2011) The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. Cold Spring Harb Perspect Biol 3
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J (1999) Mechanisms of androgen receptor activation and function. J Steroid Biochem Mol Biol 69: 307-313
- 21. Brouland JP, Gelebart P, Kovacs T, Enouf J, Grossmann J, Papp B (2005) The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. Am J Pathol 167: 233-242

- 22. Bunting PS (2002) Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. Clin Chim Acta 315: 71-97
- 23. Chen L, Koh DS, Hille B (2003) Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. Diabetes 52: 1723-1731
- 24. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159
- 25. Christensen SB, Skytte DM, Denmeade SR, Dionne C, Moller JV, Nissen P, Isaacs JT (2009) A Trojan horse in drug development: targeting of thapsigargins towards prostate cancer cells. Anticancer Agents Med Chem 9: 276-294
- 26. Dash RK, Qi F, Beard DA (2009) A biophysically based mathematical model for the kinetics of mitochondrial calcium uniporter. Biophys J 96: 1318-1332
- 27. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature 476: 336-340
- 28. Denmeade SR, Isaacs JT (2005) The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. Cancer Biol Ther 4: 14-22
- 29. Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008) The plasma membrane Ca2+ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. Arch Biochem Biophys 476: 65-74
- 30. Dixon JF, Hokin LE (1994) Lithium stimulates accumulation of second-messenger inositol 1,4,5-trisphosphate and other inositol phosphates in mouse pancreatic minilobules without inositol supplementation. Biochem J 304 (Pt 1): 251-258
- 31. Dondi D, Piccolella M, Biserni A, Della Torre S, Ramachandran B, Locatelli A, Rusmini P, Sau D, Caruso D, Maggi A, Ciana P, Poletti A (2010) Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. Endocr Relat Cancer 17: 731-742
- 32. Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2011) After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. EMBO J 30: 4119-4125

- 33. Duman JG, Chen L, Hille B (2008) Calcium transport mechanisms of PC12 cells. J Gen Physiol 131: 307-323
- 34. Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008) Calcium and signal transduction. Biochem Mol Biol Educ 36: 175-180
- 35. Fierro L, DiPolo R, Llano I (1998) Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. J Physiol 510 (Pt 2): 499-512
- 36. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca2+-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. Oncogene 22: 7858-7861
- 37. Frick J, Aulitzky W (1991) Physiology of the prostate. Infection 19 Suppl 3: S115-118
- 38. Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT (1994) The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. Cancer Res 54: 6167-6175
- 39. Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoi-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P (2008) CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. J Biol Chem 283: 10162-10173
- 40. Giovannucci E (2001) Medical history and etiology of prostate cancer. Epidemiol Rev 23: 159-162
- 41. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260: 3440-3450
- 42. Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, Martini PG, Katzenellenbogen BS, Martini L, Motta M, Poletti A (2005) The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. Cancer Res 65: 5445-5453

- 43. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G (2008) The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. Can J Urol 15: 3866-3871
- 44. Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. Nat Rev Neurosci 4: 121-130
- 45. Henderson SA, Goldhaber JI, So JM, Han T, Motter C, Ngo A, Chantawansri C, Ritter MR, Friedlander M, Nicoll DA, Frank JS, Jordan MC, Roos KP, Ross RS, Philipson KD (2004) Functional adult myocardium in the absence of Na+-Ca2+ exchange: cardiac-specific knockout of NCX1. Circ Res 95: 604-611
- 46. Heron A, Rouleau A, Cochois V, Pillot C, Schwartz JC, Arrang JM (2001) Expression analysis of the histamine H(3) receptor in developing rat tissues. Mech Dev 105: 167-173
- 47. Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca2+ loads from rat adrenal chromaffin cells. Neuron 16: 219-228
- 48. Heytler PG, Prichard WW (1962) A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. Biochem Biophys Res Commun 7: 272-275
- 49. Hokin LE (1993) Lithium increases accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices in species ranging from mouse to monkey. Adv Enzyme Regul 33: 299-312
- 50. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Biologie in unserer Zeit 37
- 51. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA (1980) The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. Prog Clin Biol Res 37: 115-132
- 52. Ikura M, Osawa M, Ames JB (2002) The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. Bioessays 24: 625-636

- 53. Imamoto T, Suzuki H, Yano M, Kawamura K, Kamiya N, Araki K, Komiya A, Nihei N, Naya Y, Ichikawa T (2008) The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer. Int J Urol 15: 472-480
- 54. Ivannikov MV, Sugimori M, Llinas RR (2010) Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons. Cell Calcium 47: 507-513
- 55. Jaffe LF (2005) A calcium-based theory of carcinogenesis. Adv Cancer Res 94: 231-263
- 56. Janssen M, Albrecht M, Moschler O, Renneberg H, Fritz B, Aumuller G, Konrad L (2000) Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. Prostate 43: 20-30
- 57. Jeon D, Yang YM, Jeong MJ, Philipson KD, Rhim H, Shin HS (2003) Enhanced learning and memory in mice lacking Na+/Ca2+ exchanger 2. Neuron 38: 965-976
- 58. Jutel M, Akdis M, Akdis CA (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. Clin Exp Allergy 39: 1786-1800
- 59. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol 17: 16-23
- 60. Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech Histochem 70: 220-233
- 61. Klein D (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 8: 257-260
- 62. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM (2000) Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. Cancer Res 60: 3175-3182
- 63. Laursen M, Bublitz M, Moncoq K, Olesen C, Moller JV, Young HS, Nissen P, Morth JP (2009) Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. J Biol Chem 284: 13513-13518

- 64. Lee JM, Davis FM, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2011) Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca(2+) signaling in tumorigenesis: role of Ca(2+) transport. Am J Physiol Cell Physiol 301: C969-976
- 65. Lee KC, Chang HT, Chou KJ, Tang KY, Wang JL, Lo YK, Huang JK, Chen WC, Su W, Law YP, Jan CR (2001) Mechanism underlying histamine-induced intracellular Ca2+ movement in PC3 human prostate cancer cells. Pharmacol Res 44: 547-552
- 66. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. Oncogene 26: 7380-7385
- 67. Lehen'kyi V, Prevarskaya N (2011) Study of TRP Channels in Cancer Cells.
- 68. Lewis RS (2011) Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 3
- 69. Luu-The V, Belanger A, Labrie F (2008) Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 22: 207-221
- 70. Lytton J (2007) Na+/Ca2+ exchangers: three mammalian gene families control Ca2+ transport. Biochem J 406: 365-382
- 71. Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, Bononi A, Corra F, Giorgi C, De Marchi E, Poletti F, Gafa R, Lanza G, Negrini M, Rizzuto R, Pinton P (2013) Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. Curr Biol 23: 58-63
- 72. Marian MJ, Mukhopadhyay P, Borchman D, Tang D, Paterson CA (2008) The effect of hydrogen peroxide on sarco/endoplasmic and plasma membrane calcium ATPase gene expression in cultured human lens epithelial cells. Open Ophthalmol J 2: 123-129
- 73. Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevee N, Rossier MF, Prevarskaya N (2002) Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. J Biol Chem 277: 10824-10833

- 74. Martin V, Bredoux R, Corvazier E, Van Gorp R, Kovacs T, Gelebart P, Enouf J (2002) Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. J Biol Chem 277: 24442-24452
- 75. McNeal JE (1981) The zonal anatomy of the prostate. Prostate 2: 35-49
- 76. Mohler JL, Titus MA, Bai S, Kennerley BJ, Lih FB, Tomer KB, Wilson EM (2011) Activation of the androgen receptor by intratumoral bioconversion of androstanediol to dihydrotestosterone in prostate cancer. Cancer Res 71: 1486-1496
- 77. Molinaro P, Viggiano D, Nistico R, Sirabella R, Secondo A, Boscia F, Pannaccione A, Scorziello A, Mehdawy B, Sokolow S, Herchuelz A, Di Renzo GF, Annunziato L (2011) Na+ -Ca2+ exchanger (NCX3) knock-out mice display an impairment in hippocampal long-term potentiation and spatial learning and memory. J Neurosci 31: 7312-7321
- 78. Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ (2012) Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. J Biol Chem
- 79. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ (2007) Calcium and cancer: targeting Ca2+ transport. Nat Rev Cancer 7: 519-530
- 80. Mülhardt C (2009) Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg
- 81. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-273
- 82. Nicholson TM, Ricke WA (2011) Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. Differentiation 82: 184-199
- 83. Nowicky AV, Duchen MR (1998) Changes in [Ca2+]i and membrane currents during impaired mitochondrial metabolism in dissociated rat hippocampal neurons. J Physiol 507 (Pt 1): 131-145

- 84. Numata Y, Terui T, Okuyama R, Hirasawa N, Sugiura Y, Miyoshi I, Watanabe T, Kuramasu A, Tagami H, Ohtsu H (2006) The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. J Invest Dermatol 126: 1403-1409
- 85. Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B (1996) Ca2+ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. J Physiol 492 (Pt 2): 329-346
- 86. Parkash J, Asotra K (2010) Calcium wave signaling in cancer cells. Life Sci 87: 587-595
- 87. Penning TM, Byrns MC (2009) Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. Ann N Y Acad Sci 1155: 33-42
- 88. Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007) SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve 35: 430-442
- 89. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature 467: 291-296
- 90. Pfaffl M (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum
- 91. Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE (2004) Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. Biochem Biophys Res Commun 322: 1192-1203
- 92. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. Nat Rev Cancer 11: 609-618
- 93. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007) TRP channels in cancer. Biochim Biophys Acta 1772: 937-946
- 94. Prins GS, Korach KS (2008) The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. Steroids 73: 233-244
- 95. Puts CF, Holthuis JC (2009) Mechanism and significance of P4 ATPase-catalyzed lipid transport: lessons from a Na+/K+-pump. Biochim Biophys Acta 1791: 603-611

- 96. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (2004) The sodium/calcium exchanger family-SLC8. Pflugers Arch 447: 543-548
- 97. Redondo PC, Rosado JA, Pariente JA, Salido GM (2005) Collaborative effect of SERCA and PMCA in cytosolic calcium homeostasis in human platelets. Journal of physiology and biochemistry 61: 507-516
- 98. Roberts-Thomson SJ, Curry MC, Monteith GR (2010) Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer. World J Biol Chem 1: 248-253
- 99. Roehrborn CG (2005) Benign prostatic hyperplasia: an overview. Rev Urol 7 Suppl 9: \$3-\$14
- 100. Sasaki N, Dayanithi G, Shibuya I (2005) Ca2+ clearance mechanisms in neurohypophysial terminals of the rat. Cell Calcium 37: 45-56
- 101. Schauer IG, Rowley DR (2011) The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Differentiation 82: 200-210
- 102. Schneider E, Bertron AF, Dy M (2011) Modulation of hematopoiesis through histamine receptor signaling. Front Biosci (Schol Ed) 3: 467-473
- 103. Shaw G, Fenelon J, Sichlau M, Auchus RJ, Wilson JD, Renfree MB (2006) Role of the alternate pathway of dihydrotestosterone formation in virilization of the Wolffian ducts of the tammar wallaby, Macropus eugenii. Endocrinology 147: 2368-2373
- 104. Shiota M, Yokomizo A, Naito S (2011) Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. Free Radic Biol Med 51: 1320-1328
- 105. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N (2000) Store depletion and store-operated Ca2+ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. J Physiol 527 Pt 1: 71-83
- 106. Sperling H, Rossi R, Lümmen G, Rübben H (2004) Testosteron und Prostata. Der Urologe 43: 1092-1096

- 107. Stellwagen NC (2009) Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis 30 Suppl 1: S188-195
- 108. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). Int J Cancer 21: 274-281
- 109. Tatsumi H, Katayama Y (1993) Regulation of the intracellular free calcium concentration in acutely dissociated neurones from rat nucleus basalis. J Physiol 464: 165-181
- 110. Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226: 1211-1213
- 111. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. Nature 405: 647-655
- 112. Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourd'heuil D (2010) Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. Antioxid Redox Signal 12: 657-674
- 113. Trebak M, Zhang W, Ruhle B, Henkel MM, Gonzalez-Cobos JC, Motiani RK, Stolwijk J, Newton RL, Zhang X (2013) What Role for Store-Operated Ca(2+) Entry in Muscle? Microcirculation
- 114. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate 57: 205-225
- 115. Walsh PC, Wilson JD (1976) The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. J Clin Invest 57: 1093-1097
- 116. Wanaverbecq N, Marsh SJ, Al-Qatari M, Brown DA (2003) The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion. J Physiol 550: 83-101
- 117. Wang Q, Symes AJ, Kane CA, Freeman A, Nariculam J, Munson P, Thrasivoulou C, Masters JR, Ahmed A (2010) A novel role for Wnt/Ca2+ signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer. PLoS One 5: e10456

- 118. Waring MJ (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. J Mol Biol 13: 269-282
- 119. Wasilenko WJ, Cooper J, Palad AJ, Somers KD, Blackmore PF, Rhim JS, Wright GL, Jr., Schellhammer PF (1997) Calcium signaling in prostate cancer cells: evidence for multiple receptors and enhanced sensitivity to bombesin/GRP. Prostate 30: 167-173
- 120. Wennemuth G, Babcock DF, Hille B (2003) Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. J Gen Physiol 122: 115-128
- 121. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca2+ channel expression. Biochem Biophys Res Commun 322: 1359-1363
- 122. Xu W, Wilson BJ, Huang L, Parkinson EL, Hill BJ, Milanick MA (2000) Probing the extracellular release site of the plasma membrane calcium pump. Am J Physiol Cell Physiol 278: C965-972
- 123. Yang Q, Titus MA, Fung KM, Lin HK (2008) 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol supports human prostate cancer cell survival and proliferation through androgen receptor-independent signaling pathways: implication of androgen-independent prostate cancer progression. J Cell Biochem 104: 1612-1624
- 124. Zacharias DA, Dalrymple SJ, Strehler EE (1995) Transcript distribution of plasma membrane Ca2+ pump isoforms and splice variants in the human brain. Brain Res Mol Brain Res 28: 263-272
- 125. Zaidi A (2010) Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. World J Biol Chem 1: 271-280

7 Publikationen/Danksagung

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Anne Wolf and Gunther Wennemuth (2013). Ca^{2+} clearance mechanisms in cancer cell lines and stromal cells of the prostate.

Herrn Prof. Dr. Wennemuth danke ich für die interessante Fragestellung, für die Unterstützung, nötige Geduld und wertvollen Ratschläge, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt aber auch meinen ehemaligen Kolleginnen - und nicht zuletzt Freundinnen - Petra Wandernoth und Nadja Mannowetz. Durch ihre Ideen, Anregungen und Diskussions-Bereitschaft motivierten und unterstützen sie mich in meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Weiterhin möchte ich Andrea Rabung und Carolin Richter für ihre sachkundige Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten sowie bei allem, was Zellkultur anbelangte, danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Ann Soether für die Überarbeitung der englischsprachigen Passagen der Dissertation sowie des Papers.

Ein großes Dankeschön gilt selbstverständlich auch der übrigen Arbeitsgruppe!

Zuletzt, aber ganz besonders, danke ich meiner Familie, die mich so tatkräftig unterstützte: meinem Mann, der mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe; meinen Eltern, die mir "auf den letzten Metern" den Rücken frei hielten.