

# **Untersuchungen zur Bedeutung der cyclischen 3', 5' Nucleotid- Phosphodiesterase Typ 1-Aktivität in ZNS-Tumorzellen**

vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation  
(D386)

vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
**Sandra Vatter**

Betreuer:  
Prof. Dr. J.W. Deitmer  
Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2003

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Dezember 1999 und September 2002 in den Fachbereichen Chemie, Fachrichtung „Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie“ und Biologie, Fachrichtung „Allgemeine Zoologie“ der Universität Kaiserslautern

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31. Juli 2003

Prüfungskommission:

- Vorsitzender: Prof. Dr. E. Friauf  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. J.W. Deitmer  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	I
<b>1 Einleitung</b>	1
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	2
<b>2.1 Tumorentstehung</b>	2
<b>2.2 Tumore des ZNS</b>	3
2.2.1 Gliale Tumore	4
<b>2.3 Calcium-Homöostase und Signalling in Gliazellen</b>	8
2.3.1 Der capacitative Calcium-Einstrom (CCE)	10
2.3.2 Calcium-Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen	12
2.3.2.1 Fura-2	12
2.3.2.2 Die Ionophoren 4-bromo-A23187 und Ionomycin	14
2.3.2.3 Der purinerge Rezeptoragonist ATP	15
2.3.2.4 Der SERCA-Inhibitor CPA	16
<b>2.4 Der cAMP-Signalübertragungsweg</b>	17
<b>2.5 Cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterasen</b>	21
2.5.1 Die PDE1-Isoenzymfamilie	24
2.5.2 Die PDE4-Isoenzymfamilie	33
<b>3 Problemstellung</b>	41
<b>4 Material und Methoden</b>	43
<b>4.1 Verwendete Zellen/Zelllinien</b>	43
4.1.1 Zelllinien humanen Ursprungs	43
4.1.1.1 Die Glioblastomzelllinie SNB75	43
4.1.1.2 Die Glioblastomzelllinie SF295	44
4.1.1.3 Die Glioblastomzelllinie SF539	44
4.1.1.4 Die Glioblastomzelllinie SF268	45
4.1.2 Zellen/Zelllinien tierischen Ursprungs	45
4.1.2.1 Primäre Ratten-Astrocyten (Subkultur)	45
4.1.2.2 Die Rattenglioblastomzelllinie C6	48
4.1.2.3 Die Affennierenzelllinie COS-7	49
<b>4.2 Zellkultur</b>	49
4.2.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen	49
4.2.2 Passagieren von Monolayerkulturen	49

---

4.2.3 Zellzahlbestimmung	50
4.2.4 Mycoplasmentest	51
4.2.5 Einfrieren von Zellen	52
4.2.6 Auftauen von Zellen	52
4.2.7 Beschichten von Kulturoberflächen mit Poly-D-Lysin	52
4.2.8 Bestimmung der Verdopplungszeit von Zelllinien	53
<b>4.3 Bestimmung des Karyotyps der Zelllinie SNB75</b>	<b>54</b>
4.3.1 Chromosomen-Präparation aus Monolayerkulturen	54
4.3.2 G-Banden	55
<b>4.4 Sulforhodamin B Assay (SRB-Test)</b>	<b>56</b>
<b>4.5 PDE-Assay</b>	<b>58</b>
4.5.1 Herstellung des Zellysates	59
4.5.2 cAMP-PDE-Assay	60
4.5.3 cGMP-PDE-Assay	63
4.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford	63
<b>4.6 Bestimmung des Gehalts an cyclischen Nucleotiden</b>	<b>64</b>
4.6.1 Aufarbeitung der Zellen für die cAMP-/cGMP-Bestimmung	64
4.6.2 cAMP-Bestimmung	65
4.6.3 cGMP-Bestimmung	66
<b>4.7 Calcium-Imaging</b>	<b>67</b>
4.7.1 Beladen der Zellen mit Fura-2	67
4.7.2 Benötigte Lösungen	68
4.7.3 Video-Imaging	71
4.7.3.1 Aufbau der Meßapparatur	71
4.7.3.2 Durchführung der Messung	72
4.7.3.3 Kalibrierung	72
4.7.3.4 Auswertung	73
<b>4.8 Bestimmung des PDE-Expressionsmusters in Rattenzellen</b>	<b>74</b>
4.8.1 Präparation der mRNA	74
4.8.2 Design der Primer	75
4.8.3 RT-PCR	78
<b>4.9 Klonierung und Expression rekombinanter PDE1C</b>	<b>81</b>
4.9.1 Der Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a	81
4.9.2 Klonierung von pFLAG/1C	81

---

4.9.3 Chemotransformation von Bakterien	82
4.9.4 DNA-Präparation	83
4.9.4.1 Mini-Plasmid-Präparation	83
4.9.4.2 Maxi-Plasmid Präparation	84
4.9.5 Restriktionsanalyse	85
4.9.6 Agarose-Gelelektrophorese	87
4.9.7 Calcium-Phosphat-Transfektion	88
<b>4.10 Verwendete Materialien</b>	<b>90</b>
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>97</b>
<b>5.1 PDE-Aktivität und „second messenger“-Spiegel</b>	<b>97</b>
5.1.1 cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten, C6-Rattenglioblastomzellen und in humanen Glioblastomzellen	97
5.1.2 cAMP- und cGMP-Gehalt in den untersuchten Zellen	106
5.1.3 Ca <sup>2+</sup> -Signalling in Ratten-Astrocyten und C6-Zellen sowie in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295	107
<b>5.2 Einfluß von PDE-Inhibitoren auf das Wachstum ausgewählter Zellsysteme</b>	<b>115</b>
<b>5.3 Etablierung eines Ratten-Zellmodells zur Untersuchung der Bedeutung der PDE1C in ZNS-Tumorzellen</b>	<b>117</b>
<b>5.4 Weitere Charakterisierung der humanen Glioblastomzelllinie SNB75</b>	<b>120</b>
5.4.1 Karyotyp	120
5.4.2 Verdopplungszeit	123
<b>5.5 Klonierung und Expression einer rekombinanten PDE1C</b>	<b>124</b>
<b>6 Diskussion</b>	<b>130</b>
<b>6.1 PDE-Aktivität und „second messenger“-Spiegel</b>	<b>130</b>
<b>6.2 Einfluß von PDE-Inhibitoren auf das Wachstum ausgewählter Zellsysteme</b>	<b>135</b>
<b>6.3 Etablierung eines Ratten-Zellmodells zur Untersuchung der Bedeutung der PDE1C in ZNS-Tumorzellen</b>	<b>139</b>
<b>6.4 Weitere Charakterisierung der humanen Glioblastomzelllinie SNB75</b>	<b>143</b>
<b>6.5 Klonierung und Expression einer rekombinanten PDE1C</b>	<b>144</b>
<b>6.6 Abschließende Betrachtung: Ist die PDE1C ein mögliches Target bei der Therapie von ZNS-Tumoren?</b>	<b>146</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>151</b>
<b>8 Literatur</b>	<b>153</b>

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
ABM	astrocyte basal medium (synthetisches Kulturmedium)
AC	Adenylat-Cyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AGM	astrocyte growth medium (ABM + Zusätze)
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AM	Acetoxymethyl-Ester
5' AMP	5' Adenosinmonophosphat
amp	Ampicillin
AMV	avian myoblastosis virus
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis (2-Aminophenoxy)-ethan-N, N, N', N'-tetraessigsäure
BCNU	Bis-(chloroethyl)-nitrosourea
BME	basal medium Eagle (synthetisches Kulturmedium)
BP	Bindungsprotein
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C6	Rattenglioblastomzelllinie
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calcium-Konzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat
CCE	capacitativer Calcium-Einstrom
cDNA	„copy“ Desoxyribonucleinsäure
cds	coding sequence
cGMP	cyclisches 3', 5' Guanosinmonophosphat
CIF	calcium influx factor
CMV	Cytomegalievirus
cNMP	cyclisches 3', 5' Nucleotidmonophosphat
COS-7	Affennierenzelllinie

CPA	Cyclopiazonsäure
cpm	counts per minute
CRAC	calcium release-activated calcium channel
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CREM	cAMP-responsive element modulator
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC-TA-46 (E481)	7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
DEAE	Diethylaminoethyl
del	Deletion
Delta C <sub>T</sub>	threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
der	derivative
DH5α	<i>E. coli</i> Bakterienstamm
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (synthetisches Kulturmedium)
DMEM+	DMEM mit 4.5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-Pyruvat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E276	7-Benzylamino-6-methyl-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E281	7-Benzylamino-6-methoxy-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E288	6-Chloro-2-piperazino-4,7-dithiazolidino-pteridin
E289	6-Methoxy-2-piperazino-4,7-dithiazolidino-pteridin
E481 (DC-TA-46)	7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E499	6-Chloro-2-piperazino-4,7-dipyrrolidino-pteridin
EC	enzyme classification
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum

FKS	fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
fw	forward
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
G-Banden	Giemsa-Banden
GDP	Guanosindiphosphat
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
5' GMP	5' Guanosinmonophosphat
G <sub>s</sub>	stimulatorisches G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography
HPSF	high purity salt free
HPV	human papilloma virus
hs	<i>Homo sapiens</i>
HU	Hydroxyurea
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration (Substratkonz., bei der im Vergleich zur Kontrolle noch 50% Enzym aktiv ist)
IGF	insulin-like growth factor
IP <sub>3</sub>	Inositol-Triphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-Triphosphat-Rezeptor
kb	Kilobasen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria Bertani
LPA	Lysophosphatylsäure
LXFL529L	lung xenograft Fiebig large (Lungenkarzinomzelllinie)
Lys	Lysin



m/v	Masse pro Volumen
MCS	multiple cloning site
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
8-MeoM-IBMX	8-Methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthin
6-MP	6-Mercaptopurin
mRNA	„messenger“ Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Nucleotid
NCI	National Cancer Institute
5' NMP	5' Nucleotidmonophosphat
NTP	Nucleotidtriphosphat
OD	optical density
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p	postnatal
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE	cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterase
PDL	Poly-D-Lysin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PND	post natal day
PpIX	Protoporphyrin IX
q	langer Arm eines Chromosoms
R	Rezeptor/Rest
R	Fluoreszenzratio
rev	reverse
R <sub>i</sub>	Rezeptor-Protein (inhibierend)
R <sub>max</sub>	Fluoreszenzratio des vollständig gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs
R <sub>min</sub>	Fluoreszenzratio des freien Fluoreszenzfarbstoffs
m	<i>Rattus norvegicus</i>

RNAse	Ribonuclease
ROI	region of interest
rpm	rounds per minute
RPMI 1640	synthetisches Kulturmedium
R <sub>s</sub>	Rezeptor-Protein (stimulierend)
RT	reverse Transcriptase
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RyR	Ryanodin-Rezeptor
Sb <sub>2</sub>	Fluoreszenzemission des vollständig gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs bei $\lambda = 380$ nm
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERCA	sarco-endoplasmatische Retikulum Calcium ATPase
Sf <sub>2</sub>	Fluoreszenzemission des freien Fluoreszenzfarbstoffs bei $\lambda = 380$ nm
SF268	humane Glioblastomzelllinie
SF295	humane Glioblastomzelllinie
SF539	humane Glioblastomzelllinie
SNB75	humane Glioblastomzelllinie
SOCC	store-operated calcium channel
SOCE	store-operated calcium entry
SP	scaffolding protein
SR101	Sulforhodamin 101
SRB	Sulforhodamin B
SV	simian virus
t	Translokation
T/C	test over control
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
TCA	Trichloressigsäure
TH	Tyrosin-Hydroxylase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRP	transient receptor potential
Tyr	Tyrosin
UCR	upstream conserved region

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
VOCC	voltage-operated calcium channel
W-7	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamid
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

In den Industrienationen steht Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachen. Bei einer Krebserkrankung ist das Wachstum somatischer Zellen gestört; sie teilen sich ungehemmt. Aufgrund des klonalen Tumorwachstums wird jede Mutation im Erbgut der „entarteten“ Zelle in der Mitose an ihre Tochterzellen weitergegeben und dadurch genetisch fixiert (Eisenbrand und Metzler, 2002; Wagener, 1999). Der Übergang einer Normalzelle in eine Krebszelle (neoplastische Zelle) und deren Weiterentwicklung zu einem klonalen Tumor ist ein mehrstufiger Prozeß, welcher sich in die drei Phasen Initiation, Promotion und Progression gliedert (Pitot und Dragan, 1991; Artner, 2001).

Für etwa 2 % aller Tumorerkrankungen sind intracraniale Tumore verantwortlich (Universität Birmingham, Neurochirurgie). Primäre maligne Gehirntumore sind die dritthäufigste Ursache für Krebstode in der Altersklasse von 15-30 Jahre (Black, 1991). Über 40 % aller Neoplasien des zentralen Nervensystems (ZNS) gehen dabei aus Gliazellen hervor (Kleihues et al., 1995). Zur Zeit werden Chemotherapie, Strahlentherapie und Neurochirurgie als Methoden zur Behandlung von ZNS-Tumoren eingesetzt (Friesen et al., 2002). Allerdings können gliale Tumore meist nicht ohne Folgeschaden vollständig chirurgisch entfernt werden.

Einen potentiellen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer anti-neoplastischer Therapien könnte ein Eingriff in intrazelluläre Signalübertragungswege und die damit verbundene Beeinflussung der Zellproliferation darstellen. So konnte gezeigt werden, daß in Tumorzellen häufig der Spiegel an cyclischem 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP) als Folge einer Überexpression cyclischer 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterasen (PDEs) gegenüber nicht-malignem Gewebe erniedrigt ist (Marko et al., 2000). Im Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand wird unter anderem die Expression und Bedeutung der PDE1- und PDE4-Isoenzymfamilien in verschiedenen Tumoren und Tumorzelllinien erforscht. Es ließ sich zeigen, daß die selektive Hemmung tumorassoziierter bzw. tumorspezifischer PDEs den cAMP-Spiegel der neoplastischen Zelle ansteigen läßt. Dies führt zur Wachstumshemmung bzw. zur Induktion von Apoptose in Tumorzellen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Tumorentstehung

Bei einer Krebserkrankung ist das Wachstum somatischer Zellen gestört; sie teilen sich ungehemmt. Der Übergang einer Normalzelle in eine Krebszelle (neoplastische Zelle) und deren Weiterentwicklung zu einem klonalen Tumor läßt sich in drei Phasen gliedern (Eisenbrand und Metzler, 2002; Artner, 2001; Pitot und Dragan, 1991):

- Initiation

Unter der Initiation versteht man eine irreversible DNA-Veränderung, welche von der betroffenen Zelle an die Tochterzellen weitergegeben wird. Bei diesen Veränderungen handelt es sich meist um mehrfache Mutationen verschiedenster Art im Genom der „Ausgangszelle“. Allerdings reicht die Initiation alleine nicht für die Entstehung eines Tumors aus.

- Promotion

Die Promotion bezeichnet die Stimulierung des Zellwachstums, wobei bereits initiierte Zellen unter den gegebenen Bedingungen bevorzugt proliferieren. Die Wirkung des Tumorpromotors muß über einen längeren Zeitraum andauern, um aus einer initiierten Zelle einen Mikrotumor zu bilden.

- Progression

Während der Progressionsphase steigen sowohl die Wachstumsautonomie als auch die Malignität des Tumors an. In diesem Prozeß spielen Faktoren wie Immunantwort gegen die transformierten Zellen, Blutversorgung des Tumors, der Erwerb weiterer Mutationen, Lokalisation im Körper etc. eine wichtige Rolle.

Als wesentliche Ursachen für die Entstehung von Krebs gelten bestimmte exogene Faktoren wie kanzerogene Chemikalien, einige Viren (z.B. „human papilloma virus“, HPV), energiereiche Strahlung sowie chronische bakterielle Infektionen (z.B. mit *Helicobacter pylori*) zu nennen. (Wagener, 1999; Artner, 2001)

Auch genetische Faktoren können eine wesentliche Rolle spielen. Beispielsweise kann die Empfindlichkeit auf Krebsrisikofaktoren bei verschiedenen Individuen aufgrund ihrer genetischen Disposition unterschiedlich sein. (Eisenbrand und Metzler, 2002; Wagener, 1999)

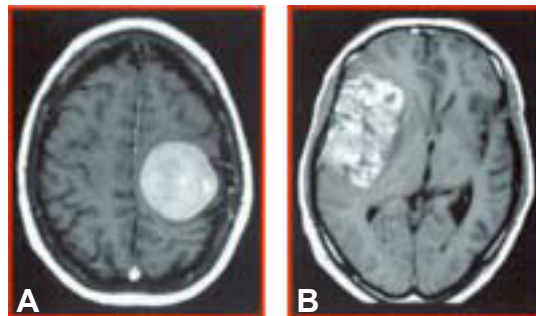
Ein menschlicher oder tierischer Organismus kann auch schon vor der Geburt durch kanzerogene Stoffe gefährdet werden. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß bestimmte Kanzerogene bei Applikation an trächtige Muttertiere zu Tumoren in der Filialgeneration führen

(transplazentare Kanzerogenese). Das Muttertier muß dabei nicht zwangsläufig selbst erkranken. So erzeugen z.B. bestimmte Nitrosoharnstoffe bei Gabe während der Schwangerschaft selektiv bei den Nachkommen der behandelten Muttertiere Tumore des zentralen und peripheren Nervensystems, während die Parentaltiere keine Tumore bekommen (Druckrey et al., 1965). Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Rattenglioblastom-Zelllinie C6 wurde aus einem Gehirntumor etabliert, welcher durch intravenöse Gabe von N-Nitrosomethylharnstoff erzeugt wurde (Benda et al., 1968; Lee und Hait, 1985).

## 2.2 Tumore des ZNS

Intracraniale Tumore sind für über 2 % aller Todesfälle verantwortlich. Ihr Anteil an den Gesamt-Tumorerkrankungen beträgt ebenfalls 2 % (Universität Birmingham, Neurochirurgie).

Bei den Tumoren des zentralen Nervensuystems (ZNS), welches aus Gehirn und Rückenmark besteht, kann man – ebenso wie in anderen Organsystemen – zwischen benignen und malignen Tumoren unterscheiden.



**Abb. 1:** A: benigner Hirntumor (Meningeom) mit abgegrenzten Rändern,  
B: maligner Hirntumor (Glioblastom) mit infiltrierendem Wachstum  
(Ärztliche Praxis, Foto: Essex)

- Gutartige Tumore zeigen eine klare Abgrenzung zum umliegenden Gewebe und infiltrieren dieses nicht (Abb. 1A). Allerdings können sie auf „empfindliche“ Hirnbereiche Druck ausüben und so verschiedenartige Symptome auslösen. Normalerweise können diese Tumore vollständig entfernt werden, ohne daß es zu einem Wiederauftreten des Tumors an derselben Stelle kommt. (NCI, 1998)
- Maligne Tumore entstehen aus „entarteten“ Zellen und zeigen häufig ein rasches, infiltratives Wachstum (Abb. 1B). Im ZNS können sie – vor allem in einem fortgeschrittenen Stadium – Vitalfunktionen beeinträchtigen. (NCI, 1998)

Obwohl Gehirntumore prinzipiell bei Patienten jeden Alters auftreten können, zeigt sich, daß besonders zwei Altersgruppen besonders häufig betroffen sind. Zum einen sind Kinder zwischen 3 und 12 Jahren betroffen, zum anderen Erwachsene im Alter von 40-70 Jahren (NCI, 1998).

Aus epidemiologischen Studien ergaben sich Hinweise auf Risikofaktoren, die zu einer erhöhten Gehirntumorneigung führen können. Dies gilt z.B. für Personen, welche an bestimmten Arbeitsplätzen in Ö raffinerien, der Gummierzeugung, Medikamentenherstellung bzw. im chemischen Labor Karzinogenen ausgesetzt sind (NCI, 1998).

Tumore, welche sich direkt im ZNS entwickeln und nicht als Sekundärtumore durch intracraniale Metastatisierung eines extracranialen Primärtumors entstehen, bezeichnet man als primäre Gehirntumoren. Diese primären Hirntumoren gehen vom Neuroepithel (v.a. der Neuroglia), dem Ektoderm und Mesoderm aus und werden pathohistologisch nach ihrem Ursprungsgewebe klassifiziert. Die am häufigsten auftretenden Hirntumore sind Gliome. Es können aber in anderen Zelltypen/Geweben des Gehirns ebenfalls Tumore entstehen, z.B. Medulloblastome, Meningeome und Pinealome. (NCI, 1998; Pschyrembel, 1998)

### **2.2.1 Gliale Tumore**

Nervensysteme bestehen nicht nur aus den für die Informationsverarbeitung wichtigen Neuronen, sondern auch aus Gliazellen. Im ZNS der Säugetiere können 10-50 mal mehr Gliazellen als Neurone vorkommen. Im Gegensatz zu den Neuronen behalten Gliazellen ihre Teilungsfähigkeit, was auch der Grund dafür ist, daß die meisten Gehirntumore von Gliazellen ausgehen. (Kuffler et al., 1984; Reichert, 1990)

Im ZNS der Vertebraten lassen sich verschiedene Typen von Gliazellen unterscheiden, welche verschiedene Funktionen erfüllen (Reichert, 1990; Verkhratsky et al., 1998):

- Astrocyten → sind die am häufigsten vorkommende Art von Gliazellen. Sie können in zwei Untergruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es fibröse Astrocyten, welche Filamente enthalten. Sie kommen häufig in der Nähe myelinisierter Nervenfasern, also in der weißen Substanz des Gehirns, vor. Der zweite Astrocyten-Subtyp sind protoplasmareiche Astrocyten, welche weniger fibröses Material als die des ersten Subtyps aufweisen. Sie kommen verstärkt in der Nähe von Neuronen-Somata, Dendriten und Synapsen in der sogenannten grauen Substanz vor. (Kuffler et al., 1984)

Den Astrocyten werden verschiedene Aufgaben im ZNS zugeschrieben, unter anderem eine nutritive Funktion für Neurone, Kontrolle der Homöostase des extrazellulären Ionenmi-

lieus sowie Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt (Reichert, 1990; Deitmer, 2001). Auch wird neuerdings vermutet, daß Astrocyten neuronale Signale modulieren und so Einfluß auf das Verhalten etc. nehmen können (Lena und Changeux, 1997; MacDermott et al., 1999).

- Oligodendrocyten → bilden durch lamellenartiges Umwickeln von Axonen eine Myelinscheide aus, wodurch die Leitungsgeschwindigkeit der Nervenfortsätze steigt
- Ependymalzellen → bilden die innere Auskleidung der Hohlräume des ZNS
- Mikroglia → phagocytierende Zellen, welche bei Erkrankungen oder Verletzungen des ZNS in Aktion treten, immunokompetent
- Radialglia → dient als nichtneurale Leitschiene für Neuroblasten in der Embryonalentwicklung

Es gibt verschieden Arten von Gliomen, je nachdem welcher Typ von Gliazelle betroffen ist. So unterscheidet man Astrocytome, Glioblastome, Gliome des Hirnstamms, Ependymome, Oligodendrogliome und gemischte Gliome wie das Oligoastrocytom (NCI, 1998; McKeever, 1993). Eine histologische Einteilung des Schweregrads von Gliomen und deren Prognose ist in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Histologische Einteilung von Gliomen (Universität Birmingham, Neurochirurgie)

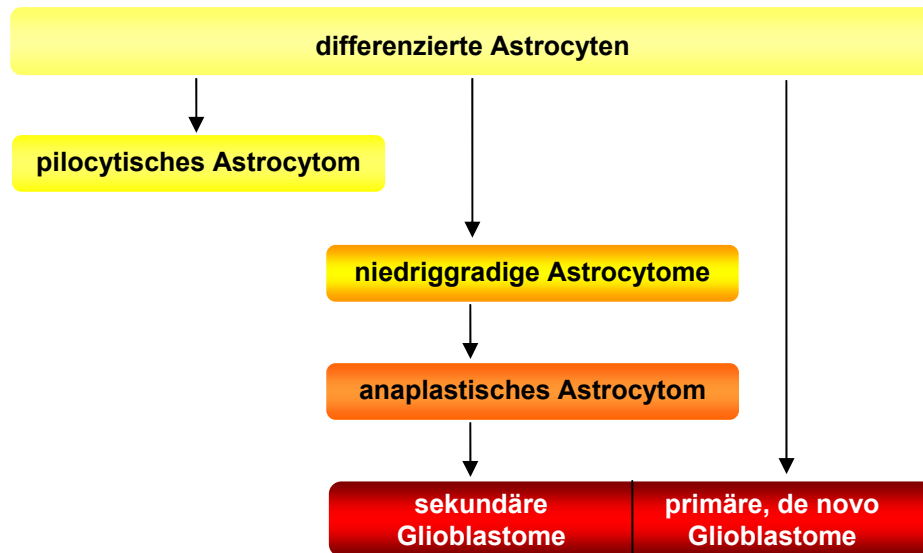
Grad I	benigne, Heilung bzw. Überlebenszeit von 5 Jahren und mehr
Grad II	semibenigne, postoperative Überlebenszeit von 3-5 Jahren
Grad III	relativ maligne, postoperative Überlebenszeit von 2-3 Jahren
Grad IV	hoch maligne, postoperative Überlebenszeit von 6-15 Monaten

Die verschiedenen Gliazell-Neoplasien variieren in Inzidenz, Lokalisation, dem Durchschnittsalter der betroffenen Patienten und ihrem klinischem Verlauf. So treten Glioblastome bevorzugt im Erwachsenenalter mit einer „Peak“-Inzidenz zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr auf. Bevorzugt lokalisiert sind Glioblastome in der frontotemporalen Region des Gehirns bzw. dem parietalen Lobus. (Kleihues et al., 1995) Männer sind etwa 1.5-mal so häufig betroffen wie Frauen (Klinikum Großhadern, München).

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ursprünglich aus malignen Astrocytomen bzw. einem Gliosarkom etabliert wurden, soll hier nur auf diese beiden Arten von Gliom näher eingegangen werden. Über 40 % aller Neoplasien des ZNS gehen aus Gliazellen hervor (Kleihues et al., 1995), wobei Glioblastome 50-60 % aller Gliome ausmachen (Universität



Birmingham, Neurochirurgie). Ein Schema zur Entstehung humaner Astrocytome (Abb. 2) macht deutlich, daß Gliome eine Tendenz zur Progression in einen weniger differenzierten, maligneren Phänotyp aufweisen (niedriggradiges Astrocytom → anaplastisches Astrocytom → Glioblastom; Kleihues et al., 1995)



**Abb. 2:** Schema zur Entstehung humaner Astrocytome (nach Kleihues et al., 1995, verändert)

Astrocytome werden von der WHO (World Health Organisation) in vier Gruppen eingeteilt. In Tab. 2 ist diese Einteilung dargestellt, ebenso Verlauf und Prognose der Krankheit. Die Tabelle ist um die Eigenschaften des Gliosarkoms ergänzt.

**Tab. 2:** Eigenschaften von Astrocytomen und Gliosarkomen (Pschyrembel, 1998, verändert; Brain Tumour Net)

<b>Astrocytom</b>	<b>WHO Grad I</b> Spongioblastom, pilocytisches Astrocytom	benigne <u>V</u> : langsames Wachstum <u>P</u> : nach operativer Therapie gut
	<b>WHO Grad II</b> Astroblastom	benigne <u>V</u> : langsam wachsend, gelegentlich infiltrierend <u>P</u> : nach Operation gut
	<b>WHO Grad III</b> anaplastisches Astrocytom <b>WHO Grad IV</b> multiformes Glioblastom	maligne <u>V</u> : langsam wachsend <u>P</u> : längerfristige Remission möglich, häufig Rezidive
<b>Gliosarkom</b>	entdifferenziertes Glioblastom	hoch maligne <u>V</u> : rasches Wachstum <u>P</u> : schlecht

V: Verlauf, P: Prognose

Die Therapie glialer Tumore bzw. von Gehirntumoren im allgemeinen ist in der Regel schwierig, da eine Totalresektion des Tumors in den meisten Fällen nicht ohne negative Folgen für den Patienten durchgeführt werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß intravenös verabreichte Chemotherapeutika die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können und so den gewünschten Wirkort nicht erreichen. Die Therapiemöglichkeiten intracranialer Tumore umfassen (Pschyrembel, 1998; NCI, 1998; Chiras et al., 1988; Brain Tumour Net; Klinikum Großhadern, München):

- Osmotherapie, um Ödeme im Hirnbereich zu behandeln
- Chemotherapie, welche entweder oral, intravenös, intraarteriell, intramuskulär oder direkt in die cerebrospinale Flüssigkeit (→ intrathecale Chemotherapie) verabreicht wird
- Strahlentherapie, welche durch eine externe oder eine implantierte Strahlenquelle erfolgen kann
- neurochirurgische (Teil-)Entfernung des Tumors (Craniotomie)
- stereotaktische Radiochirurgie z.B. mit Hilfe des sogenannten „Gamma-Knife“ oder „Lincac“

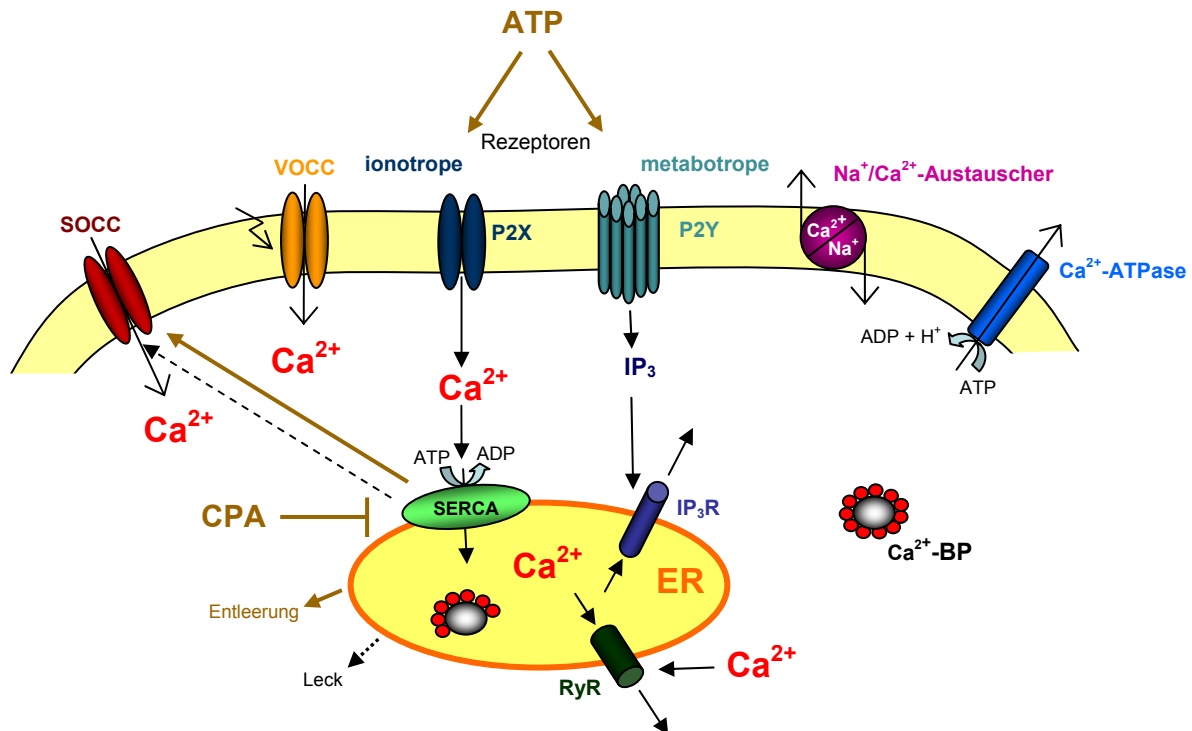
## 2.3 Calcium-Homöostase und Signalling in Gliazellen

Das Calcium-Ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist ein ubiquitärer cytosolischer Botenstoff, der für viele Signalübertragungswege wichtig ist. So reguliert  $\text{Ca}^{2+}$  Muskelkontraktionen und Exocytose-Vorgänge sowie die Funktion vieler Enzyme und Zellproteine. Weiterhin spielt Calcium eine Rolle bei der Blutgerinnung und Hormonsekretion. (Randall et al., 1997; Stryer, 1996; Dorit et al., 1991) Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration spielen auch eine fundamentale Rolle bei der neuronalen Signalübertragung. So ist Calcium häufig an den Ionenströmen während eines Aktionspotentials und der Sekretion von Neurotransmittern beteiligt. (Kuffler et al., 1984; Berridge, 1998)

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird durch das Zusammenspiel membranständiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kanäle sowie cytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffersysteme bestimmt. So liegt in Gliazellen, wie auch in anderen Zellen, nur ein geringer Teil des Calciums frei im Cytosol vor; der größte Anteil befindet sich in Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), oder ist an Proteine gebunden (Verkhratsky et al., 1998). Die Calcium-Konzentration im Cytoplasma unstimulierter Gliazellen liegt im Bereich von 30-150 nM (Deitmer et al., 1998). Im Extrazellularraum liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei etwa 1mM (Randall et al., 1997).

Die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Gliazellen ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. In der Zellmembran von Gliazellen befinden sich – wie in allen Körperzellen – verschiedene Typen von Kanälen und Rezeptoren, deren Ausstattung bei verschiedenen Zellpopulationen variieren kann. Zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen gehören spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle („voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels“, VOCC), welche durch eine Depolarisation der Zellmembran geöffnet werden. Weiterhin gibt es ionotrope und metabotrope Rezeptoren, die durch verschiedene Liganden (z.B. Glutamat, ATP etc.) gesteuert werden können. Durch Aktivierung einiger ionotroper Rezeptoren (z.B. purinerge P2X) kommt es zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ . Dadurch steigt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Cytosol der Zelle an. Eine Erniedrigung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann einmal durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in der Membran erfolgen; weiterhin kann  $\text{Ca}^{2+}$  unter ATP-Verbrauch in die intrazellulären Speicher im ER aufgenommen werden. Dieser Vorgang wird durch die Sarcoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) katalysiert. Calcium kann sowohl im Speicher, als auch im Cytosol an spezifische Proteine gebunden werden ( $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsproteine,  $\text{Ca}^{2+}$ -BP). Durch Aktivierung metabotroper Rezeptoren (z.B. purinerge P2Y) wird die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über den intrazellulären Botenstoff Inositol-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) reguliert. Dieser bindet an den Inositol-Triphosphat-Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), wel-

cher als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal das Calcium aus dem Speicher leitet. Das  $\text{Ca}^{2+}$  kann auch über den Ryanodin-Rezeptor (RyR), einen calciumgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, den Speicher verlassen.



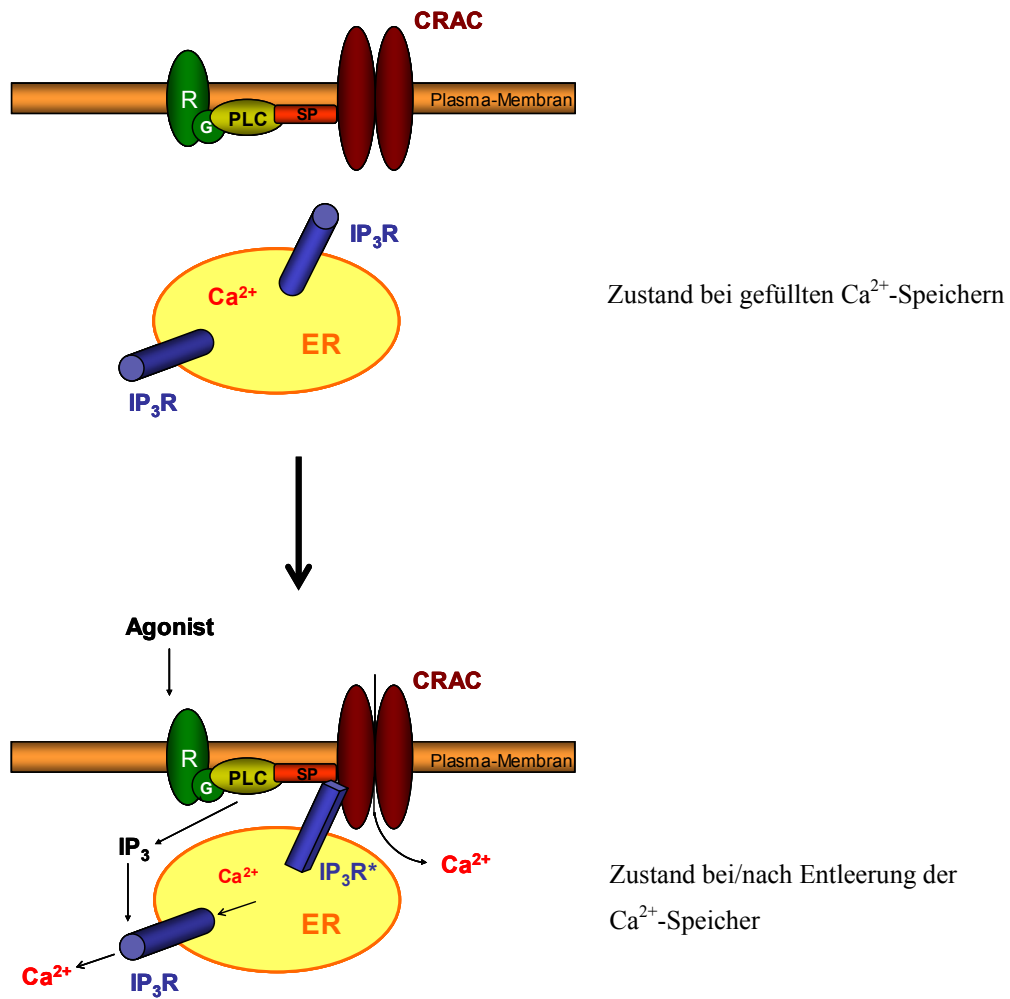
**Abb. 3:** Calcium-Homöostase in Gliazellen (nach Verkhratsky et al., 1998, verändert)

ATP: Adenosintriphosphat (Neurotransmitter), Ca<sup>2+</sup>-BP: Calcium-Bindungsprotein, CPA: Cyclopiazonsäure (Blockierung der SERCAs mit folgender Entleerung der Ca<sup>2+</sup>-Speicher), ER: Endoplasmatisches Reticulum, IP<sub>3</sub>: Inositol-Triphosphat, IP<sub>3</sub>R: Inositol-Triphosphat-Rezeptor, Inositol-Triphosphat-aktivierter Ca<sup>2+</sup> Kanal, RyR: Ryanodin-Rezeptor (Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Ca<sup>2+</sup>-Kanal), SERCA: Sarcoendoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SOCC: „store-operated calcium channel“, VOCC: „voltage-operated calcium channel“

Einige Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kanäle werden vom Füllungszustand der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher wie dem ER beeinflusst („store-operated Ca<sup>2+</sup> channel“, SOCC). Nimmt der Calcium-Pool der Speicher ab, werden diese Kanäle über ein noch unbekanntes Signal geöffnet, und es kommt zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>. Dieser Einstrom wird capacitativer Calcium-Einstrom (CCE) oder „store-operated calcium entry“ (SOCE) genannt. Der SOCE kann auch künstlich durch Gabe von Cyclopiazonsäure („cyclopiazonic acid“, CPA) ausgelöst werden. CPA blockiert mit hoher Spezifität die SERCAs. Durch den Fluß von Ca<sup>2+</sup>-Leckströmen über die ER-Membran kommt es während der CPA-Applikation zu einer fortschreitenden Entleerung der Speicher. Nachfolgend werden die SOCC-Kanäle der Membran geöffnet und es kommt zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>. (zur Übersicht: Deitmer et al., 1998; Verkhratsky et al, 1998)

### 2.3.1 Der capacitative Calcium-Einstrom (CCE)

Ein verbreiteter Mechanismus eines regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in nicht-erregbare Zellen ist der capacitative Calcium-Einstrom (CCE), auch „store-operated“ Calcium-Einstrom (SOCE) genannt (Putney et al., 2001). Dieser Begriff wurde 1986 von Putney geprägt (Putney, 1986): Bei Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher werden über ein noch unbekanntes Signal  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran, die sogenannten SOCCs, geöffnet; es kommt zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ . Bisher ist es noch nicht gelungen, den genauen Mechanismus der Kopplung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und CCE bzw. die molekulare Identität des SOCE aufzuklären (Putney et al., 2001). Es werden zur Zeit verschiedene Modelle (z.B. der „calcium influx factor“, CIF) diskutiert (Putney et al., 2001), wobei die Theorie des „conformational couplings“ favorisiert wird. Beim „conformational coupling“-Mechanismus wird angenommen, daß eine Verbindung zwischen den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und der Zellmembran besteht. Ein Kommunikationsmechanismus zwischen dem ER und der Plasma-Membran, welcher eher auf direkten Protein-Interaktionen als einem diffundierenden Molekül beruht, wurde erstmals von Irvine beschrieben (Irvine, 1990). Dabei bewirkt ein Agonist durch den Botenstoff  $\text{IP}_3$  eine Entleerung der Calcium-Speicher über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor. Die Speicher-Entleerung bewirkt eine Konformationsänderung im  $\text{IP}_3$ -Rezeptor, welche an die Calcium-Kanäle der Plasma-Membran durch direkte Protein-Protein-Interaktion übermittelt wird (Abb. 4). Der am besten charakterisierte Ionenstrom durch SOCCs ist der hochselektive „ $\text{Ca}^{2+}$ -release activated current“  $I_{\text{CRAC}}$  (Parekh und Penner, 1997).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des „conformational coupling“-Modells (nach Putney et al., 2001, verändert)  
 CRAC: Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup> (channel), ER: Endoplasmatisches Retikulum, G: G-Protein (Heterotrimer), IP<sub>3</sub>: Inositol-Triphosphat, IP<sub>3</sub>R: Inositol-Triphosphat-Rezeptor, IP<sub>3</sub>R\*: Inositol-Triphosphat-Rezeptor (nach Konformationsänderung), PLC: Phospholipase C, R: Rezeptor, SP: „scaffolding“-Protein

Als mögliche molekulare Komponenten der CCE-Kanäle werden die Säuger-Homologe der *Drosophila* TRP-Proteine („transient receptor potential“) diskutiert. In Säugern kommen sieben verschiedene TRP-Isoformen vor (TRPC1-7). Für TRPC3 wird z.B. eine Verbindung zum IP<sub>3</sub>-Rezeptor diskutiert (Putney et al., 2001).

Die Idee des „conformational coupling“ ist nicht auf alle Zell-Systeme anwendbar und keine der bisher in der Literatur vorgestellten Theorien ist generell auszuschließen. Unter Umständen ist es möglich, daß die SOCCs mehreren Regulationsmechanismen unterliegen. (Putney et al., 2001)

## 2.3.2 Calcium-Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Ionensensitive Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Fähigkeit, spezifisch und selektiv an ein bestimmtes Ion zu binden. Die Bindung des Ions an den Farbstoff verändert dessen spektrale Eigenschaften, was man sich z.B. bei der Messung von intrazellulären Ionenkonzentrationen zunutze machen kann.

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration von subkultivierten Ratten-Astrocyten und verschiedenen Glioblastomzelllinien von Mensch und Ratte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 bestimmt.

### 2.3.2.1 Fura-2

Fura-2 (Abb. 5), ein BAPTA-Derivat (Chelator), ist der am häufigsten benutzte  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Fluoreszenzfarbstoff. Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Form des Farbstoff (Fura-2) aufgrund ihrer hohen Polarität die Zellmembran nicht durchdringen kann, wird als nicht-invasive Methode zum Beladen der Zellen der membranpermeable Acetoxymethyl-Ester von Fura-2 (Fura-2 AM) verwendet. Diese unpolare Verbindung ist in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Im Cytoplasma werden die Esterbindungen durch endogene Esterasen gespalten, wobei neben Formaldehyd und Acetat die polare Form des Indikatorfarbstoffes entsteht. (Deitmer und Schild, 2000).

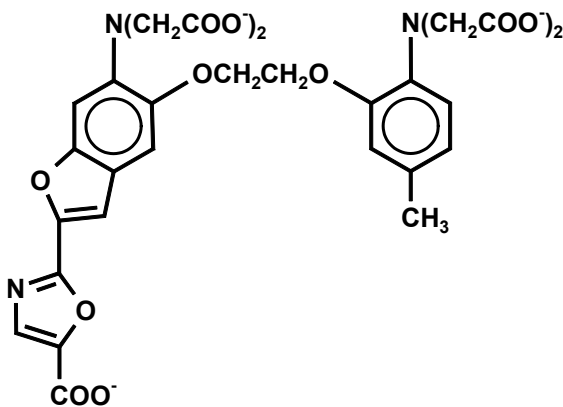
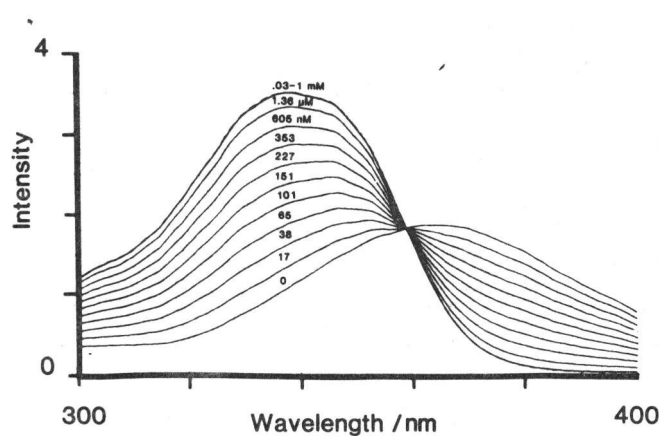


Abb. 5: Strukturformel von Fura-2

Fura-2 gehört zu den „dual excitation dyes“, d.h. der Farbstoff verändert nach Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$  sein Anregungsspektrum und sein Fluoreszenzverhalten (Abb. 6). Fura-2 besitzt zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Anregungsmaxima, welche sich „gegenläufig“ verhalten (Grynkiewicz, 1985; Mason et al. 1993):

- bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  steigt die Fluoreszenzintensität mit steigender  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ;
- bei  $\lambda = 380 \text{ nm}$  sinkt die Fluoreszenzintensität mit steigender  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ;

Das Emissionsmaximum bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$  wird nicht durch  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beeinflusst (Grynkiewicz, 1985).



**Abb. 6:** Anregungsspektrum von Fura-2 [ $1 \mu\text{M}$ ] bei  $20^\circ\text{C}$  in Pufferlösungen, deren freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $<1 \text{ nM}$  bis  $>10 \mu\text{M}$  variiert (Grynkiewicz et al., 1985). Bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda = 380 \text{ nm}$  befinden sich jeweils die Maxima der Kurve.

Aufgrund seiner spektralen Eigenschaften eignet sich Fura-2 für die Anwendung der sogenannten Ratio-Methode: Dabei wird der Farbstoff mit zwei verschiedenen Wellenlängen (hier:  $340 \text{ nm}$  und  $380 \text{ nm}$ ) angeregt. Aus den resultierenden Fluoreszenzintensitäten wird ein Quotient gebildet. Durch Änderung des Anregungsspektrums nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  ist die Ratio (d.h. der Quotient) zweier Fluoreszenzintensitäten für die Berechnung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ausreichend. Aufgrund der Quotienten-Bildung ist die Messung unabhängig von Parametern wie der absoluten Farbstoff-Konzentration, der Schichtdicke des Objekts und der Empfindlichkeit des Meßsystems. Ist bei dem zu untersuchenden Objekt eine signifikante Autofluoreszenz vorhanden, muß diese vor der Ratio-Bildung abgezogen werden. Eine instrumentelle Schwierigkeit stellt die alternierende Einstellung der beiden Anregungswellen dar, die sehr schnell aufeinanderfolgen muß. (Grynkiewicz et al., 1985)



### 2.3.2.2 Die Ionophoren 4-bromo-A23187 und Ionomycin

Zur Kalibrierung des Fura-Systems ist es nötig, einen Konzentrationsausgleich zwischen der intra- und der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration herbeizuführen. Dies kann durch Einsatz von Ionophoren geschehen, welche sich in die Zellmembran einbauen und diese für Kationen permeabel machen (Deber et al., 1985).

#### *4-bromo-A23187*

Bei 4-bromo-A23187 (Abb. 7) handelt es sich um ein halogeniertes Derivat des Ionophors A23187 (Debono et al., 1981). Für das Antibiotikum A23187 konnte erstmals ein hochselektiver Transport für divalente Kationen gezeigt werden (Reed und Lardy, 1972).

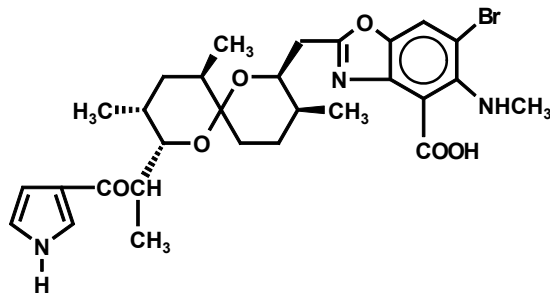
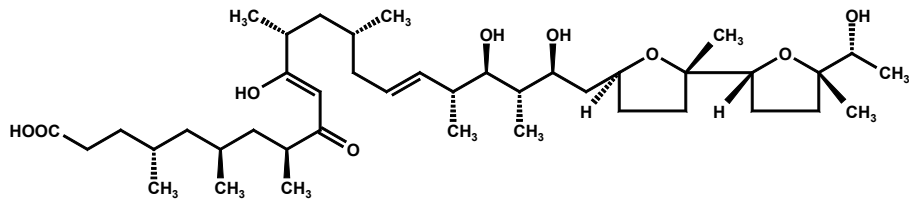


Abb. 7: Strukturformel von 4-bromo-A23187

Gegenüber der Ausgangssubstanz A23187 bildet 4-bromo-A23187 stabilere Komplexe mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und zeigt eine größere Selektivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  verglichen mit  $\text{Mg}^{2+}$  (Debono et al., 1981). Das Verhältnis von  $\text{Ca}^{2+}$  und 4-bromo-A23187 bei der Komplexbildung beträgt 2:1 (Debono et al., 1981; Liu und Hermann, 1978). 4-bromo-A23187 fluoresziert nicht (Debono et al., 1981) und eignet sich deshalb gut für den Einsatz in Fluoreszenzmessungen (Deber et al., 1985). Darüber hinaus läßt sich 4-bromo-A23187 zur Kalibrierung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen verwenden (Deber et al., 1985).

#### *Ionomycin*

Bei Ionomycin (Abb. 8) handelt es sich um ein Antibiotikum aus *Streptomyces conglobatus*. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen ist Ionomycin in der Lage, doppelt so viel an  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden wie A23187 und weiterhin den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport schneller zu vermitteln. Dieses Verhalten schlägt sich auch in der Ratio von Kation zu Ionophor nieder, welche für  $\text{Ca}^{2+}$  und Ionomycin 1:1 beträgt. (Liu und Hermann, 1978)



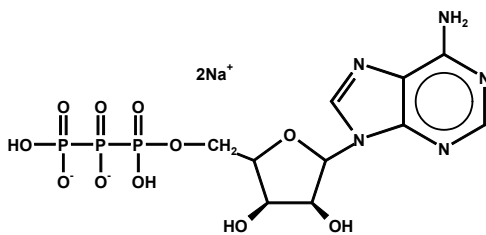
**Abb. 8:** Strukturformel von Ionomycin (freie Säure)

Ionomycin zeigt eine hohe Spezifität für divalente Kationen, wobei die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  höher ist als gegenüber  $\text{Mg}^{2+}$  (Liu und Hermann, 1978).

Wie 4-bromo-A23187 eignet sich Ionomycin zur Kalibrierung der freien cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Deber et al., 1985).

### 2.3.2.3 Der purinerge Rezeptoragonist ATP

Adenosintriphosphat (ATP, Abb. 9) dient im ZNS und peripheren Nervensystem von Säugern als Neurotransmitter. ATP kann einerseits über die ligandengesteuerten P2X-Rezeptoren, welche „schnelle“ Reaktionen steuern, als auch über die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren, welche langsame, metabotrope Antworten zur Folge haben, wirken (Abbraccio und Burnstock, 1994; Abbraccio, 1997).



**Abb. 9:** Strukturformel von ATP (Di-Natriumsalz)

Durch seine Wirkung auf die purinergen P2X- und P2Y-Rezeptoren kann ATP auch den intrazellulären Calcium-Spiegel beeinflussen (Abb. 3).

### 2.3.2.4 Der SERCA-Inhibitor CPA

Bei Cyclopiazonsäure (CPA, Abb. 10) handelt es sich um ein membrangängiges Mykotoxin aus *Aspergillus* und *Penicillium* (Norred et al., 1985; Nishie et al., 1985).

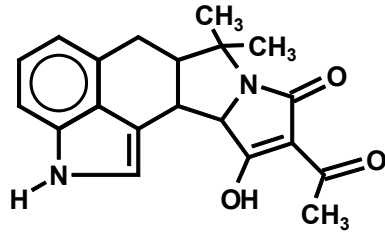


Abb. 10: Strukturformel von CPA

CPA blockiert mit hoher Spezifität die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des endoplasmatischen und sarcoplasmatischen Retikulums (SERCAs, Groeger et al., 1988) und verhindert so das Wiederauffüllen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Demaurex et al., 1992). Dies geschieht vermutlich durch Stabilisierung der SERCAs in einer enzymatisch inaktiven Form durch die Einwirkung von CPA (Seidler et al., 1989). Durch den Fluß von „ $\text{Ca}^{2+}$ -Leckströmen“ durch die ER-Membran kommt es bei Blockierung der SERCAs zu einer fortschreitenden Entleerung der Speicher (Demaurex et al., 1992). Die Wirkung von CPA auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel der Zelle ist Abb. 3 gezeigt.

## 2.4 Der cAMP-Signalübertragungsweg

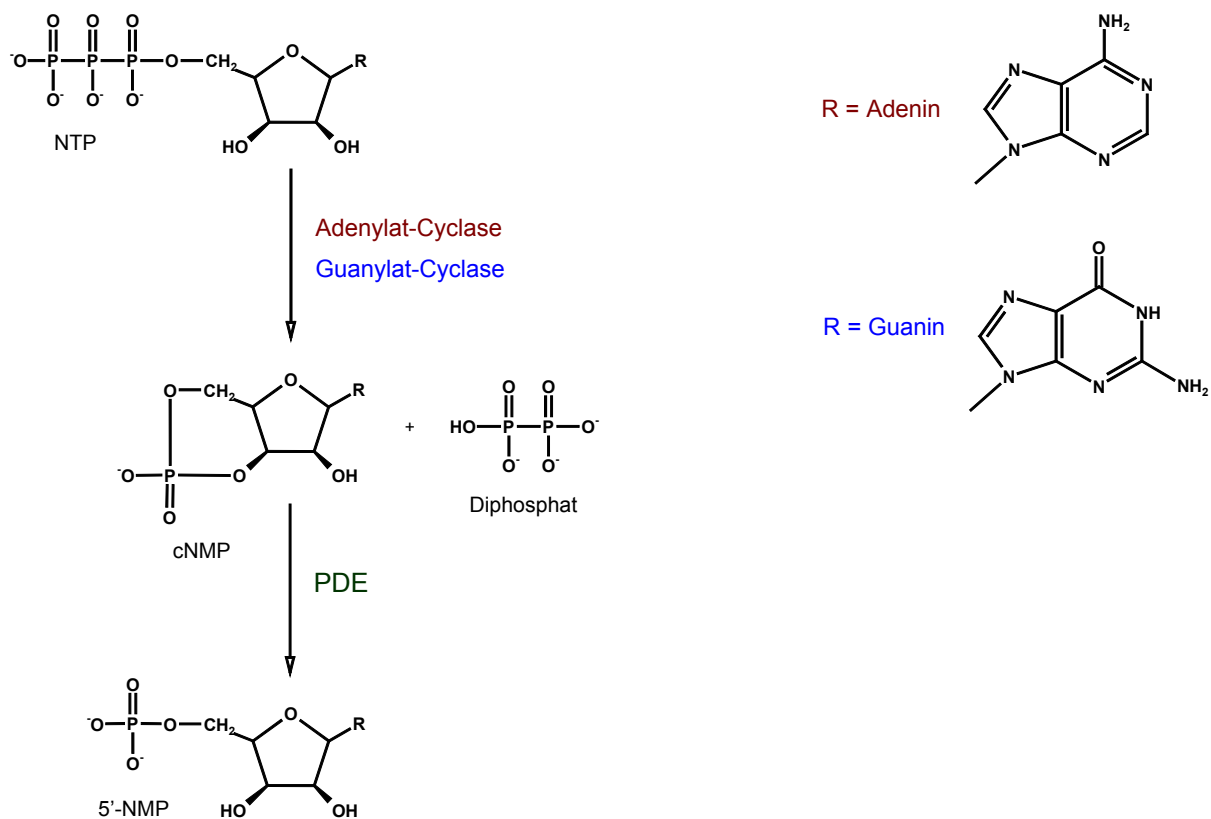
Das cyclische 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein wichtiger intrazellulärer sekundärer Botenstoff. Es erfüllt u.a. Aufgaben bei der Muskelkontraktion, Sekretionsvorgängen, der Transkriptionskontrolle und bei der neuronalen Signalübertragung (Randall et. al, 1997; Koolman und Röhm, 1998). Darüber hinaus spielt cAMP eine wichtige Rolle bei der Steuerung hormoneller Prozesse. Dabei bindet ein lipid-unlösliches Hormon („first messenger“) an einen Rezeptor, welcher über einen nachgeschalteten „transducer“ (G-Protein) und einen „amplifier“ (Adenylat-Cyclase) die Ausschüttung eines „second messengers“ bewirkt. cAMP ist ein solcher „second messenger“. In Tab. 3 sind einige hormon-induzierte, cAMP-vermittelte Zellantworten aufgeführt.

**Tab. 3:** Ausgewählte, cAMP-vermittelte Hormonantworten (Berridge, 1985 in Randall et al., 1997)

Signal	Zellantwort
<b>Stimulierend</b>	
Adrenalin ( $\beta$ -Rezeptoren)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glycogen-Abbau</li> <li>• gesteigerter Lipid-Abbau</li> <li>• Steigerung des Herzschlags</li> <li>• Flüssigkeitssekretion</li> <li>• Muskelrelaxation</li> </ul>
TSH	Thyroxin-Sekretion
Vasopressin	Wasser-Resorption
Glucagon	Abbau von Glycogen
<b>Inhibierend</b>	
Adrenalin ( $\alpha_2$ -Rezeptoren)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation der Blutplättchen-Aggregation und Sekretion</li> <li>• verminderter Lipid-Abbau</li> </ul>
Adenosin	verminderter Lipid-Abbau

Der cAMP-Signalübertragungsweg ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Ein stimulierender Ligand lagert sich an einen membranständigen Rezeptor ( $R_s$ ), welcher sieben Transmembranhelices besitzt (Stryer, 1996). Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ), das aus drei Unterheiten aufgebaut ist:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Im inaktiven Zustand ist ein Molekül GDP (Guanosindiphosphat) an die drei Untereinheiten gebunden. Bei Aktivierung

des G-Proteins wird dieses GDP freigesetzt und im Gegenzug ein GTP (Guanosintriphosphat) gebunden. Nun dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_s$ , welche mit dem GTP gekoppelt ist, von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ab. Die „ $\alpha$ /GTP-Untereinheit“ aktiviert die nachgeschaltete Adenylat-Cyclase, welche die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert (Abb. 11). (Stryer, 1996; Simmons und Murphy, 1995) Die Adenylat-Cyclase- Typ I, welche spezifisch im Gehirn vorkommt, ist durch  $Ca^{2+}$ /CaM stimulierbar (Sunahara et al., 1996). Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität des  $G_s$  wird GTP zu GDP hydrolysiert, die drei Untereinheiten lagern sich nach Abspaltung des Ligand-Rezeptor-Komplexes wieder zusammen und das Protein wird inaktiv. (Stryer, 1996)



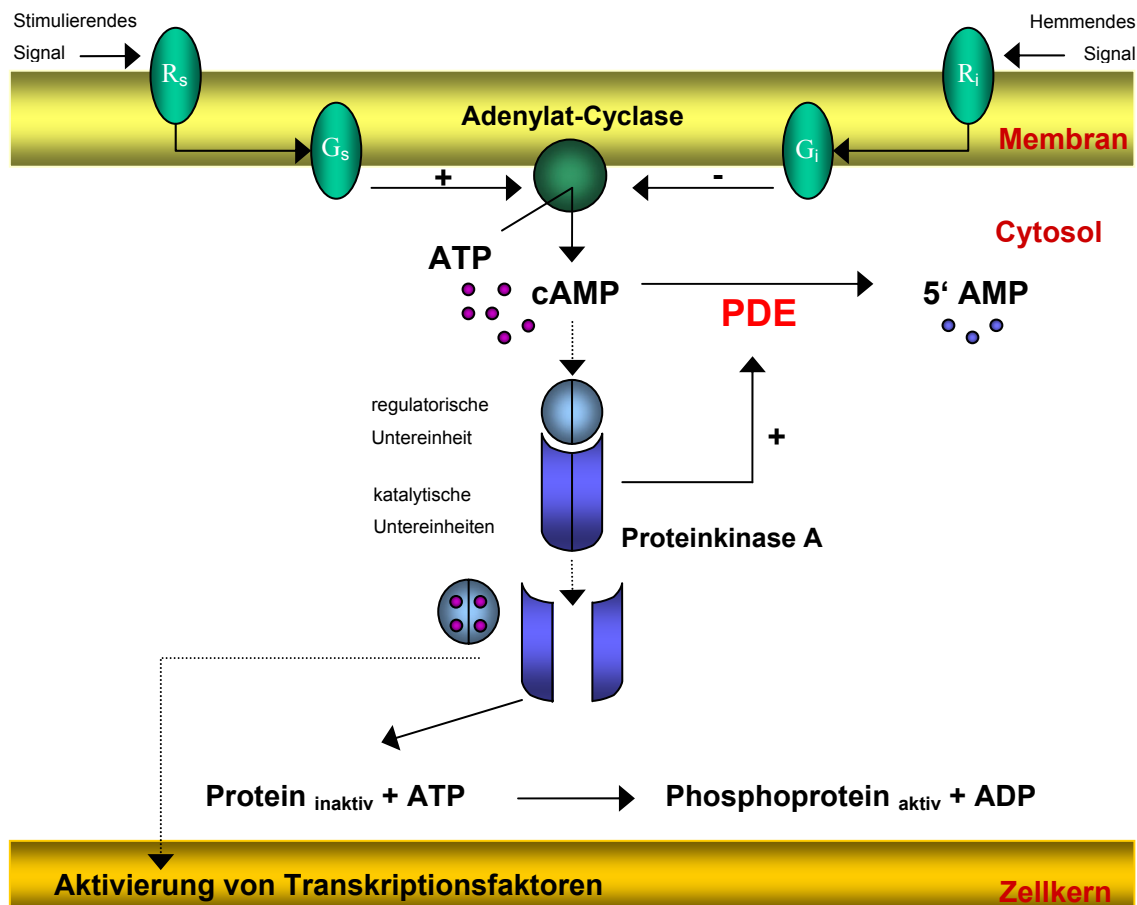
**Abb. 11:** Synthese und Abbau von cAMP und cGMP

cNMP: cyclisches 3', 5' Nucleotidmonophosphat, 5'-NMP: 5' Nucleotidmonophosphat, NTP: Nucleotridiphosphat, PDE: cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterase, R: Rest

Die Adenylat-Cyclase kann auch inhibiert werden: Dazu läuft die Signalweiterleitung nach Bindung eines Liganden an einen inhibitorischen Rezeptor ( $R_i$ ) über ein inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ). Dieses hemmt nun die Aktivität der Adenylat-Cyclase. (Randall et al., 1997)

Beim Durchlaufen der Signalkaskade erfolgt eine Verstärkung des Ausgangssignals. Das Binden des Liganden an seinen Rezeptor ist eine 1:1 Reaktion, wobei jedoch ein Ligand-

Rezeptor-Komplex mehrere G-Proteine aktivieren kann. Diese wiederum können viele Moleküle Adenylat-Cyclase aktivieren, welche so lange den Abbau von ATP zu cAMP katalysieren, bis das aktivierte G-Protein in seinen inaktiven Ausgangszustand zurückgekehrt ist. Über diese Amplifikation kann ein Ligand zur Bildung hunderter Moleküle cAMP führen, welche ihrerseits nachgeschaltete Reaktionen durchlaufen. (Randall et al., 1997)



**Abb. 12:** Der cAMP-Signaltransduktionsweg (nach Randall et al., 1997, verändert)

5'-AMP: 5' Adenosinmonophosphat, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat, Gi: G-Protein (inhibierend), Gs: G-Protein (stimulierend), PDE: Cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterase, Ri: Rezeptor-Protein (inhibierend), Rs: Rezeptor-Protein (stimulierend)

Die meisten Wirkungen von cAMP gehen auf die Aktivierung eines Schlüsselenzyms, der Proteinkinase A (PKA) zurück. Die PKA ist aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen Untereinheiten (C) aufgebaut. Dieser R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>-Komplex ist enzymatisch inaktiv. Durch Bindung von je zwei Molekülen cAMP an die regulatorischen Untereinheiten kommt es zur Freisetzung der beiden katalytischen Untereinheiten (R<sub>2</sub> + 2C), welche nun beispielsweise

Proteine an spezifischen Serin- und Threoninresten phosphorylieren können. (Stryer, 1996, Simmons und Murphy, 1995) Die Phosphorylierung dieser Effektorproteine kann deren Aktivität entweder steigern oder inhibieren und so vielfältige Zellantworten auslösen. Zu den Effektorproteinen gehören u.a. Enzyme, welche weitere, nachgeschaltete Reaktionen katalysieren, regulatorische Proteine, Membrankanäle und Strukturproteine. Die Inaktivierung der Effektorproteine erfolgt durch eine Dephosphorylierung, welche durch die Phosphoprotein-Phosphatase katalysiert wird. (Randall et al., 1997)

Darüberhinaus können auch Transkriptionsfaktoren im Zellkern durch die PKA aktiviert werden. Dazu gehören das cAMP-responsive Element (CRE) -Bindungsprotein (CREB) und der CRE-Modulator (CREM), welche an das CRE binden und so die Genaktivität beeinflussen können (Borrelli et al., 1992).

Der hydrolytische Abbau von cAMP zu 5'AMP (Abb. 11) – und damit die Terminierung des Signals – erfolgt durch cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterasen (PDEs), auf welche im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird.

Neben cAMP ist auch das cyclische 3', 5' Guanosinmonophosphat (cGMP) als „second messenger“ in den meisten tierischen Zellen zu finden, wobei die intrazelluläre Konzentration von cGMP in der Regel niedriger als die cAMP-Konzentration ist (Randall et al., 1997). Der cGMP-Signalübertragungsweg weist einige Unterschiede zur cAMP-Kaskade auf. So kommt die Guanylat-Cyclase, welche die Umwandlung von GTP in cGMP katalysiert (Abb. 11) in zwei verschiedenen Formen vor. Eine dieser Formen ist – wie die Adenylat-Cyclase – membranständig; die andere kommt frei im Cytosol vor (Lucas et al., 2000). Weiterhin ist die Synthese von cGMP weit mehr  $Ca^{2+}$ -abhängig als die Synthese von cAMP (Randall et al., 1997). Analog zum cAMP-Signalweg aktiviert cGMP eine spezifische Proteinkinase – die Proteinkinase G (PKG), welche ihrerseits Effektorproteine phosphoryliert. (Lucas et al., 2000; Randall et al., 1997)

Die Stimulation ein und desselben Rezeptortyps kann gleichzeitig gegenläufige Änderungen der intrazellulären cNMP-Spiegels auslösen, d.h. Erhöhung des cAMP-Spiegels bei gleichzeitiger Erniedrigung des cGMP-„Levels“. In einigen Geweben, wie z.B. dem Herzmuskel, lösen cAMP und cGMP gegenläufige physiologische Reaktionen aus. (Randall et al., 1997)

## 2.5 Cyclische 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterasen

Die cyclischen 3', 5' Nucleotid-Phosphodiesterasen (PDEs, EC 3.1.4.17) hydrolysieren intrazelluläres cAMP bzw. cGMP zu dem entsprechenden 5' Monophosphat und übernehmen damit eine wichtige Aufgabe als homöostatische Regulatoren des intrazellulären cyclischen Nucleotidspiegels. Durch ihre subzelluläre Verteilung spielen PDEs eine Rolle bei der Ausbildung intrazellulärer cNMP-Gradienten und dadurch nachfolgend bei der Diffusionskontrolle der cyclischen Nucleotide. Darüberhinaus dienen PDEs als Effektorproteine in der Signaltransduktion, indem sie mit Rezeptoren und G-Proteinen interagieren können. Des weiteren verbinden sie die nucleotidabhängigen Signalwege mit anderen Signaltransduktionskaskaden. (Conti und Jin, 2000)

Die PDE-Superfamilie der Säugetiere umfaßt 11 Isoenzymfamilien, welche aufgrund von Sequenzhomologien, Substrataffinität und -spezifität, kinetischen Eigenschaften und der Sensitivität gegenüber spezifischen Modulatoren klassifiziert werden (Ang und Antoni, 2002; Conti und Jin, 2000; Han et al., 1999).

Tab. 4 zeigt eine kurze Charakterisierung der verschiedenen PDE-Isoenzymfamilien unter Angabe der entsprechenden Inhibitoren (Auswahl). Für die Isoformen PDE1 sowie PDE5-PDE11 sind zur Zeit keine wirklich selektiven Inhibitoren erhältlich (Sigma-Aldrich).

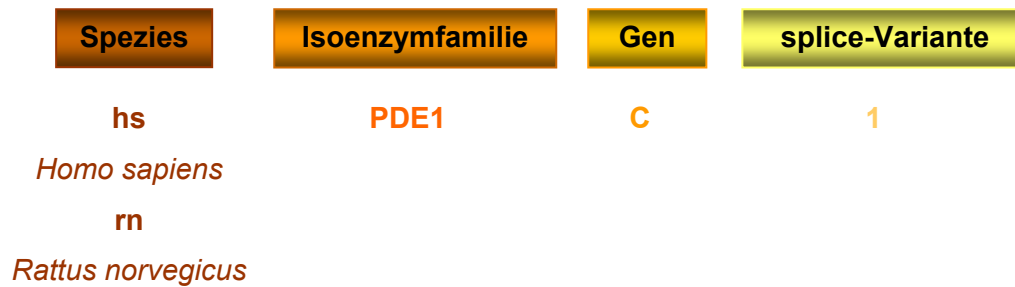


**Tab. 4:** Charakterisierung der 11 bekannten PDE-Isoenzymfamilien (Marko et al., 2000; Dousa, 1999; Perry und Higgs, 1998; Sigma-Aldrich)

<b>Isoenzymfamilie</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Inhibitoren</b>
PDE1	Hydrolyse von cAMP und cGMP stimulierbar durch Ca <sup>2+</sup> /CaM	8-Meom-IBMX, Vinpocetin
PDE2	Hydrolyse von cAMP und cGMP stimulierbar durch cGMP	EHNA
PDE3	Hydrolyse von cAMP und cGMP (cGMP jedoch vernachlässigbar) durch cGMP hemmbar	Cilostazol, Milrinon
PDE4	cAMP spezifisch	Rolipram, Ro 20-1724, CDP840, Denbutyllin
PDE5	cGMP-spezifisch	Zaprinast, Dipyridamol, Sildenafil
PDE6	cGMP-spezifisch lokalisiert in den Zapfen und Stäbchen der Netzhaut	Zaprinast, Dipyridamol
PDE7	hohe Affinität und Selektivität für cAMP IBMX-insensitiv	keine bekannt
PDE8	cAMP-spezifisch IBMX-insensitiv	Dipyridamol
PDE9	cGMP-spezifisch IBMX-insensitiv	Zaprinast, SCH-51866
PDE10	Hydrolyse von cAMP und cGMP cAMP-hemmbar, IBMX-sensitiv	Zaprinast, Dipyridamol, SCH-51866
PDE11	Hydrolyse von cAMP und cGMP	Zaprinast, Dipyridamol

In früheren Studien wurden die PDEs auf der Basis ihrer Fraktionierung bei der Ionenaustauschchromatographie klassifiziert. Die erste PDE-Aktivität, welche von einer Diethylaminoethyl (DEAE)-Ionenaustauschersäule eluierte, wurde somit als PDE1 definiert. Aufgrund der Komplexität der PDE-Isoenzymfamilien erwies sich diese Nomenklatur als nicht mehr ausreichend und es wurde eine neue, einheitliche Nomenklatur festgelegt. Zwei Buchstaben vor dem PDE-Acronym bezeichnen die Spezies, aus welcher die PDE stammt. Arabische Zahlen von zur Zeit 1-11 definieren die verschiedenen Isoenzymfamilien (PDE1-PDE11). Die

Gene innerhalb dieser Familien werden mit Großbuchstaben bezeichnet. Eine weitere arabische Ziffer nach dem Großbuchstaben beschreibt die „splice“-Variante des Gens. (Conti und Jin, 2000) Ein Beispiel für die geltende Nomenklatur ist in Abb. 13 dargestellt.



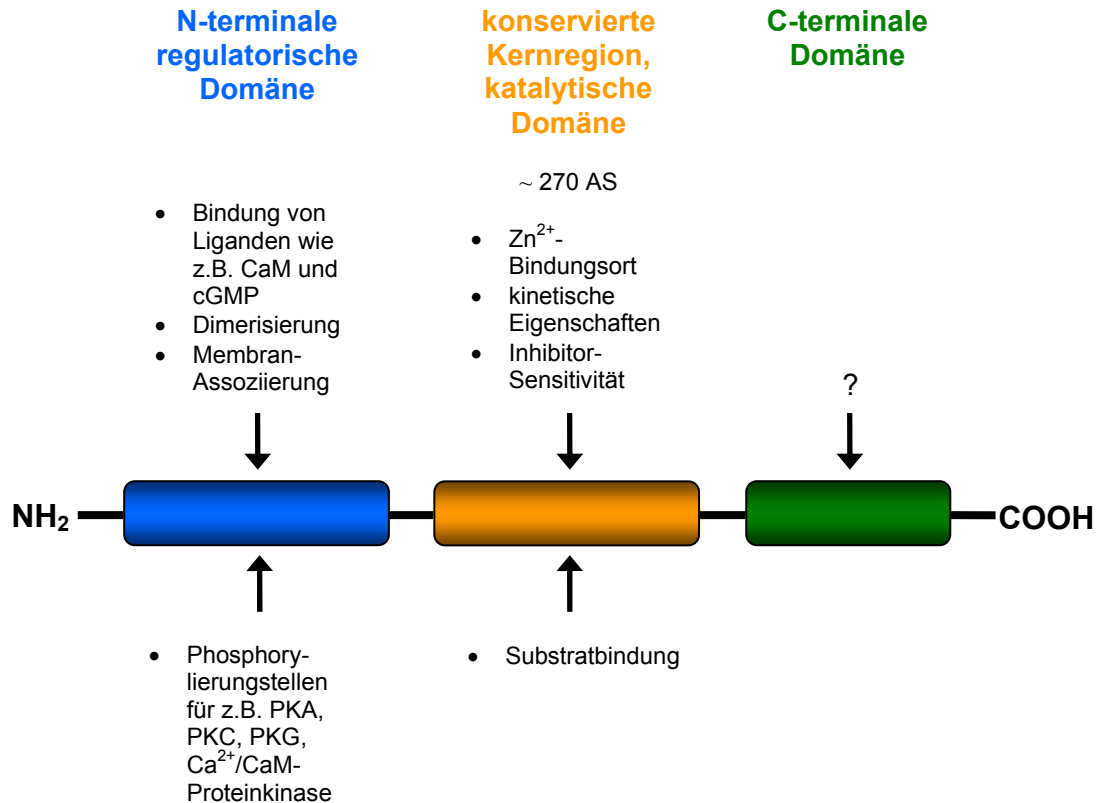
**Abb. 13:** Beispiel zur PDE-Nomenklatur (nach Dousa, 1999, verändert)

Die Isoenzyme einer PDE-Familie scheinen größere Homologien zwischen einzelnen Spezies aufzuweisen als zwischen zwei Mitgliedern derselben Isoenzymfamilie in einer Spezies. Die chromosomale Lokalisation der PDE-codierenden Gene ist bei verschiedenen Spezies unterschiedlich. (Dousa, 1999)

Phosphodiesterasen sind „Multi-Domän-Proteine“, d.h. sie bestehen aus mehreren verschiedenen Segment-Domänen, welche unterschiedliche Funktionen besitzen. Die funktionellen Domänen sind durch sogenannte Scharnierregionen miteinander verbunden.

Die PDEs der Vertebraten liegen häufig als Dimere linearer Proteine von 50-150 kDa Größe vor. Ein PDE-Monomer besteht im allgemeinen aus drei Domänen (Dousa, 1999, Abb. 14):

- der katalytischen Domäne mit der Substratbindungsstelle, welche bei Vertebraten als gemeinsames Merkmal  $\geq 250$  Aminosäuren umfaßt und in der Nähe des Carboxy-Terminus des Proteins lokalisiert ist
- einer Amino-terminalen regulatorischen Domäne, welche in ihrer Struktur und Größe bei den verschiedenen PDE-Isoenzymen und Isoformen stark variiert. Diese Domäne dient als Target für verschiedene Arten der Regulation
- einer C-terminalen Domäne



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Domänen eines PDE-Monomers (nach Dousa, 1999, verändert)

AS: Aminosäure, Ca<sup>2+</sup>/CaM: Calcium/Calmodulin, CaM: Calmodulin, cGMP: cyclisches 3', 5' Guanosinmonophosphat, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PKG: Proteinkinase G, ?: Funktion noch nicht bekannt

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden Untersuchungen zur Rolle der PDE1C-Isoenzyme in ZNS-Zellen. Für ein besseres Verständnis der Problemstellung sind zusätzliche Information zur PDE4-Isoenzymfamilie nötig, so daß diese beiden Isoenzymfamilien in den folgenden Kapiteln detaillierter beschrieben werden.

### 2.5.1 Die PDE1-Isoenzymfamilie

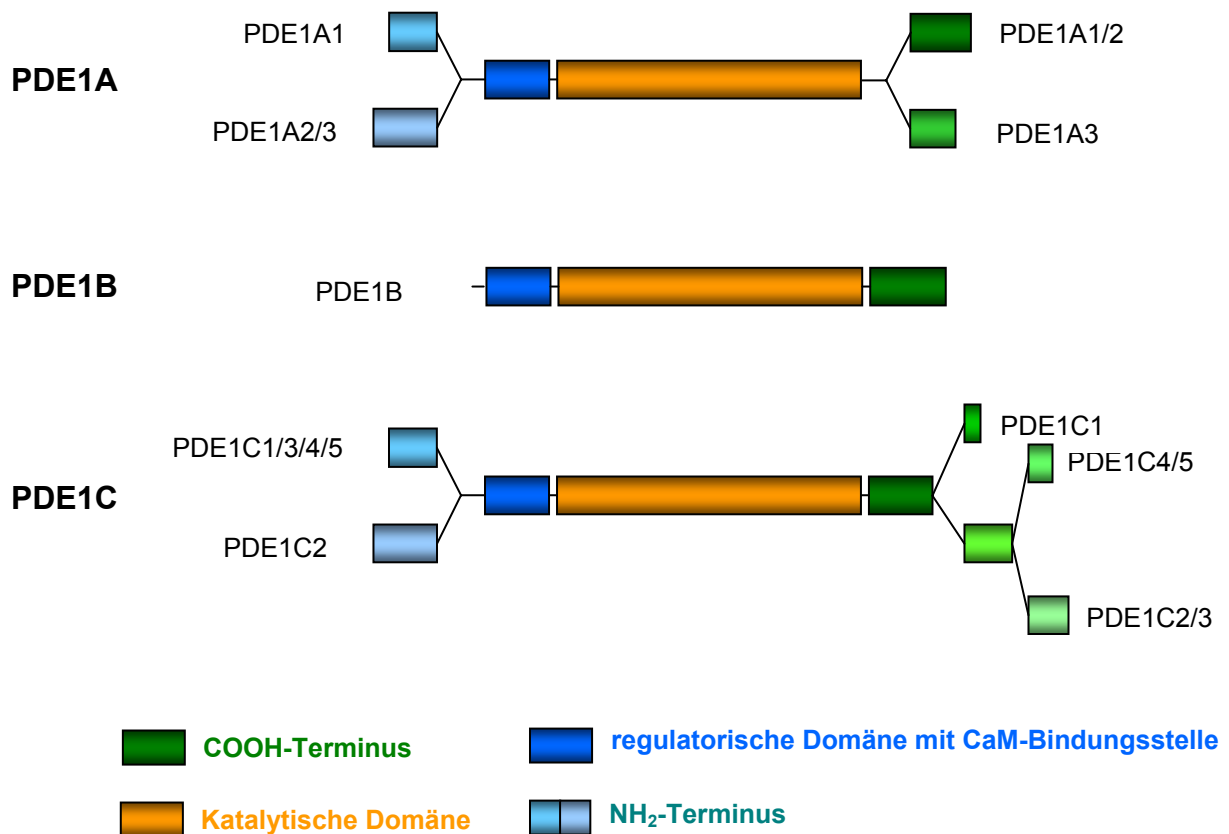
Die PDE1-Isoenzymfamilie gehört zu den sogenannten „Dual-Substrat-PDEs“, d.h. die Enzyme können sowohl cAMP als auch cGMP zum entsprechenden 5' Monophosphat hydrolysieren. Da ihre Aktivität durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup>/CaM (Calmodulin) gesteigert werden kann, werden die PDE1-Isoenzyme auch als Calmodulin-abhängige PDEs bezeichnet.

Die Existenz einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PDE und eines endogenen modulatorischen Proteins (CaM), welches die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität dieser PDE in Rattenhirn erhöhen konnte, wurde erst-

mals von Kakiuchi und Mitarbeitern bewiesen (Kakiuchi und Yamazaki, 1970; Kakiuchi et al., 1973).

### Die PDE1 „splice“-Varianten

Die PDE1-Isoenzymfamilie wird von drei verschiedenen Genen codiert. Zur Zeit sind die Isoformen PDE1A, PDE1B und PDE1C bekannt. Durch alternatives „splicing“ – sowohl am NH<sub>2</sub>- als auch am COOH-Terminus – entstehen funktionell unterschiedliche Isoenzyme mit verschiedenen katalytischen und regulatorischen Eigenschaften (Kakkar et al., 1999; Conti und Jin, 2000). Von PDE1A sind drei „splice“-Varianten bekannt, von PDE1C fünf (Conti und Jin, 2000; Abb. 15).



**Abb. 15:** Schematische Darstellung der bekannten PDE1-„splice“-Varianten (nach Conti und Jin, 2000, verändert)

Die PDE1-Isoenzyme unterscheiden sich deutlich in ihren kinetischen Eigenschaften bei der Umsetzung von cAMP und cGMP. Während PDE1A und PDE1B eine größere Affinität zu cGMP zeigen, weist PDE1C für beide Nucleotide ähnlich hohe Affinitäten auf (Tab. 5; Zhao

et al., 1997; Juilfs et al., 1999; Conti und Jin, 2000). Für PDE1C1 konnte gezeigt werden, daß sich die Substrate cAMP und cGMP gegenseitig kompetitiv hemmen können, was die Vermutung nahe legt, daß beide Substrate an derselben katalytischen Stelle des Enzyms hydrolysiert werden (Yan et al., 1996).

**Tab. 5:** Kinetische Eigenschaften der PDE-Isoenzyme (Zhao et al., 1997)

PDE1-Isoenzym	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	
	cAMP	cGMP
PDE1A2	$112.7 \pm 7.9$	$5.0 \pm 0.6$
PDE1B1	$24.3 \pm 2.9$	$2.7 \pm 0.2$
PDE1C2	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.1 \pm 0.2</math></b>

Darüber hinaus zeigen die verschiedenen PDE1C „splice“-Varianten eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ . So weisen PDE1C1 und PDE1C4/5 eine niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität als PDE1C2 auf. Da sich diese PDEs bezüglich ihres N-Terminus unterscheiden (Abb. 15), unterstützt diese Beobachtung die Vermutung, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Bindungsstelle in diesem Bereich lokalisiert ist. PDE1C1 und PDE1C4/5 unterscheiden sich hinsichtlich ihres C-Terminus (Abb. 15). Da ihre kinetischen Eigenschaften und ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit trotz dieses Unterschieds sehr ähnlich sind, kann davon ausgegangen werden, daß das C-terminale Ende weder für die katalytische Aktivität noch für die CaM-Bindung eine wichtige Rolle spielt. (Yan et al. 1996) Es ist daher wahrscheinlich, daß die Unterschiede in der N-terminalen Region der PDE1-Isoformen die Grundlage der verschiedenen Bindungsaffinitäten zu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM bilden (Zhao et al., 1997; Conti und Jin, 2000). Für PDE1A1 und PDE1A2 konnten sogar zwei CaM-Bindungsdomänen identifiziert werden. Eine der Domänen liegt dabei etwa 100 Aminosäuren weiter N-terminal als die andere. Letztere ist bei allen bekannten CaM-PDEs hoch-konserviert, wohingegen die zweite Domäne in der N-terminalen Region von PDE1A nur teilweise konserviert vorliegt. Zwischen den beiden CaM-Domänen ist eine hoch-konservierte inhibitorische Domäne lokalisiert. Diese scheint die CaM-abhängigen PDEs in einem weniger aktiven Zustand zu halten, wobei die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM diesen Effekt wieder aufhebt und die Enzyme aktiviert. (Zhao et al., 1997)

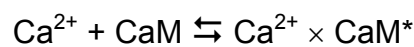
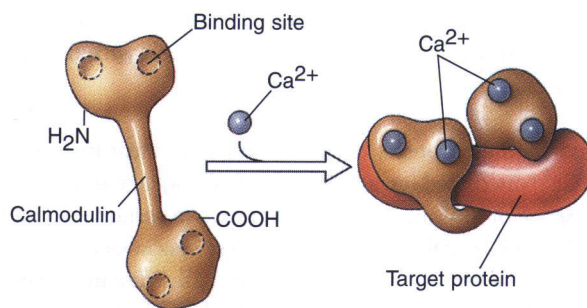
### Aktivierung der PDE1 durch $\text{Ca}^{2+}$ /CaM

CaM ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen regulatorischen Aktivitäten gegenüber vielen Enzymen und Proteinen (Wang und Waisman, 1979; Randall et al.,

1997). Der Name Calmodulin wurde von Cheung et al. (1978) postuliert und leitet sich von „calcium-dependent modulator protein“ ab. Obwohl CaM in allen tierischen Geweben vorkommt, ist die Verteilung der verschiedenen CaM-regulierten Proteine gewebespezifisch (Wang und Waisman, 1979).

Die Polypeptidkette des CaM besteht aus 148 Aminosäuren und besitzt vier Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$  (Randall et al., 1997). Nach Bindung von vier Molekülen  $\text{Ca}^{2+}$  kommt es durch Erhöhung der helicalen Strukturen zu einer Konformationsänderung in der Sekundärstruktur des CaM-Proteins. Es konnte gezeigt werden, daß sogenannte „high-“ und „low-affinity sites“ für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  existieren. So konnten im CaM des Rinderhirns drei „high-“ und eine „low-affinity-site“ bzw. eine „zwei zu zwei-Verteilung“ dieser sites nachgewiesen werden. Die Veränderungen an der Sekundärstruktur von CaM werden hauptsächlich durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die „high-affinity sites“ ausgelöst. (Wang und Waisman, 1979)

Alle PDE1-Isoenzyme werden durch CaM in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert. Dieser Aktivierung kann durch Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA entgegengewirkt werden (Wang und Waisman, 1979). Zur Stimulierung der PDE1 bedarf es physiologischer Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$  und CaM (Kakkar et al., 1999).

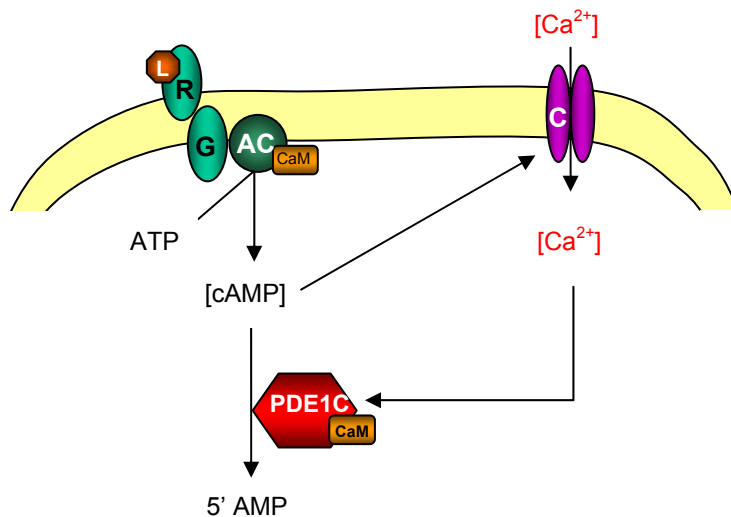


**Abb. 16:** Mechanismus der Aktivierung eines Zielproteins durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Randall et al., 1997; Wang et al., 1975). CaM: Calmodulin,  $\times$ : Bindung von x an y,  $*$ : aktivierter Zustand des Proteins

Dabei wird davon ausgegangen, daß sowohl CaM als auch die PDE1 in interkonvertierbaren aktiven und inaktiven Konformationen vorliegen. Die Enzymaktivierung erfolgt dann als stufenweiser Prozeß über vier separate Reaktionen (Abb. 16). In einem ersten Schritt erfolgt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin. Die durch diese Bindung ausgelöste Konformationsänderung überführt CaM einem aktiven Zustand. Das aktivierte CaM kann nun an die PDE1 bin-

den und in einem letzten Schritt das Enzym von seiner inaktiven in seine aktive Form konvertieren (Wang et al., 1975; Wang und Waisman, 1979).

Die allosterische Regulation der PDE1 durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  führt zu einer gesteigerten Hydrolyse von cAMP und cGMP (Yu et al., 1997). So können CaM-abhängige PDEs als Vermittler zwischen dem „second messenger“  $\text{Ca}^{2+}$  und dem „second messenger“-System der cyclischen Nucleotide angesehen werden (Yu et al., 1997; Beavo, 1995). Dies erlaubt eine Regulation der cNMP-abhängigen Prozesse durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. (Beavo, 1995). Yan et al. (1995) und Zhao et al. (1997) haben für die Signaltransduktion des Geruchsinns ein Modellschema für einen solchen „Cross-Talk“ postuliert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Modellschema für das Zusammenspiel von CaM-PDE, cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  in der Signaltransduktion (nach Yan et al., 1995, verändert)

AC: Adenylat-Cyclase, 5' AMP: 5' Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat, C: cAMP-abhängiger Kationen-Kanal, CaM: Calmodulin, G: G-Protein, L: Ligand, PDE1C: Phosphodiesterase 1C, R: Rezeptor

Ein Ligand (hier: Geruchsstoff) lagert sich an seinen entsprechenden Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors wird durch G-Proteine an eine CaM-abhängige Adenylat-Cyclase vermittelt. Durch die Aktivierung der Adenylat-Cyclase erhöht sich der Spiegel an intrazellulärem cAMP, was zu einem Öffnen cAMP-abhängiger Kationen-Kanäle in der Zellmembran führt. Dadurch kann  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmen und an CaM binden. Der  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex kann nun in Folge die CaM-abhängige PDE1 (hier: PDE1C2) aktivieren, welche ihrerseits das cAMP zu 5' AMP hydrolysiert. Eine schnelle Termination des durch cAMP ausgelösten elektrischen Signals ist essentiell, da ein Lebewesen in der Lage sein muß, einen weiteren sensori-

schen Reiz schnell zu verarbeiten, um sich in seiner Umwelt zurechtzufinden. (Yan et al., 1995)

Auftretende Unterschiede in der CaM-Affinität der verschiedenen PDE1-Isoenzyme könnten mit der relativen CaM-Konzentration im dem Gewebe zusammenhängen, in welchem die entsprechende Isoform exprimiert wird (Kakkar et al., 1999). So ist im Säugerhirn die CaM-Konzentration etwa um das zehnfache höher als im Herzgewebe (Klee und Vanaman, 1982).

### **Gewebe-Expression**

Die PDE1-Isoenzyme werden gewebe- und zelltyp-spezifisch exprimiert (Kakkar et al., 1999; Zhao et al., 1997; Yan et al., 1996). Die höchste Expression an PDE1 wird dabei in Gehirn, Herz, glatten Muskelzellen, olfaktorischen Cilien, Lunge, Niere und Testis lokalisiert (Sigma-Aldrich; Dousa, 1999; Yan et al., 1996; Yan et al., 1995).

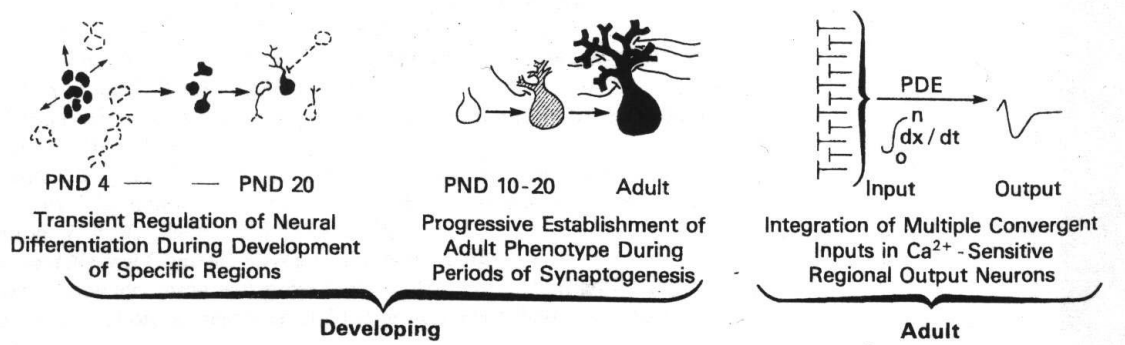
Die Anreicherung eines bestimmten PDE-Isoenzym wird oft mit einer bestimmten, regionalen Funktion in Verbindung gebracht (Yan et al., 1996). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die kinetischen Eigenschaften der entsprechenden PDE1-Isoform mit den Bedürfnissen des entsprechenden Zell-oder Gewebetyps am besten korrespondieren. Die Verteilungsmuster der CaM-PDEs im Gehirn der Maus (Tab. 6) lassen vermuten, daß PDE1-Isoenzyme unterschiedliche physiologische Rollen in der regionalen Regulation von cNMPs spielen. (Zhao et al., 1997).



**Tab. 6:** Verteilung der verschiedenen PDE1-Isoformen auf bestimmte Hirnregionen der Maus. Der Tabelle zugrunde liegen mRNA-Bestimmungen in neuronalen Zellkörpern (Zhao et al.1997; Yan et al., 1996; Yan et al., 1995)

PDE1A	PDE1B	PDE1C
<p>höchste Level in</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Großhirnrinde</li> <li>• Pyramidenzellen der CA1 und CA4-Regionen des Hippocampus</li> </ul>	<p>hohe Level in</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Putamen caudate</li> <li>• Nucleus accumbens</li> <li>• Tuberculum olfactorium</li> <li>• Purkinje-Zellen des Kleinhirns</li> <li>• Gyrus dentatus im Hippocampus</li> </ul>	<p>niedrige Level im</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorderhirn</li> </ul> <p>moderate Level im:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kleinhirn</li> </ul> <p>hohe Level in</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bulbus olfactorius/ Riechepithel</li> </ul> <p>weiteres Vorkommen in</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuronen der Körnerschicht des Kleinhirns</li> <li>• Purkinje-Zellen</li> <li>• nucleus centralis amygdalae</li> <li>• nucleus spinalis trigemini</li> <li>• Putamen caudate</li> </ul>

Im sich entwickelnden Rattenhirn steigt die PDE-Aktivität in der Zeitspanne nach der Geburt drastisch an (Kincaid et al., 1992). Die Entwicklungsmuster der PDE-Expression sind dabei komplex und region-spezifisch (Billingsley et al., 1990). Der beobachtete Anstieg der PDE-Expression verläuft parallel zum Ablauf der neuronalen Innervation (Abb. 18; Kincaid et al., 1992). Ebenso konnte durch *in vitro*-Versuche gezeigt werden, daß cNMPs bestimmte differenzierende Effekte auf embryonale Säugerzellen haben (Friedman, 1976). Diese Effekte wirken sich auf die Motilität migrierender Zellen aus, indem sie diese polarisieren (Kincaid et al., 1992).



**Abb. 18:** Darstellung verschiedener möglicher Rollen der PDE1 im sich entwickelnden und adulten ZNS (Kincaid et al., 1992). PND: „post natal days“ ≡ Tage nach der Geburt

Im adulten Rattenhirn zeigt die regionale Lokalisation von CaM-PDEs eine ausgesprochene Selektivität im Expressionsmuster (Kincaid et al., 1987). Ein gemeinsames Merkmal von Neuronen mit hoher PDE-Aktivität ist die große Anzahl synaptischer Kontakte und eine axonale Weiterleitung an einen einzigen Ort. Ein Neuron, welches eine große Menge an Informationen verarbeiten muß, könnte darüber hinaus  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ereignisse dazu benutzen, die intrazellulären cNMP-Level zu modulieren (Abb. 17). So könnte eine zeitliche und räumliche Summation von Signalen erleichtert werden (Abb. 18, Kincaid et al., 1992).

### Inhibitoren

Zur Zeit ist es ein großes Problem, spezifische PDE1-Inhibitoren zu erwerben, da bei der Entwicklung dieser Hemmstoffe keine Fortschritte zu verzeichnen sind. So hemmen viele potente PDE1-Inhibitoren wie z.B. Zaprinast auch andere PDE-Isoenzyme. Als wichtiger PDE1-Inhibitor wird Vinpocetin (Abb. 19) angesehen. (Perry und Higgs, 1998) Diese Substanz hemmt selektiv CaM-PDEs, indem sie mit der katalytischen Einheit des Enzyms interagiert. Dabei werden PDE1A- und PDE1B-Isoenzyme etwa um das Dreifache stärker gehemmt als PDE1C. Eine selektive Unterscheidung von „splice-Varianten“ durch Einsatz von Vinpocetin ist nicht möglich. (Yan et al., 1996)

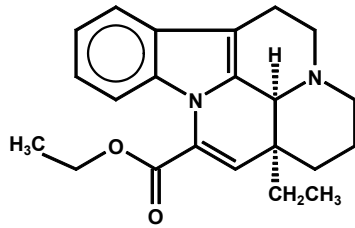


Abb. 19: Strukturformel von Vinpocetin

Viele andere PDE1-Inhibitoren wie Calmidazoliumchlorid (Abb. 20) wirken als CaM-Antagonisten (Kakkar et al., 1999) und haben demzufolge auch Effekte auf andere durch CaM regulierte Proteine.

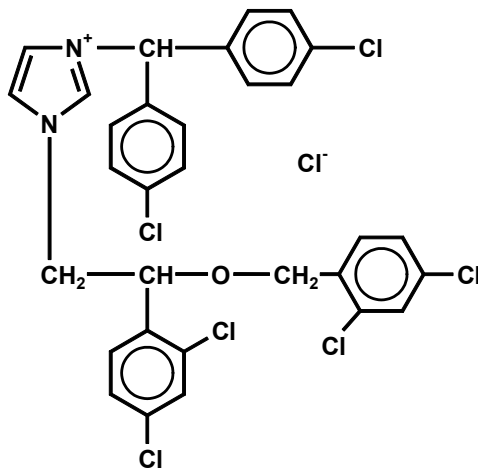


Abb. 20: Strukturformel von Calmidazoliumchlorid

Als weitere PDE1-Inhibitoren sind noch 8-Meom-IBMX und W7-Hydrochlorid zu nennen. Die Effektivität eines Hemmstoffs in einem *in-vitro*-System ist meist nicht mit der Wirksamkeit *in vivo* vergleichbar, da Parameter wie Permeabilität, Verteilung und Metabolismus der Substanz nicht mitberücksichtigt werden (Kakkar et al., 1999). Es wäre wünschenswert, einen selektiven, auch *in vivo* einsetzbaren PDE1-Inhibitor zu entwickeln. Da die PDE1 eine wichtige Rolle im „Cross-Talk“ zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ - und cNMP-„second messenger“-Wegen erfüllt, würde sie sich als vielversprechendes Ziel bei der Therapie verschiedener Krankheiten des ZNS, des kardiovaskulären Systems und des Immunsystems anbieten (Perry and Higgs, 1998; Juilfs et al., 1999)

## 2.5.2 Die PDE4-Isoenzymfamilie

Charakteristisch für die PDE4-Isoenzymfamilie ist ihre hohe Spezifität und Affinität zu cAMP (Bolger et al., 1997). Aus diesem Grund wird die PDE4 auch als cAMP-spezifische PDE bezeichnet (Dousa, 1999). Darüberhinaus zeigen PDE4-Isoenzyme eine geringe cGMP-Affinität und eine Insensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Conti und Jin, 2000; Dousa, 1999; Cherry und Davis, 1999). Die  $K_m$ -Werte für die Hydrolyse von cAMP und cGMP sind in Tab. 7 aufgelistet.

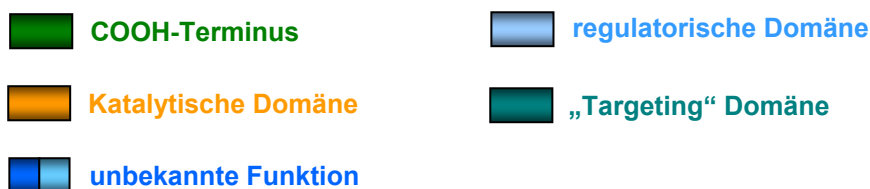
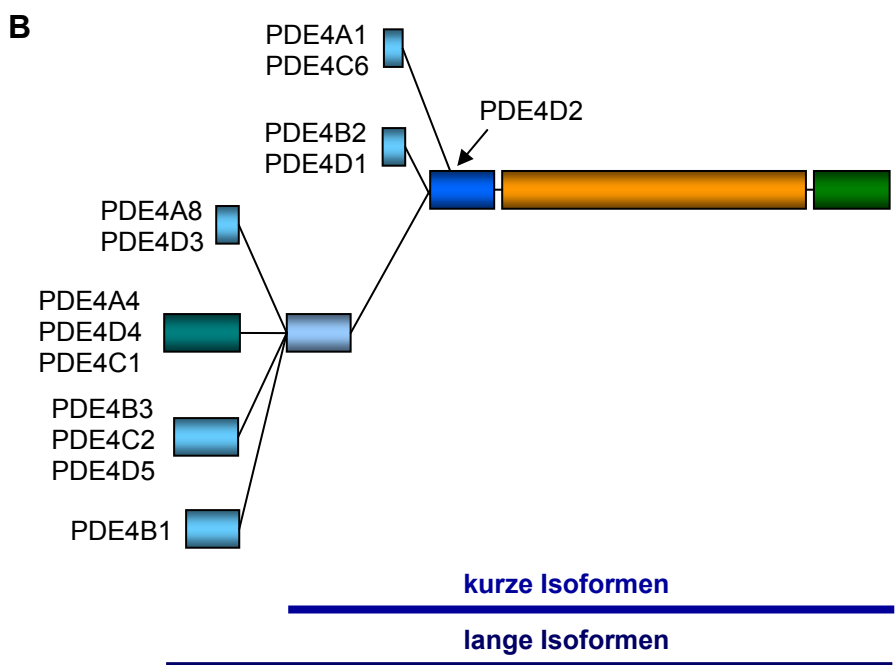
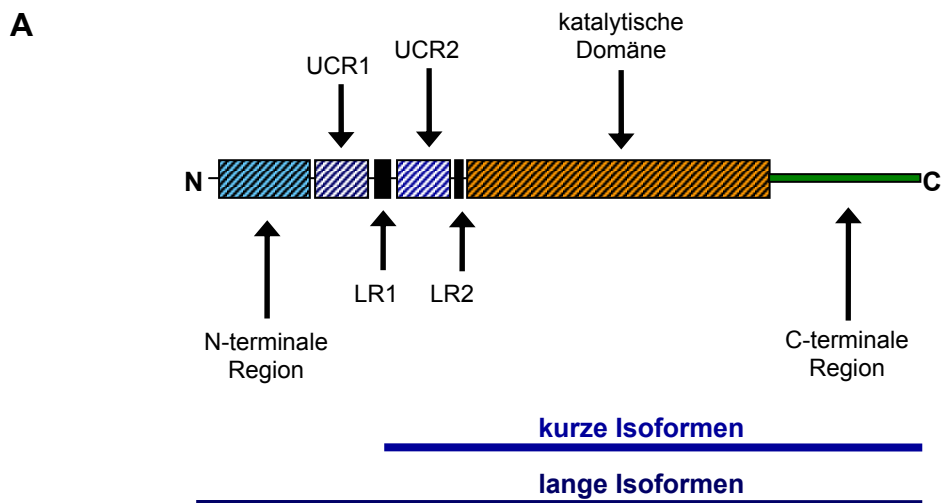
**Tab. 7:**  $K_m$ -Werte der PDE4-Isoenzymfamilie für cAMP und cGMP (Palfreyman, 1995)

PDE4	cAMP	cGMP
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.5-2	> 50

Es besteht eine große Sequenzhomologie zwischen den PDE4-Isoenzymen und dem Genprodukt des *dunce*-Gens von *Drosophila melanogaster* (Engels et al., 1995). Versuche an *Drosophila* haben gezeigt, daß Mutationen im *dunce*-Gen zu Verlusten beim olfaktorisch-assoziativen Lernen und Gedächtnis führen (Tully und Quinn, 1985; Dudai et al., 1976). Aus diesem Grund wird angenommen, daß bei Säugern die Regulation der cAMP-Spiegel durch cAMP-spezifische PDEs ebenfalls eine wichtige Rolle in neurophysiologischen Prozessen wie z.B. Lernverhalten und Erinnerungsvermögen spielt (Engels et al., 1995).

### Die PDE4 „splice“-Varianten

Die PDE4-Subfamilie wird von den vier verschiedenen Genen PDE4A, PDE4B, PDE4C und PDE4D codiert, welche wiederum eine große Anzahl an „splice“-Varianten (Abb. 21B) aufweisen (Dousa, 1999). Viele dieser Isoformen unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften, Phosphorylierungen, intrazellulärem „Targeting“, Protein-Protein-Interaktionen und Expressionsmustern in verschiedenen Geweben (Bolger, 1994; Beavo, 1995; Conti et al., 1995).



**Abb. 21:** A: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PDE4-Isoformen (nach Scotland et al., 1998, verändert). LR: Linker-Region, UCR: „upstream conserved region“

B: Schematische Darstellung der PDE4-„splice“-Varianten (nach Conti und Jin, 2000, verändert)

Die verschiedenen PDE4-Isoformen besitzen drei verschiedene, konservierte Regionen: die katalytische Region sowie zwei aminoterminal liegende Regionen, welche als UCR1 und UCR2 („upstream conserved regions“) bezeichnet werden (Bolger, 1994). PDE4-Isoenzyme, welche sowohl UCR1 als auch UCR2 beinhalten, werden auch als lange Isoformen (> 93 kDa) bezeichnet; den kurzen Isoformen (< 72 kDa) fehlt UCR1 (Bolger et al., 1997; Dousa, 1999, Abb. 21A). Im Gegensatz zur PDE1 erfahren die PDE4-Isoenzyme alternatives „slicing“ nur am Aminoterminal; die C-terminale Region ist PDE-klassenspezifisch (Cherry und Davis, 1999; Houslay et al., 1998).

### **Gewebe-Expression**

Die PDE4-Isoenzyme scheinen ubiquitär exprimiert zu werden (Sigma-Aldrich). Man findet sie – neben inflammatorischen Zellen (z.B. Makrophagen, T-Lymphocyten), Epithelzellen, Lunge und Herz (Palfreyman, 1995; Houslay et al., 1998) – auch im ZNS der Säugetiere, wo sie vermutlich unter anderem Funktionen des Lernvermögens und des Gedächtnisses beeinflussen (Zhang et al., 1999). Es scheint wahrscheinlich, daß sich die PDE4-Expression entwicklungsbedingt verändert. So wurde gezeigt, daß im Hippocampus der Ratte die PDE4-Aktivität in den ersten zehn Tagen nach der Geburt ansteigt. Danach folgt eine Phase, in welcher die PDE4-Aktivität konstant bleibt. Etwa drei Wochen nach der Geburt steigt die PDE4-Aktivität erneut an, bis der PDE-Spiegel eines adulten Tieres erreicht ist. (Zhang et al., 1999)

Die Daten in Tab. 8. machen deutlich, daß die verschiedenen PDE4-Isoformen unterschiedliche, zum Teil überlappende Expressionsmuster im Gehirn aufweisen. Durch PCR-Analysen konnte gezeigt werden, daß von den PDE4-Isogenen (PDE4A-D) PDE4C im Gehirn nur sehr schwach exprimiert ist (Engels et al., 1995). Aus diesem Grund wird die PDE4C in Tab. 8 nicht berücksichtigt.

**Tab. 8:** Verkürzte Darstellung der Verteilung verschiedener PDE4-Isoformen auf bestimmte Hirnregionen der Ratte. Die der Tabelle zugrunde liegenden Werte wurden durch *in situ*-Hybridisierung ermittelt (Engels et al., 1995). Angegeben sind die relativen Expressionslevel.

Hirnregion	PDE4A	PDE4B	PDE4D
Olfaktorisches System			
• Bulbus olfactorius	+++	++	+++
• Tuberculum olfactorium	+++	+	+
• primärer olfaktorischer Cortex	+++	++	++
Cortex			
• somatosensorisch	+++	++	-
• motorisch	+++	++	+
Hippocampus (Pyramidenzellen)			
• CA1	+++	++	+++
• CA2-CA4	+++	+++	+++
• Gyrus dentatus	+++	-	+++
Basalganglien			
• Septum	++	-	+
• Nucleus anteriores	+	++	-
• Nucleus posteriores	++	-	+
• Amygdala	-	++	-
Mittelhirn			
• Substantia nigra compacta	++	-	+
• Tractus opticus	-	-	+++
Kleinhirn			
• Lobulus, Körnerschicht	+++	+++	+++

+++ : hohe Expression; ++ : moderate Expression, + : schwache Expression, - : sehr niedrige Expression bzw. Hintergrund

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß ein einzelnes Neuron alle PDE4-Isoformen exprimieren kann (Engels et al., 1994). Diese könnten dann in verschiedenen subzellulären Kompartimenten derselben Zelle lokalisiert sein (Shakur et al., 1993; Kithas et al., 1989) und dort eine differentielle Regulation erfahren (Engels et al., 1995).

## Inhibitoren

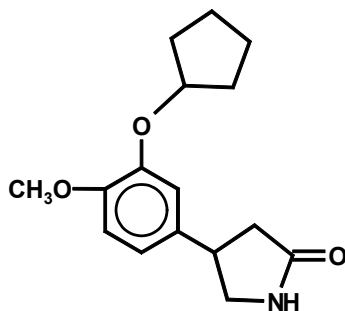
PDE4-Hemmstoffe werden als potentielle Therapeutika für ein breites Spektrum an Krankheiten diskutiert. Dazu gehören z. B. Asthma, Depressionen, septischer Schock, Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Restenose, Cachexie und verschiedene Formen der Arthritis. Dabei kommt dem anti-inflammatorischen und anti-asthmatischen Potential der verschiedenen Inhibitoren besondere Bedeutung zu. (Houslay et al. 1998)

Allerdings zeigen Studien an Nagern, daß PDE4-spezifische Inhibitoren eine große Anzahl unerwünschter Nebenwirkungen auf das Verhalten der Tiere aufweisen (Cherry und Davies, 1999). Dazu gehören Hypoaktivität, Tremor der Vorderpfoten, Kopfzucken und Einfluß auf das Putzverhalten (Wachtel, 1982; Griebel et al., 1991). Viele PDE4-Inhibitoren zeigen in Tiermodellen anti-depressive Effekte (O'Donnell, 1993).

Als PDE4-Hemmstoffe sind unter anderem Rolipram, Ro 20-1724 und Denbufyllin zu nennen (Houslay et al., 1998; Perry und Higgs, 1998). Da in der vorliegenden Arbeit die Hemmwirkungen von Rolipram und des PDE4-Inhibitors DC-TA-46 näher untersucht werden, wird auf diese Verbindungen im folgenden näher eingegangen.

### *Rolipram*

Einer der bekanntesten und potentesten PDE4-Hemmstoffe ist das Pyrrolidinon-Derivat Rolipram (Abb. 22.), eine neuroaktive Verbindung, welche in klinischen Studien als Anti-Depressivum eingesetzt worden ist (Cherry und Davies, 1999). Es wird angenommen, daß verhaltensspezifische Effekte von Rolipram postsynaptisch vermittelt werden (Wachtel und Schneider, 1986).



**Abb. 22:** Strukturformel von Rolipram (4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidinon)

Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die verschiedenen PDE4D-Isoformen hinsichtlich ihrer Rolipram-Hemmbbarkeit unterscheiden. Die  $K_m$ -Werte für die Hydrolyse von cAMP sind jedoch vergleichbar. Diese Beobachtung läßt die Vermutung zu, daß die Bindungsstelle für



Rolipram nicht dieselbe wie für das Substrat cAMP ist. (Bolger et al., 1997) Es konnte gezeigt werden, daß der selektive PDE4-Inhibitor Rolipram neben der katalytischen Einheit (Pal-freyman, 1995) auch an eine weitere Bindungsstelle stereoselektiv und mit hoher Affinität binden kann (Schneider et al., 1986).

Alternativ dazu besteht die Meinung, daß Rolipram an die katalytische Einheit der PDE4 bin-det und so als kompetitiver Inhibitor wirkt (Huston et al., 1996; Livi et al., 1990; Wilson et al., 1994). PDE4 könnte dann in zwei interkonvertiblen Formen vorkommen, welche sich bezüglich ihrer Fähigkeit, Rolipram zu binden, unterscheiden. Man spricht deshalb von auch von „low“- und „high-affinity“-Rolipram-Bindungsstellen. Die „high-affinity“-Bindungsstelle ist vor allem im Hirngewebe zu finden. (Houslay et al., 1998)

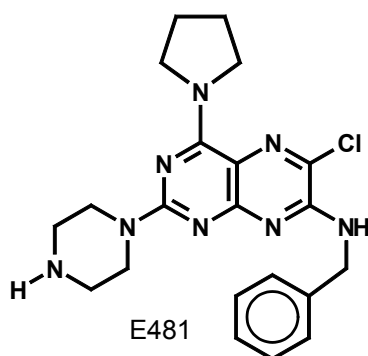
Rolipram kann nicht zwischen den einzelnen Subtypen der PDE4-Familie diskriminieren; die  $IC_{50}$ -Werte sind jedoch in einem gewissen Rahmen isoform-spezifisch (Houslay et al., 1998). Schneider et al. (1986) konnten durch Bindungsstudien zeigen, daß das R-(-)-Rolipram-Enantiomer etwa 20-mal stärker an die „high-affinity“-Bindungsstelle binden kann als das S-(+)-Enantiomer. Die PDE4-Aktivitätshemmung zeigt jedoch nur in geringem Maße Chiralitätseinfluß (Houslay et al., 1998).

Als Nebenwirkungen einer Behandlung mit Rolipram treten beim Menschen Erbrechen, Übelkeit, transienter Abfall der Plasma-Osmolarität, Stimulierung der Säuresekretion im Gastrointestinaltrakt und somit gastrointestinale Störungen, sowie Schläfrigkeit auf (Eban und Ruther, 1985; Sturgess und Searle, 1990; Puurunen et al., 1978; Houslay et al., 1998).

Es wird angenommen, daß die Bindung von Rolipram an das katalytische Zentrum der PDE die anti-inflammatorischen Eigenschaften bestimmt und die Bindung an die zweite postulierte Bindungsstelle für die Nebenwirkungen verantwortlich ist (Barnette et al., 1995). Eine mögliche Lösung für einen effektiveren therapeutischen Einsatz von Rolipram und verwandten Verbindungen wäre zum einen die Generierung subtypspezifischer Inhibitoren, zum anderen die Herstellung von Verbindungen, die nur schwach mit der Rolipram-Bindungsstelle, welche die Nebenwirkungen kontrolliert, interagieren (Schmiechen et al., 1990; Barnette et al., 1995).

**DC-TA-46**

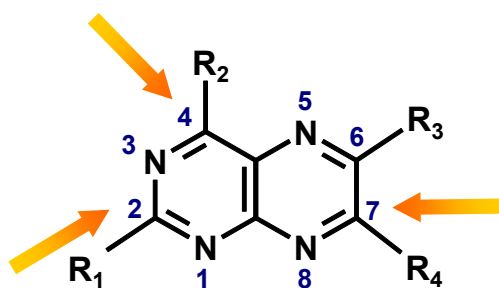
Als besonders potenter PDE4 Inhibitor gilt das Pteridin-Derivat DC-TA-46 (Abb. 23), welches in einem weiten Spektrum von Tumorzellen Wachstumshemmung bewirkt (Merz et al., 1998).



**Abb. 23:** Strukturformel von DC-TA-46 (7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin; E481)

Drees et al. (1993) konnten in B16-Melanomzellen und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach Inkubation mit DC-TA-46 einen dosisabhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel bei gleichzeitiger Wachstumshemmung zeigen. Versuche an der humanen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L zeigen einen durch DC-TA-46 ausgelösten Arrest der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus mit nachfolgender Apoptose (Marko et al., 2000). Durch Untersuchungen mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß sich DC-TA-46 hauptsächlich in der perinucleären Region von Zellen einlagert (Marko et al., 2002).

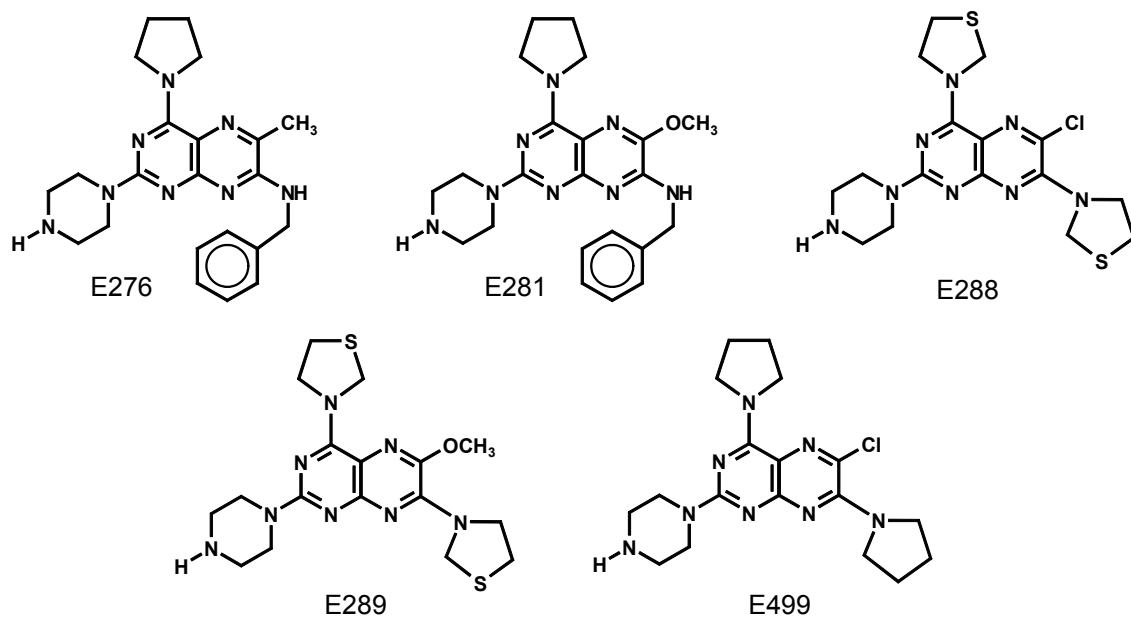
Wie Rolipram ist DC-TA-46 nicht in der Lage, zwischen den verschiedenen PDE4-Subtypen zu diskriminieren (Marko et al., 2002).



**Abb. 24:** Darstellung des Pterin-Grundgerüsts mit den für die Hemmwirkung wichtigen Substitutionsstellen.

Um die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen DC-TA-46 und PDE4 einerseits und die Hemmung des Zellwachstums andererseits näher zu untersuchen, werden im Arbeitskreis von

Prof. Eisenbrand (Universität Kaiserslautern) von K.-H. Merz und Mitarbeitern neue Pteridine mit DC-TA-46-analoger Struktur synthetisiert. Merz et al. (1998) konnten zeigen, daß Veränderungen in der 7-Position des Pteridin-Rings (Abb. 24) kaum Einfluß auf die Hemmwirkung der Substanz haben, wohingegen eine Verkleinerung des Substituenten in der 4-Position eine deutliche Reduktion der PDE4-Hemmung zur Folge hat. Modifikationen an der 2-Position des Pteridin-Rings führen zu den stärksten Veränderungen der inhibitorischen Eigenschaften. Inzwischen wurden neue Derivate mit in 4- und 7-Position identischen Substituenten hergestellt, die ähnliche inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Pteridin-Derivate sind in Abb. 25 dargestellt.



**Abb. 25:** Pteridin-Derivate mit DC-TA-46-analoger Struktur

E276: 7-Benzylamino-6-methyl-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin, E281: 7-Benzyl-amino-6-methoxy-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin, E288: 6-Chloro-2-piperazino-4,7-dithiazolidino-pteridin, E289: 6-Methoxy-2-piperazino-4,7-dithiazolidino-pteridin, E499: 6-Chloro-2-piperazino-4,7-dipyrrolidino-pteridin

### 3 Problemstellung

Arbeiten im Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand haben gezeigt, daß niedrige cAMP-Spiegel in Tumorzellen mit erhöhter Aktivität an cAMP-hydrolysierenden PDE-Isoenzymen korreliert sind. Untersuchungen an murinen Keratinocyten in verschiedenen Stadien der malignen Transformation zeigten im Vergleich zu nicht-transformierten Keratinocyten einen signifikanten Anstieg der PDE-Aktivität bei gleichzeitig signifikant verringertem cAMP-Spiegel mit zunehmender Malignisierung. Die gemessene PDE-Aktivität konnte vor allem der PDE4-Familie zugeordnet werden (Marko et al., 1998).

Im Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand wurden 60 humane Tumorzelllinien aus dem „Drug Development Program“ des NCI (National Cancer Institute, USA) bezüglich ihrer cAMP-spezifischen PDE-Aktivität sowie ihrer PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob die PDE4 generell und unabhängig vom Zellursprung in humanen Tumorzellen die am stärksten exprimierte PDE-Isoform ist. Die Ergebnisse zeigten, daß tatsächlich in 45 von 60 Zelllinien die PDE4-Familie die höchste cAMP-hydrolysierende Aktivität darstellt. In den übrigen Zelllinien war nur eine geringe PDE4-Aktivität, jedoch überwiegend PDE1-Aktivität nachweisbar. Besonders auffällig ist, daß fünf von sechs untersuchten ZNS-Tumorzelllinien eine hohe CaM-stimulierbare PDE1-Aktivität bei gleichzeitig niedriger PDE4-Aktivität aufwiesen. Semi-quantitative Real-Time PCR-Analysen zeigen, daß in den ZNS-Tumorzelllinien hauptsächlich die PDE1C-Isoform exprimiert wird. Die Signale für Transkripte von den PDE-Isoformen PDE4A, 4B und 4D waren deutlich schwächer (Marko et al., 2000).

Die PDE1-Isoenzyme unterscheiden sich u.a. deutlich in ihren kinetischen Eigenschaften. Während PDE1A und PDE1B eine größere Affinität zu cGMP zeigen, weist PDE1C für beide Nucleotide ähnlich hohe Affinitäten auf (Zhao et al., 1997; Juilfs et al., 1999; Conti und Jin, 2000). Der  $K_m$ -Wert der PDE1C-Isoform für die cAMP-Hydrolyse mit  $\sim 1 \mu\text{M}$  (Zhao et al., 1997) ist vergleichbar mit dem  $K_m$ -Wert der cAMP-spezifischen PDE4-Isoenzyme. Deshalb kann vermutet werden, daß die PDE1C in den ZNS-Tumorzellen eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der cAMP-Homöostase übernimmt, vergleichbar der von PDE4 in epithelialen Tumoren. Die Hemmung der PDE1C-Isoenzyme in ZNS-Tumorzellen könnte somit ein vielversprechender Ansatz zur anti-neoplastischen Therapie von Tumorerkrankungen des ZNS darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF295, SF539 und SF268, welche zu den ZNS-Tumorzelllinien des „NCI-Panels“ gehören, näher charakteri-

siert werden. Dazu werden Untersuchungen zur cAMP- und cGMP-spezifischen PDE-Aktivität und die Bestimmung der intrazellulären Spiegel der „second messenger“ cAMP, cGMP und  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Dies soll eine Identifizierung subtypspezifischer bzw. tumorassoziiertes PDE1-Subtypen ermöglichen und ihre Bedeutung für Biologie und Therapie von ZNS-Tumoren näher beleuchten. Um zu überprüfen, ob eine Hemmung der PDE1 zur Hemmung des Tumorzellwachstums führt, werden verschiedene PDE1- und PDE4-Inhibitoren auf ihr wachstumshemmendes Potential untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung einer ZNS-tumorassoziiertes PDE1 erfolgt die Klonierung und Überexpression einer rekombinanten PDE1C aus einer humanen Biopsieprobe eines anaplastischen Astrocytoms. An der rekombinanten PDE1C wird die Hemmung der cAMP-Hydrolyse durch ausgewählte PDE -Inhibitoren untersucht.

Um die PDE-Aktivität und das Verhalten der „second messenger“ zwischen nicht-malignen ZNS-Zellen und Glioblastomzellen besser vergleichen zu können, soll ein Zellmodell der Ratte etabliert und charakterisiert werden. Dieses Zellmodell soll die effektive Testung neuer Hemmstoffe ermöglichen und die Basis für ein mögliches Tiermodell zur Therapie von ZNS-Tumoren bilden. Es erfolgen u.a. vergleichende Untersuchungen zum PDE1- und PDE4-Expressionsmuster an nicht-malignen subkultivierten Ratten-Astrocyten und der Ratten-Glioblastomzelllinie C6. Darüber hinaus werden die cNMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bestimmt. Verschiedene PDE1- und PDE4-Inhibitoren werden auf ihr wachstumshemmendes Potential getestet.

Die geplanten Untersuchungen sollen Aufschluß darüber geben, ob der PDE1C-Subtyp ein mögliches neues Target für die Therapie von ZNS-Tumoren darstellt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Zellen/Zelllinien

#### 4.1.1 Zelllinien humanen Ursprungs

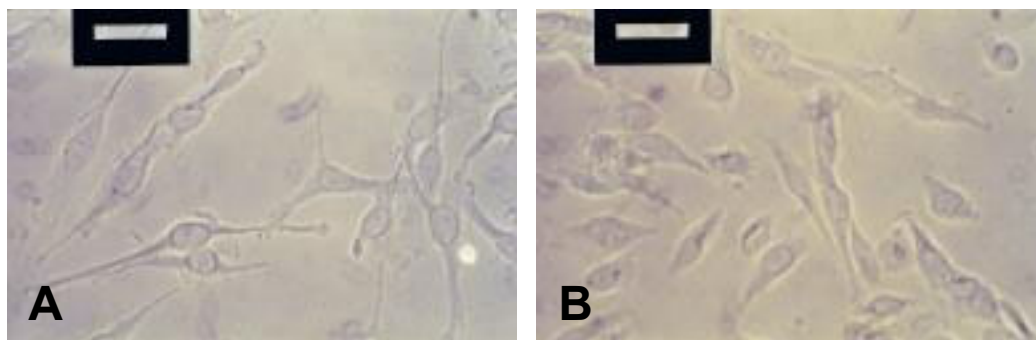
Die humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF295, SF539 und SF268 stammen aus dem 60 Tumorzelllinien umfassenden Zelllinienpanel des „Drug Development Program“ des National Cancer Institutes (NCI). Die Passagenanzahl der Zelllinien bei Übergabe ist unbekannt.

##### 4.1.1.1 Die Glioblastomzelllinie SNB75

Die Zelllinie SNB75 (Abb. 26A) wurde aus einem unbehandelten Glioblastom einer Patientin unbekanntes Alters etabliert. Tumorphistologisch wird die Zelllinie als multiformes Glioblastom eingeordnet; der Phänotyp entspricht dem eines Gliazellneoplasmas. (Stinson et al., 1992)

Da keine Angaben zu Karyotyp und Verdopplungszeit dieser Zelllinie vorlagen, wurden beide Parameter im Rahmen dieser Arbeit ermittelt (siehe 5.4).

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgt in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte.



**Abb. 26:** **A:** SNB75 (Passage x + 28), **B:** SF295 (Passage x + 53)

Um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden diese mit einem Gemisch aus 5 % Propylgalat, 5 % Aqua bidest. und 90 % Glycerol überschichtet. Der Maßstab entspricht 5 mm auf dem Film (Vergrößerung 160×).

#### **4.1.1.2 Die Glioblastomzelllinie SF295**

Die Zelllinie SF295 (Abb. 26B) wurde aus einem Glioblastom einer 67 Jahre alten Patientin etabliert. Der Originaltumor war links temporal im Gehirn lokalisiert und strahlentherapeutisch behandelt. (Stinson et al. 1992, Rutka et al., 1987)

Tumorhistologisch wird SF295 als multiformes Glioblastom eingeordnet; der Phänotyp entspricht dem eines Glioblastoms (Stinson et al., 1992). SF295 besitzt einen hypertriploiden Chromosomensatz (Rutka et al., 1987).

Die Verdopplungszeit der Zelllinie beträgt 34 Stunden; die Sättigungsdichte  $6 \times 10^6$  Zellen pro  $25 \text{ cm}^2$  (Rutka et al., 1987).

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgt in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchte.

#### **4.1.1.3 Die Glioblastomzelllinie SF539**

Die Zelllinie SF539 wurde aus einem erneut aufgetretenen, rechtsseitigen multiformen Glioblastom der parietalen Schläfenregion einer 34-jährigen Patientin etabliert. Nach Tumordiagnose wurden zwei Teilresektionen, Strahlentherapie (Dosis: 6000 rad) und diverse Chemotherapien (BCNU, 5-FU, HU, 6-MP) durchgeführt. Die Etablierung der Zelllinie erfolgte aus einer Biopsieprobe, welche in einer dritten Operation von einem separaten, peripheren Teil des Tumors entnommen wurde. Der pathologische Befund war ein multiformes Glioblastom mit Spindelzellsarkom (Gliosarkom; Rutka et al., 1986).

Weiterhin zeigt SF539 in der G-Banden-Färbung einen abnormalen Karyotyp mit einer Vielzahl klonaler struktureller und numerischer Aberrationen, darunter del (2)(q12), der (3)(p12), t (2;4)-(q12;p16), t (6;?)(q27;?), del (12)(p11) (Rutka et al., 1986).

Die Verdopplungszeit der Zelllinie beträgt 32 Stunden; ihre Sättigungsdichte wird mit  $1.3 \times 10^6$  Zellen pro  $25 \text{ cm}^2$  angegeben (Rutka et al., 1986).

Die SF539-Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

#### **4.1.1.4 Die Glioblastomzelllinie SF268**

Die Zelllinie SF268 wurde aus einem hoch-anaplastischen Astrocytom einer 24-jährigen Patientin etabliert. Der Originaltumor lag rechts parietal und wurde mittels Strahlentherapie behandelt. (Stinson et al., 1992, Rutka et al., 1987) Der Chromosomensatz weist eine hyperdiploide Chromosomenanzahl auf (Rutka et al., 1987).

Die Verdopplungszeit von SF268 wird mit 32 Stunden angegeben; die Sättigungsdichte mit  $5 \times 10^6$  Zellen pro  $25 \text{ cm}^2$  (Rutka et al., 1987).

Die Zelllinie wird in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

### **4.1.2 Zellen/Zelllinien tierischen Ursprungs**

#### **4.1.2.1 Primäre Ratten-Astrocyten (Subkultur)**

Die in dieser Arbeit verwendeten subkultivierten Ratten-Astrocyten (Abb. 27A) wurden mir freundlicherweise von der Abteilung für allgemeine Zoologie (AG Deitmer) zur Verfügung gestellt. Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um Wistar Han „outbred“ Ratten (genaue Bezeichnung: Crl: Wist Han (Glx: BRL) BR) im Alter von p0 bis p3. Die Ratten werden von der Firma „Charles River“ bezogen und im Tierhaus der Universität Kaiserslautern weitergezüchtet.

Im folgenden soll kurz auf die „Herstellung“ der Zellkulturen eingegangen werden (alle Angaben von S. Bergstein, AG Deitmer). Die Kultivierung der Zellen beruht auf der Methode von Fischer (1984), welche etwas modifiziert wird. Alle Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

##### Herstellen der Primärkultur

Fünf Ratten im Alter von 0 bis 3 Tagen werden mit einer Schere dekapitiert. Der Schädel wird nun weiter aufpräpariert, indem man in Augenhöhe des Tieres durch das Hinterhauptloch rechts und links bis zu den Ohren schneidet. Danach wird die Schädeldecke abgehoben, nach vorne geklappt und das Kleinhirn entnommen. Das Kleinhirn wird in eine mit  $\text{CSS}^+$  (Tab. 9) gefüllte Petrischale überführt. Nach Präparation aller fünf Gehirne werden die Hirnhäute unter dem Mikroskop abpräpariert. Danach werden die Kleinhirne gemeinsam in ein 15 ml Falcon-Tube überführt und die  $\text{CSS}^+$ -Lösung abgesaugt. Es erfolgt eine 2-5 -minütige Behandlung mit Trypsin (1 %). Nach Absaugen des Trypsins wird die Behandlung durch Zugabe von BME + FKS (Tab. 10) gestoppt. Als nächstes erfolgt die Vereinzelnung der Zellen mit



Hilfe einer gestopften Pipette. Nach Abzentrifugieren der Zellen (800 rpm, 7 min Raumtemperatur, Heraeus Minifuge RF) wird der Überstand entfernt.

Es folgt eine Zugabe von DNaseI, um bereits geschädigte Zellen vollends zu zerstören. Die Kultur wird dabei kurz geschüttelt, erneut abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird in 2 ml Medium A (Tab. 11) resuspendiert und dann in eine mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtete Zellkulturflasche (siehe 4.2.7) mit 15 ml Medium A überführt. Die Ratten-Astrocyten werden bei 37°C, 10 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgt am nächsten Tag.

#### Subkultivierung der Primärkultur

Die Subkultivierung der Primärkultur erfolgt nach ca. 10 Tagen. Durch kurzes Klopfen gegen die Zellkulturflasche lösen sich tote Zellen vom Boden des Gefäßes ab und können nun zusammen mit dem Medium abgesaugt werden. Anschließend werden 10 ml Trypsin (0.1 %) für 30 s auf den Zellrasen gegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml BME + FKS gestoppt, welches sofort wieder entfernt werden muß. Nach erneuter Zugabe von 10 ml BME + FKS wird der Zellrasen vorsichtig abgespült, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 7 min bei 800 rpm und Raumtemperatur (Heraeus Minifuge RF) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet kurz aufgeklopft und mit 5 ml DNaseI-Lösung behandelt. Nach einmaligem, kräftigem Schütteln wird wiederum unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 4 ml Medium A aufgenommen. Von diesen 4 ml werden nach gründlichem Mischen 2 ml verworfen und der verbliebene Rest auf 12 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellsuspension wird nun für die verschiedenen Versuche ausgesät. Je nach Versuchsplanung kann die Subkultur weiter verdünnt werden.

**Tab. 9:** Zusammensetzung CSS<sup>+</sup>

Reagenz	Endkonzentration [mM]
NaCl	120.0
KCl	5.4
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0.8
Tris-HCl	25.0
D-Glucose	15.0

pH 7.2, steril filtrieren (0.22 µm)

**Tab. 10:** Zusammensetzung BME + FKS

Reagenz	Eingesetzte Menge
BME	9.24 g in 900 ml Aqua bidest.
NaHCO <sub>3</sub>	2.2 g
FKS	100 ml

steril filtrieren, aliquotieren à 10 ml, lagern bei -20°C

**Tab. 11:** Zusammensetzung Medium A

Reagenz	Eingesetzte Menge
DMEM	13.4 g
NaHCO <sub>3</sub>	3.7 g
BSA	1.0 g
EGF-Stammlösung	10 ml
Insulin-Stammlösung	10 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Transferrin	3.3 ml

pH 7.2, ad 1000 ml mit Aqua bidest. steril filtrieren (0.22 µm)

Zur Herstellung von Medium A benötigte Lösungen:

*Insulin-Stammlösung:*

- 100 mg Insulin in 100 ml Aqua bidest. lösen (nach Zugabe von 200 µl 1N HCl wird die Lösung klar)
- steril filtrieren, aliquotieren à 10 ml, lagern bei -20°C

*EGF-Stammlösung:*

- 1.34 g DMEM und 370 mg NaHCO<sub>3</sub> ad 100 ml mit Aqua bidest.
- 100 µg EGF und 9.9 mg BSA in 99 ml der DMEM-Lösung geben
- steril filtrieren, aliquotieren à 10 ml, lagern bei -20°C

Weitere Lösungen für die Astrocytenkultur:

*Poly-D-Lysin-Lösung:*

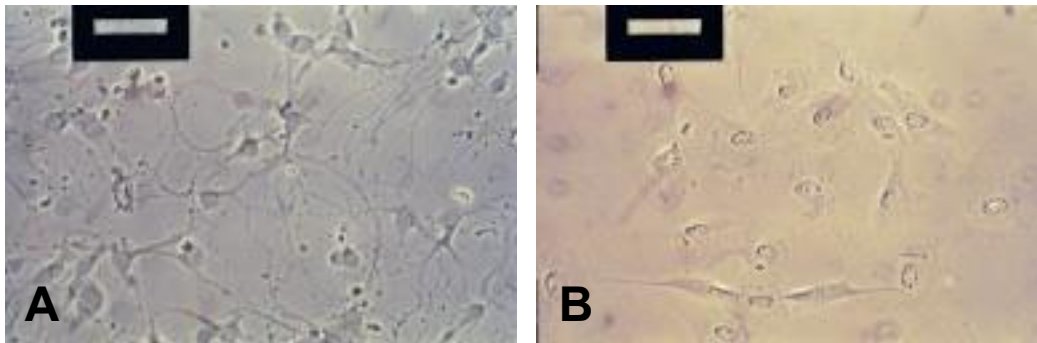
- 10 mg Poly-D-Lysin werden in 1000 ml Boratpuffer (0.1 M) gelöst
- Boratpuffer: 6.18 g Borsäure in Aqua bidest lösen, pH 8.4, ad 1000 ml mit Aqua bidest, steril filtrieren

*DNase-Lösung:*

- 100 mg DNaseI werden in 200 ml CSS<sup>+</sup> gelöst (Lösung = 0.005 %)
- steril filtrieren, aliquotieren à 10 ml, lagern bei -20°C

*Trypsin:*

- 0.1 % bzw. 1 % Trypsin in CSS<sup>+</sup>
- steril filtrieren, aliquotieren à 10 ml, lagern bei -20°C



**Abb. 27:** A: Ratten-Astrocyten (Subkultur), B: C6 (Passage x + 73)

Um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden diese mit einem Gemisch aus 5 % Propylgalat, 5 % Aqua bidest. und 90 % Glycerol überschichtet. Der Maßstab entspricht 5 mm auf dem Film (Vergrößerung 160×).

#### 4.1.2.2 Die Rattenglioblastomzelllinie C6

Die Rattenglioblastomzelllinie C6 (Abb. 27B) war eine freundliche Gabe der Firma Merck AG. Benda et al. etablierten 1968 die Original-Zelllinie aus Hirntumoren, welche durch intravenöse Applikation von N-Nitrosomethylharnstoff in Wistar Furth Ratten (DSMZ, Beschreibung ACC108) künstlich erzeugt wurden (Benda et al., 1968; Lee und Hait, 1985). Durch abwechselnde Passage in Zellkultur und im Tier wurden fünf morphologisch unterschiedliche Zellklone erhalten, von welchen nur der Klon „C6“ das sogenannte S-100-Protein in größeren Mengen produzierte (Benda et al., 1968).

Der Ursprungstumor wird als Gliosarkom beschrieben, wobei die Zellen einen fibroblastenähnlichen Zelltyp aufweisen. Der Chromosomensatz der Zelllinie beträgt  $2n = 42$  Chromosomen. (Hornhardt und Wiebel, 1996)

Die Verdopplungszeit von 16.5 Stunden wurde im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt (siehe 5.3).

Die Kultivierung der Zelllinie C6 erfolgt in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte.

#### **4.1.2.3 Die Affennierenzelllinie COS-7**

Die Zelllinie COS-7 (freundliche Gabe der Firma Merck AG) wurde aus Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) etabliert (DSMZ, Beschreibung ACC60). Dazu wurde die Ausgangszelllinie CV-1, welche permissiv für das lytische Wachstum von SV40 ist, mit einer „origin“-defekten Mutante des Affenvirus SV40 transformiert. Die danach etablierte Zelllinie COS-7 produziert T-Antigen, erlaubt die Replikation von SV40 tsA-Mutanten bei nichtpermissiven Temperaturen und ermöglicht das Wachstum von SV40-Mutanten mit Deletionen in der „early region“. Die Fähigkeit der Parentalzelllinie CV-1, das Wachstum von nicht-mutiertem SV40 zu unterstützen, bleibt erhalten. (Gluzman, 1981)

Die Zelllinie zeigt einen hypodiploiden Karyotyp mit 25 % Polyploidie; ihre Verdopplungszeit beträgt 35-48 Stunden (DSMZ, Beschreibung ACC60)

Die Kultivierung der COS-7-Zellen erfolgt in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte.

## **4.2 Zellkultur**

### **4.2.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen**

Bei schnell wachsenden Kulturen wie den hier verwendeten Zelllinien sollte das Medium zweimal pro Woche ausgetauscht werden. Dies ist nötig, da die Mediumbestandteile von den Zellen verbraucht werden und sich Stoffwechselprodukte im Medium anreichern. Um die Zellen nicht unnötig zu belasten, wird das Medium vor dem Wechsel auf 37°C angewärmt. Dann wird das verbrauchte Medium durch Absaugen aus der Kulturflasche entfernt und durch eine entsprechende Menge an frischem Medium ersetzt. (Lindl und Bauer, 1987)

### **4.2.2 Passagieren von Monolayerkulturen**

Haben die Zellen konfluentes Wachstum erreicht, ist es nötig, sie auszudünnen (passagieren), da es sonst zur Ausbildung von Mehrfachlayern kommen kann. Im Extremfall kann sich der gesamte Zellrasen abheben oder die Zellen sterben durch die überhöhte Dichte ab. (Lindl und Bauer, 1987)

Alle verwendeten Lösungen werden vor dem Benutzen auf 37°C temperiert.

Zum Passagieren wird das Medium vorsichtig abgesaugt und der Monolayer mit 5 ml PBS (Tab 12) gespült. Die Spüllösung wird wiederum durch Absaugen entfernt. Nun werden 2.5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Tab 13) auf den Zellrasen pipettiert und kurz bei 37°C inkubiert, bis sich alle Zellen abgerundet haben. Sie werden dann durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche vom Untergrund gelöst. Die abgelösten Zellen werden nun in 10 ml serumhaltigem Medium aufgenommen und durch Resuspendieren vereinzelt. Von der Zellsuspension werden einige Tropfen zurück in die Kulturflasche gegeben und eine angemessene Menge an frischem Medium zugegeben, welche sich nach der Größe des verwendeten Kulturgefäßes richtet. Nach zwei Passagen sollte die Kultur in eine neue Gewebekulturflasche überführt werden. (Lindl und Bauer, 1987)

**Tab. 12:** Zusammensetzung von PBS (1×)

Reagenz	Endkonzentration [mM]
NaCl	171.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
KCl	3.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8

pH 7.4, autoklavieren

**Tab. 13:** Zusammensetzung der Trypsin-EDTA-Lösung

Reagenz	Eingesetzte Menge
Trypsin	500 mg
EDTA	250 mg
PBS (10×)	100 ml

über Nacht auf Eis rühren, pH 7-7.4, ad 1000 ml mit Aqua bidest, steril filtrieren (0.2 µm) und aliquotieren à 5 ml, lagern bei -20°C

### 4.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (Hämocytometer). Die Zählkammer besteht aus neun Quadraten, wobei jedes dieser Quadrate eine definierte Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0.1 mm hat. Somit entsteht ein Volumen von 0.1 µl pro Quadrat. Zur Zellzahlbestimmung wird ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit

Trypan-Blau-Lösung versetzt. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen aufgrund deren Membrandurchlässigkeit blau an. Diese blaugefärbten Zellen werden beim späteren Auszählen nicht mitberücksichtigt. Ein definierter Teil der angefärbten Zellsuspension wird nun mittels Kapillarkräften unter das Deckglas des Hämocytometers pipettiert. Es werden die lebenden Zellen in den vier Eckquadraten der Kammer ausgezählt. Der Mittelwert der Zellzahl wird mit dem Verdünnungsfaktor 2 und  $10^4$  multipliziert; man erhält so die Zellzahl pro Milliliter. (Lindl und Bauer, 1987)

#### **4.2.4 Mycoplasmentest**

Mycoplasmen sind die kleinsten, sich selbständig vermehrenden Prokaryonten. Sie sind aufgrund ihrer geringen Größe und des Fehlens einer Zellwand pleiomorph, d.h. sie variieren in ihrer Gestalt. So können sie u.a. in runden oder filamentösen Formen vorkommen. Mycoplasmen können durch die in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika nicht in ihrem Wachstum unterdrückt werden und sind in der Lage, Sterilfilter bis 450 nm ungehindert zu passieren (Rottem und Barile, 1993).

Zellkulturen können auf vielfältige Weise durch Mycoplasmen beeinflusst werden. So können diese z.B. mit den Zellen um essentielle Nährstoffe im Kulturmedium konkurrieren und diese den Zellen entziehen, was tiefgreifende Effekte auf den Zellmetabolismus und die Zellfunktion hat. Weiterhin können Mycoplasmen den sogenannten cytopathischen Effekt (CPE) in unterschiedlichem Schweregrad auslösen. (Rottem und Barile, 1993) Liegt eine Mycoplasmenkontamination in den Zellkulturen vor, können Versuchsergebnisse aus oben genannten Gründen ihre Aussagekraft verlieren. Eine regelmäßige Kontrolle der Zellkulturen ist daher unumgänglich. (Lindl und Bauer, 1987)

Zur Kontaminationsüberprüfung werden einige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension auf einen „Super-Frost“-Objektträger, welcher sich in einer Gewebekulturschale ( $\varnothing$  92 mm) mit 10 ml Medium befindet, ausgesät und über Nacht im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert. Nach Abspülen der Mediumreste mit eiskaltem Methanol erfolgt eine mindestens 15-minütige Fixierung des Objektträgers in Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$ . Nach Lufttrocknung werden die Zellen mit DAPI/SR101-Lösung angefärbt und eingedeckelt. Mit Hilfe eines Trockenblocks wird die überschüssige Färbelösung entfernt. Die Detektion findet unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450 - 490 nm statt. Zellkerne und DNA erscheinen blau, das Cytoplasma ist rot gefärbt. Mycoplasmen sind als kleine, blaue Foci im Cytosol zu erkennen (Lindl und Bauer, 1987).

Bei einer Mycoplasmenkontamination wird die Zelllinie aus der Kultur entfernt. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden nur mit mycoplasmenfreien Zellen/Zelllinien durchgeführt.

#### **4.2.5 Einfrieren von Zellen**

Nach Abtrypsinieren der konfluenten Zellen (siehe 4.2.2) werden diese in 8 ml serumhaltigem Kulturmedium resuspendiert (Angabe gilt für 175 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche). In Cryoröhrchen werden wahlweise 100 µl DMSO oder 500 µl eines FKS/DMSO-Gemisches (7:3) vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension dazugegeben. Die Röhrchen werden mehrmals invertiert und dann mit einer Isolierung aus Styroporbox und Isolationsfolie langsam bei -80°C eingefroren. Später werden die Zellstocks in ihre Lagerungsbox überführt.

#### **4.2.6 Auftauen von Zellen**

Die bei -80°C gelagerten Zellstocks werden im Wasserbad bei 37°C unter leicht rotierenden Bewegungen aufgetaut. Das zum Einfrieren eingesetzte „Frostschutzmittel“ DMSO wird entfernt, indem der Inhalt des Cryoröhrchens in ein 15 ml Falcon-Tube überführt wird, welches 10 ml des entsprechenden Kulturmediums mit 20 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthält. Dann wird 5 min mit 800 rpm (Heraeus Minifuge T) bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wird in 6 ml des oben beschriebenen Mediums aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche (A = 25 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Im folgenden werden die aufgetauten Zellen beim Passagieren sukzessive in Flaschen mit größerer Kulturoberfläche überführt und der FKS-Gehalt im Medium von 20 % über 15 % auf 10 % „Normalgehalt“ gesenkt.

#### **4.2.7 Beschichten von Kulturoberflächen mit Poly-D-Lysin**

Zur Kultivierung der subkultivierten Ratten-Astrocyten werden alle Kulturoberflächen mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet, da sich die Astrocyten sonst nicht absetzen. Weiterhin ist es nötig, die runden Deckgläschen (Coverslips) für die Ca<sup>2+</sup>-Messung (siehe 4.7.1) für alle verwendeten Zellen/Zelllinien zu beschichten, damit sich die Zellen beim Superfundieren in der Meßapparatur nicht ablösen. Die Zusammensetzung der PDL-Lösung ist in unter 4.1.2.1 aufgeführt. Die beschichteten Flaschen und Schalen werden innerhalb einer Woche verbraucht.

#### Beschichten von Gewebekulturflaschen und -schalen

Die sterilen Kulturflaschen und -platten werden mit soviel PDL-Lösung befüllt, daß ihr Boden bedeckt ist. Das PDL verbleibt bei Raumtemperatur ca. 7 Stunden oder über Nacht auf der zu beschichtenden Oberfläche, dann wird es abgesaugt und der Boden zweimal mit sterilem Aqua bidest. gewaschen. Die Gewebekulturflaschen und -schalen verbleiben geöffnet unter der Sterilbank, bis der Innenraum vollständig getrocknet ist. Dann werden sie verpackt (Schalen vorher mit Parafilm abdichten) und bei 4°C gelagert.

#### Beschichten von Coverslips für die Ca<sup>2+</sup>-Messung

Die Coverslips (Ø 15 mm) werden mit Aqua bidest. gespült. Nach dem Lufttrocknen werden die Deckgläschen in Petrischalen aus Glas überführt und drei Stunden bei 180°C sterilisiert. Sollen Zellen auf Coverslips ausgesät werden, so werden jeweils zwei dieser Deckgläschen in eine Gewebekulturschale (Ø 35 mm) überführt. Die weiteren Arbeitsschritte zum Beschichten der Oberfläche entsprechen den oben beschriebenen für Gewebekulturflaschen und -schalen.

### **4.2.8 Bestimmung der Verdopplungszeit von Zelllinien**

Die Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsiniert, mit Trypan-Blau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dann werden 340000 Zellen in eine kleine Gewebekulturflasche ( $A = 25 \text{ cm}^2$ ) mit 6 ml Medium ausgesät. Die Zellen werden für zwei Tage inkubiert, dann werden sie wieder abtrypsiniert, gefärbt und ausgezählt.

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit müssen sowohl die „Startzeit“ (→ Aussaat) als auch die „Stopzeit“ (→ Abtrypsinieren) notiert werden. Weiterhin wird das Gesamtkulturvolumen nach dem zweiten Abtrypsinieren anhand eines 15 ml Falcon-Röhrchens bestimmt. Man ermittelt zunächst die Gesamtzellzahl nach zwei Tagen Inkubation und berechnet dann unter Berücksichtigung von „Start“- und „Stopzeit“ die Verdopplungszeit der Zellen.

Eine Fehlerquelle dieser Methode ist, daß nicht alle Zellen restlos abgezogen werden können und die Gesamtvolumenbestimmung über die Skalierung des Probenröhrchens nicht ganz exakt ist.



### **4.3 Bestimmung des Karyotyps der Zelllinie SNB75**

Da keine Angaben zum Karyotyp der humanen Glioblastomzelllinie SNB75 zur Verfügung standen, wird eine Karyotypisierung in der Abteilung für Humanbiologie (AG Zankl) durchgeführt. Alle Angaben sind dem Praktikumsscript zum Fortgeschrittenenpraktikum Humangenetik entnommen oder sind Erfahrungswerte von V. Fritzing (AG Zankl), unter deren Anleitung der Versuch durchgeführt und ausgewertet wurde.

#### **4.3.1 Chromosomen-Präparation aus Monolayerkulturen**

Die fast konfluenten Zellen werden 24 Stunden vor dem Abbernten einem Mediumwechsel unterzogen. Vier Stunden vor dem Abbernten werden zu den 20 ml Medium in der Kulturflasche 0.4 ml Colcemid-Lösung (10 µg/ml) zugegeben. Nach dieser Inkubationszeit wird das Kulturmedium mittels einer silikonisierten Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der Zellrasen wird dann mit 8 ml PBS gespült; diese Lösung wird ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nun werden 10 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (1 Teil 2.5 % Trypsin + 4 Teile 0.02 % EDTA, 37°C) für 60 s auf den Zellen belassen. Danach wird das Trypsin-EDTA-Gemisch zu den bereits gewonnenen Fraktionen pipettiert, ebenso wird mit den 6 ml Medium verfahren, mit welchem der Zellrasen nochmals gespült wird. Die in der Kulturflasche verbliebenen Zellen können weiter kultiviert werden; die im Zentrifugenröhrchen gesammelten Zellen werden nun unsteril weiterverarbeitet. Dazu wird die Zellsuspension 10 min mit 1000 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400R). Der Überstand wird bis auf 5-7 mm über dem Pellet abpipettiert und verworfen. Nun werden 6 ml 0.0375 M KCl (37°C) zugegeben und das Pellet resuspendiert. Nach einer 6-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird wiederum 10 min mit 1000 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 1-2 Tropfen abpipettiert und verworfen. Unter Schräghalten des Zentrifugenröhrchens wird tropfenweise kalte, frisch hergestellte Fixierlösung (Methanol/Eisessig 3:1) zugegeben (ad 5 ml). Nach kurzem Mischen erfolgt die Fixierung für 30 min bei 4°C. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 1000 rpm, Raumtemperatur) wird der Überstand wieder bis auf 1-2 Tropfen verworfen und Fixierlösung ad 5 ml zugetropft. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wird der Überstand wiederum entfernt und das Pellet in wenigen Tropfen frischer Fixierlösung resuspendiert.

Nun wird die Zellsuspension auf die Objektträger getropft. Dazu werden die Objektträger in Aqua bidest. geschwenkt und kurz abtropfen gelassen. Die Zellsuspension wird aus 10-15 cm Abstand aufgetropft (4-5 Tropfen pro Objektträger). Die Objektträger werden nun in Schräglage kurz angetrocknet und danach auf der Heizplatte bei 60°C getrocknet. Durch mikroskopische Kontrolle im Phasenkontrast wird überprüft, ob es nötig ist, die Zellsuspension weiter zu verdünnen.

### 4.3.2 G-Banden

Bevor die G-Banden-Färbung durchgeführt werden kann, müssen die Objektträger über Nacht auf der Heizplatte bei 60°C altern.

Für die G-Banden-Färbung werden die Objektträger zuerst 40 s in Bactotrypsin-Lösung (0.6 ml Bactotrypsin in 70 ml 0.9 % NaCl, 37°C) geschwenkt. Danach werden sie zweimal hintereinander in Färbekammern mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und 8 min in Giemsa-Lösung gefärbt.

Die Auswertung erfolgt unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Icaros3, V4.39 von MetaSystems, wobei nachträgliche Korrekturen (Umsortieren einzelner Chromosomen) nötig waren.

*Herstellung von Giemsa-Lösung:*

- 70 ml Sörensen-Puffer
- 7 ml Giemsa-Lösung
- mit Aqua bidest. ad 100 ml
- filtrieren

*Zusammensetzung von Sörensen-Puffer (pH 6.8):*

- Lösung A: 140 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Lösung B: 83.66 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 50 ml Lösung A und 49.2 ml Lösung B mischen

#### 4.4 Sulforhodamin B Assay (SRB-Test)

Der Sulforhodamin B Assay ermöglicht eine Aussage über das cytotoxische Potential einer Testsubstanz. Nach der Inkubationsdauer von drei Tagen werden die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Zellen auf der Zellkulturplatte fixiert, während die durch die Testsubstanz geschädigten Zellen ausgespült werden. Der Assay beruht auf der Färbung und Quantifizierung von zellulären Proteinen (Lebendprotein) der fixierten Zellen durch den Farbstoff Sulforhodamin B (SRB). Die Bestimmung der cytotoxischen Wirkung einer Substanz erfolgt photometrischen bei  $\lambda = 570$  nm durch Vergleich des angefärbten Lebendproteingehalts der substanzbehandelten Zellen mit einer Lösungsmittelkontrolle. (Skehan et al., 1990)

##### Durchführung:

Die Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsinisiert und ausgezählt.

Die Zellen werden dann in 24-well Platten (Doppelansätze) ausgesät (Tab. 14) und 24 Stunden inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und durch frisches Medium mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen ersetzt. Zur Testung werden pro Verbindung (gelöst in DMSO) fünf Konzentrationen angesetzt. Diese werden so eingestellt, dass die Lösungsmittelkonzentration im Assay 0.5 % DMSO beträgt. Eine Kontrolle mit der entsprechenden DMSO-Konzentration wird mitgeführt (Abb. 28).

K	C1	C2	C3	C4	C5
K	C1	C2	C3	C4	C5
K	C1	C2	C3	C4	C5
K	C1	C2	C3	C4	C5

**Abb. 28:** Belegungsschema einer 24-well Platte zur Substanzinkubation

K: Kontrolle (0.5 % DMSO)

C1-C5: verschiedene Substanzkonzentrationen (1–5)

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wird der Versuch durch Zugabe von 100  $\mu$ l TCA (siehe unten) pro well abgestoppt und die Zellen für eine Stunde bei 4°C fixiert. Dann wird das TCA-haltige Medium verworfen und die Platte viermal mit kaltem Leitungswasser ausgespült. Die Mikrotiterplatte wird für ca. eine Stunde im Trockenschrank bei 50°C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Anfärbung der fixierten Zellen erfolgt nach Zugabe von 250  $\mu$ l Sulforhodamin B Lösung (siehe unten) pro well im Dunkeln für 30 min. Danach wird die Färbelösung entfernt und die Platte zweimal mit kaltem Leitungswasser und

zweimal mit 1 %iger Essigsäure ausgespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Platte wird erneut unter oben beschriebenen Bedingungen getrocknet. Dann kann der an zelluläre Proteine gebundene Farbstoff durch Zugabe einer angemessenen Menge (0.5-1.5 ml pro well) Tris-Base (siehe unten) solubilisiert werden. Die Farbstofflösung wird anschließend in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert (200 µl pro well) und die Extinktion im Photometer bei  $\lambda = 570$  nm gegen einen Leerwert (Tris-Base) bestimmt. Die jeweilige Färbintensität ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen nach Ende der 72-stündigen Substanzinkubation.

Durch einen Vortest wurde überprüft, ob das Beschichten der Platten mit PDL (→ Ratten-Astrocyten) einen Einfluß auf die Durchführung/Auswertung des SRB-Assays hat bzw. ob die PDL-Beschichtung mit den anhaftenden Zellen durch die verschiedenen Assay-Reagenzien abgelöst wird. Dazu wurde eine 24-well Platte zur Hälfte mit PDL beschichtet. Danach wurden 32000 C6-Zellen/well ausgesät und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, angefärbt und vermessen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen beschichteten und nicht-beschichteten „wells“; der Assay ist also auch mit PDL-beschichteten Platten unter den beschriebenen Bedingungen durchführbar.

**Tab. 14:** Aussaatdichte der verschiedenen Zellen im SRB-Assay

Zellsystem	Zellzahl pro well
SNB75	6000
SF295	4200
Ratten-Astrocyten	27000
C6	2000
C6 (0.5 % FKS in DMEM+ )	10000

Benötigte Lösungen:

*Trichloressigsäure-Lösung (TCA):*

- 50 % TCA in Aqua bidest (m/v)
- Kühlen bei 4°C

*Sulforhodamin B Lösung:*

- 0.4 % Sulforhodamin B in 1 %iger Essigsäure (m/v)

*Tris-Base:*

- 10 mM Tris-Base, pH 10.0

Auswertung:

Die Auswertung des SRB-Assays erfolgt durch Bildung der Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Kontrollwerte und den Werten für die Substanzinkubation. Die Mittelwerte der Testwerte werden auf den Mittelwert der Kontrolle bezogen, welche gleich 100 % gesetzt wird (T/C).

Der IC<sub>50</sub>-Wert bezeichnet die Substanzkonzentration, bei welcher das Wachstum der Zellen gegenüber der Kontrolle auf 50 % reduziert ist.

*Formeln zur Bestimmung des IC<sub>50</sub> und dessen Fehler:*

Geradengleichung (Microcal™ Origin®):  $y = A + Bx$

$$IC_{50} = \frac{50 - A}{B} \quad m_{IC_{50}} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B}\right)^2 \cdot (m_A)^2 + \left(\frac{A - 50}{B^2}\right)^2 \cdot (m_B)^2}$$

mit: A = y-Achsenabschnitt

B = Steigung

m<sub>A</sub> = Fehler des y-Achsenabschnitts

m<sub>B</sub> = Fehler der Steigung

## 4.5 PDE-Assay

Mit Hilfe des PDE-Assays kann die PDE-abhängige Hydrolyse von cyclischen Nucleotiden im Zellysat untersucht werden. Das Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von PDE-Isoenzymen beruht auf der Methode von Pösch (1971). Es dient der Erfassung des Umsatzes von cAMP (cGMP) durch Phosphodiesterasen zu 5'AMP (5'GMP). Dabei wird dem Zellysat eine definierte Menge an tritiummarkiertem cyclischen Nucleotid zugesetzt. Je nach PDE-Aktivität wird cAMP (cGMP) unterschiedlich schnell zum entsprechenden 5' Nucleotid umgesetzt. Dieses wird nach einer definierten Inkubationszeit (≈ 20 % Umsatz) gefällt. Mit Hilfe eines Szintillationszählers wird das im Überstand verbliebene radioaktive cAMP (cGMP) vermessen; dessen Wert ist umgekehrt proportional zur cAMP (cGMP)-Konzentration in der Probe.

### 4.5.1 Herstellung des Zellysates

Die Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsinisiert und ausgezählt. Pro Zelllinie werden drei Petrischalen ( $\varnothing$  92 mm) mit der entsprechenden Zellzahl (Tab. 15) ausgesät. Bei transfizierten COS-7-Zellen (siehe 4.9.7) genügt es, zwei Platten ( $\varnothing$  92 mm) pro Konstrukt auszusäen.

**Tab. 15:** Aussaatdichte der verschiedenen Zellen für den PDE-Assay

Zellsystem	Zellzahl pro Platte	Inkubationsdauer
SNB75	$5 \times 10^5$	48 Std.
SF295	$3 \times 10^5$	48 Std.
Ratten-Astrocyten	0.7 - 1.5 ml	24 Std. + 48 Std.
C6	$5.5 \times 10^5$	48 Std.
COS-7	$3-4 \times 10^5$	72 Std.

Nach der entsprechenden Inkubationsdauer (Tab. 15; die Zellen sollten 60-80 % konfluent sein) werden die Zellen aufgearbeitet. Dazu wird zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit 1-2 ml eiskaltem PBS (Tab. 12) gespült. Danach werden die Zellen in  $2 \times 150 \mu\text{l}$  (bei transfizierten Zellen:  $2 \times 200 \mu\text{l}$ ) RunIII-Puffer (Tab. 16) pro Petrischale abgeschabt und die Zellsuspension in einem Wheaton Glashomogenisator („tight“ Pistill, 40 Hübe) gepottert. Der Überstand eines ersten Zentrifugationsschrittes (100 000 g, 4°C, 40 min) bildet die sogenannte Cytosol-Fraktion. Das Pellet wird mit 200  $\mu\text{l}$  RunIII-Puffer gewaschen, nochmals zentrifugiert (100 000 g, 4°C, 15 min) und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Das beim zweiten Zentrifugationsschritt entstandene Pellet wird mit 800  $\mu\text{l}$  RunIII/Triton-Puffer (Tab. 16) versetzt und mit Hilfe einer 1 ml Omnifix<sup>®</sup>-F Einmalspritze und einer Kanüle mit  $d = 0.45 \text{ mm}$  resuspendiert. Diese Suspension wird bei 100 000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand dieses dritten Zentrifugationsschrittes entspricht der Membran-Fraktion (Partikular). Alle hier erwähnten Arbeitsschritte werden mit gekühlten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Der RunIII-Puffer wird kurz vor Versuchsbeginn frisch hergestellt.

**Tab. 16:** Zusammensetzung des RunIII-Puffers

Reagenz	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	10 mM
EDTA	0.1 mM
Benzamidin	5 mM
Pepstatin A	1 µM
Leupeptin	1 µM
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	0.5 µM
PMSF	0.5 mM
β-Mercaptoethanol	0.5 mM

durch Zugabe von Triton<sup>®</sup> X-100 (Endkonzentration 0.5 %, v/v) erhält man den RunIII/Triton-Puffer

#### 4.5.2 cAMP-PDE-Assay

Mit Hilfe des cAMP-PDE-Assays können alle PDE-Isoenzyme erfaßt werden, die cAMP zu 5'AMP hydrolysieren. Es werden insbesondere Enzymaktivitäten von den Isoformen bestimmt, welche bei der im Assay angebotenen Substratkonzentration von 1 µM optimal arbeiten. Weiterhin kann der Einfluß verschiedener Modulatoren auf die PDE-Aktivität getestet werden, indem man den Pufferanteil im Assay durch eine Lösung mit dem entsprechenden Modulator (Tab. 17) ersetzt. Alle Lösungen werden auf Eis gelagert; der Versuch wird im Eisbad pipettiert und abgestoppt.

##### Durchführung:

Zuerst wird der cAMP<sup>[3H]</sup>-Mix vorbereitet. Dazu werden 13 µl tritiummarkiertes cAMP (≡ 13 µCi) zu 5 ml cAMP-Mix (Tab. 18) gegeben und gründlich vermischt. Danach werden die Assay-Tubes nach folgendem Pipettierschema vorbereitet (Tab. 17). Es werden immer Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

**Tab. 17:** Pipettierschema des PDE-Assays

	<b>Cytosol-Fraktion</b>	<b>Membran-Fraktion</b>
<b>Leerwert</b>	100 µl RunIII-Puffer 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix	100 µl RunIII/Triton-Puffer 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix
<b>Grundaktivität</b>	50 µl RunIII-Puffer 50 µl Zellysat 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix	50 µl RunIII/Triton-Puffer 50 µl Zellysat 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix
<b>Modulator</b>	50 µl Modulator 50 µl Zellysat 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix	50 µl Modulator 50 µl Zellysat 50 µl cAMP <sup>[3H]</sup> -Mix

Die Reaktion wird nach Zugabe von cAMP<sup>[3H]</sup> und kurzem Vortexen durch Inkubation der Tubes in einem auf 37°C temperierten Wasserbad gestartet. Die Inkubationsdauer richtet sich nach dem Umsatz, der nicht mehr als ca. 20 % betragen sollte. Damit ist eine Enzymkinetik im „steady state“ gewährleistet. Die entsprechende Inkubationszeit wird durch einen Vortest bei verschiedenen Inkubationszeiten ermittelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 250 µl 0.266 M ZnSO<sub>4</sub> und 250 µl 0.266 M Ba(OH)<sub>2</sub> abgestoppt und das entstandene 5'AMP<sup>[3H]</sup> gefällt. Die Assay-Tubes werden kurz gevortext und 5 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C). Vom Überstand, welcher das nicht umgesetzte cAMP<sup>[3H]</sup> enthält, werden 450 µl abpipettiert und in ein Röhrchen mit 4.5 ml Szintillationscocktail überführt. Nach kräftigem Schütteln und vortexen (Röhrchen waagrecht halten) werden die Proben zum Abklingen über Nacht im Dunkeln gelagert und dann für je 2 min im Szintillationszähler vermessen.

Auswertung:

Die gemessene [<sup>3</sup>H]-Aktivität ist proportional zur verbliebenen cAMP<sup>[3H]</sup>-Konzentration, d.h. der Umsatz entspricht der Differenz zwischen ursprünglicher und verbliebener [<sup>3</sup>H]-Aktivität. Um alle Daten vergleichen zu können, wird die PDE-Aktivität auf den Proteingehalt bezogen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt nach Bradford (1976, siehe 4.5.4). Die PDE-Aktivität wird in [pmol cAMP/min × mg Protein] angegeben.



**Tab. 18:** Zusammensetzung des cAMP-Mix

Reagenz	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7.4)	30 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	9 mM
5'AMP	3 mM
cAMP	3 μM

aliquotieren à 5 ml, lagern bei -20°C

kurz vor Testbeginn: Zugabe von 13 μl cAMP[<sup>3</sup>H] (≡ 13 μCi) pro 5 ml → cAMP[<sup>3</sup>H]-Mix

#### Modulatoren:

##### *Calcium/Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM):*

- 500 μg Calmodulin-Lyophilisat in 500 μl MES-Puffer lösen
- *MES-Puffer:* 0.195 g MES  
0.015 g CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O  
0.584 g NaCl  
pH 6.5, ad 100 ml mit Aqua bidest., aliquotieren à 5 ml, lagern bei -20°C
- 10 μl Calmodulin-Lösung + 990 μl MES-Puffer → davon werden 50 μl pro Assay-Tube eingesetzt (Endkonzentration im Test ≡ 200 nM Calmodulin und 340 μM Ca<sup>2+</sup>)

##### *Rolipram:*

- 10 μM Endkonzentration im Assay
- Stammlösung in DMSO, Verdünnung in RunIII-Puffer bzw. RunIII/Triton-Puffer

##### *DC-TA-46 (E481):*

- 10 μM Endkonzentration im Assay
- Stammlösung in DMSO, Verdünnung in RunIII-Puffer bzw. RunIII/Triton-Puffer

##### *Vinpocetin:*

- 100 μM Endkonzentration im Assay
- Stammlösung in Ethanol, Verdünnung in RunIII-Puffer bzw. RunIII/Triton-Puffer

### 4.5.3 cGMP-PDE-Assay

Der cGMP-PDE-Assay dient zur Bestimmung der cGMP-spezifischen PDE-Aktivität im Zellslysat. Auch hier werden nur solche cGMP-hydrolysierenden PDE-Isoformen erfaßt, welche bei der im Assay angebotenen Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  optimal arbeiten.

#### Durchführung:

Die Durchführung erfolgt ähnlich dem cAMP-PDE-Assay (siehe 4.5.2). Es werden 13  $\mu\text{l}$  tritiummarkiertes cGMP ( $\equiv 13 \mu\text{Ci}$ ) zu 5 ml cGMP-Mix (Tab. 19) pipettiert und vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch 250  $\mu\text{l}$  0.266 M  $\text{ZnSO}_4$  abgestoppt und das entstandene 5'GMP[ $^3\text{H}$ ] mit 100  $\mu\text{l}$  0.266 M  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  gefällt. Nach dem Pelletieren werden vom Überstand 400  $\mu\text{l}$  abpipettiert und in ein Röhrchen mit 4.5 ml Szintillationscocktail überführt. Die Proben werden zum Abklingen über Nacht im Dunkeln gelagert und anschließend im Szintillationszähler für je 10 min vermessen.

Im cGMP-PDE-Assay sollte nur die Stimulierbarkeit der PDE durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  als Modulator überprüft werden. Die Auswertung erfolgt analog zum cAMP-PDE-Assay.

**Tab. 19:** Zusammensetzung des cGMP-Mix

Reagenz	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7.4)	30 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	9 mM
5'GMP	3 mM
cGMP	3 $\mu\text{M}$

aliquotieren à 5 ml, lagern bei -20°C

kurz vor Testbeginn: Zugabe von 13  $\mu\text{l}$  cGMP[ $^3\text{H}$ ] ( $\equiv 13 \mu\text{Ci}$ ) pro 5 ml  $\rightarrow$  cGMP[ $^3\text{H}$ ]-Mix

### 4.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie<sup>®</sup>-Brilliantblau G250, welcher mit Aminosäure-Seitenketten Komplexe bilden kann. Durch diese Komplexbildung tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs auf. Je nach Proteingehalt einer Probe kann im Photometer eine unterschiedliche Extinktion detektiert werden. (Bradford, 1976)

#### Durchführung:

Aus einer Rinderserumalbuminlösung (BSA, Fraktion V, 2 mg/ml Standard) wird eine Eichreihe mit 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8 und 1 mg/ml BSA in Aqua bidest. hergestellt.

Zu jeweils 10 µl jeder Konzentration dieser Eichreihe, 10 µl der PDE-Assay-Puffer, 10 µl Zellysat, sowie 10 µl Aqua bidest (Leerwert) wird 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Die Zellysat-Proben werden dabei in Mehrfachbestimmung getestet. Nach gründlichem Mischen und 5 min Wartezeit werden je 200 µl der gefärbten Lösungen (Dreifachbestimmung) in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion photometrisch bei  $\lambda = 595$  nm bestimmt. Die Extinktion kann anhand der mitgeführten Eichgerade einer Proteinkonzentration zugeordnet werden.

*Herstellung der Bradford-Lösung:*

- 0.1 g Coomassie<sup>®</sup>-Brilliantblau G250 in 50 ml Ethanol (50 %, v/v) lösen
- 100 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %, v/v) zugeben
- ad 250 ml mit Aqua bidest.; 4 Wochen im Dunkeln lagern
- 1000 ml Aqua bidest. hinzufügen und abfiltrieren; dunkel lagern

## 4.6 Bestimmung des Gehalts an cyclischen Nucleotiden

### 4.6.1 Aufarbeitung der Zellen für die cAMP-/cGMP-Bestimmung

Die Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsiniert und ausgezählt. Es werden – parallel zum PDE-Assay – mehrere Petrischalen (Ø 92 mm) mit der entsprechenden Zellzahl (Tab. 20) ausgesät. Die gleichzeitige Aussaat und die Einhaltung der gleichen Inkubationszeit ist nötig, da aus dem Zellysat des cAMP-/cGMP-Assays keine Protein-Bestimmung möglich ist und deshalb die Proteinwerte der Cytosol-Fraktion des PDE-Assays zur Auswertung herangezogen werden müssen.

**Tab. 20:** Aussaatdichte der verschiedenen Zellen für die cAMP-/cGMP-Bestimmung

Zellsystem	Zellzahl pro Platte	Inkubationsdauer
SNB75	$5 \times 10^5$	48 Std.
SF295	$3 \times 10^5$	48 Std.
SF539	$3.2 \times 10^5$	24 Std.
SF268	$1.6 \times 10^5$	48 Std.
Ratten-Astrocyten	0.7 - 1.5 ml	24 Std + 48 Std.
C6	$5.5 \times 10^5$	48 Std.

Die Zellen werden nach der in Tab. 20 angegebenen Inkubationsdauer (die Zellen sollten 60 - 80 % konfluent sein) aufgearbeitet. Zunächst wird das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit je 1 ml PBS/EDTA-Lösung (4 mM EDTA in PBS) gewaschen. Danach werden die Zellen jeder Platte zweimal in je 1 ml Ethanol p.a. (100 %) abgeschabt. Jeder ml Zellsuspension wird in ein separates Eppendorftube pipettiert. Die Proben werden anschließend für 2 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C) und der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt. Das Pellet wird mit 250 µl Ethanol/Aqua bidest.-Gemisch (2:1) mit Hilfe von Vortex und Rührspatel resuspendiert. Danach wird erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes vereinigt; das Pellet wird verworfen. Die Proben können bei -80°C aufbewahrt werden. Alle hier erwähnten Arbeitsschritte werden mit gekühlten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Später werden die Probenlösungen lyophilisiert und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

#### **4.6.2 cAMP-Bestimmung**

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgt mit dem „cyclic AMP[<sup>3</sup>H] assay system“ (TRK 432) von Amersham. Dieser Assay basiert auf der Konkurrenz zwischen unmarkiertem cAMP und einer definierten Menge an tritiummarkiertem cAMP um die Bindung an ein Protein, welches eine hohe Spezifität und Affinität zu cAMP aufweist. Die Menge an gebildetem cAMP[<sup>3</sup>H]/Protein-Komplex ist umgekehrt proportional zum cAMP-Gehalt der eingesetzten Probe (TRK 432-Anleitung).

##### Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Die lyophilisierten Proben werden in je 60 µl Tris/EDTA-Puffer aufgenommen. Es ist darauf zu achten, daß die Proben vollständig gelöst sind. Daher ist es nötig, Vortex und Rührspatel zur Resuspendierung zu verwenden. Nach kurzem Anzentrifugieren wird der Inhalt der beiden zusammengehörigen Tubes (erstes und zweites Abschaben) vereinigt. Nach dem Herstellen der cAMP-Standards (0.125 - 8 pmol cAMP pro 50 µl) wird der Assay gemäß Anleitung pipettiert. Dabei enthalten zwei Tubes 150 µl Puffer („charcoal blank“), zwei weitere Tubes beinhalten 50 µl Puffer („zero dose“), danach werden in weitere Tubes je 50 µl cAMP-Standard bzw. Probe pipettiert (jeweils Doppelbestimmung). Zu jedem Ansatz werden nun 50 µl cAMP[<sup>3</sup>H] hinzugefügt, gefolgt von 100 µl Bindungsprotein (Ausnahme: „charcoal

blank“→ kein Bindungsprotein). Alle Tubes werden für 5 s „gevortext“ und danach für zwei Stunden im Eisbad bei 4°C inkubiert.

15 min vor Ende der Inkubationszeit wird begonnen, die Aktivkohle auf Eis zum vollständigen Resuspendieren zu rühren. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Aktivkohle je Assay-Tube abgestoppt (es werden nur so viele Tubes abgestoppt, wie gleichzeitig zentrifugiert werden können). Anschließend werden die Proben kurz „gevortext“ und dann für 4 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C). Vom Überstand werden 200 µl in 4 ml Szintillationscocktail überführt und nach Abklingen über Nacht im Szintillationszähler für je 10 min vermessen.

#### Auswertung:

Die Auswertung wird nicht genau nach den Angaben des Assay-Herstellers (TRK 432-Protokoll) durchgeführt, sondern muß variiert werden. Es werden die gemessenen „cpm“ gegen „pmol cAMP“ aufgetragen. Als Ausgleichskurve wird ein „Zerfall 1. Ordnung“ gewählt. Dies ist nötig, da diese Darstellung im relevanten Meßbereich exakter bei den ermittelten Werten liegt als die Ausgleichsgerade, wenn „pmol cAMP“ gegen den Quotienten aus „zero dose“/„gemessene counts“ aufgetragen werden. Der ermittelte cAMP-Gehalt wird nun auf die Proteinmenge umgerechnet. Dazu werden die für den PDE-Assay ermittelten Proteinwerte des Cytosols herangezogen.

### **4.6.3 cGMP-Bestimmung**

Die cGMP-Bestimmung erfolgt mit dem „cyclic GMP<sup>[3H]</sup> assay system“ (TRK 500) von Amersham. Dieser Assay basiert auf der Kompetition zwischen unmarkiertem cGMP und einer definierten Menge an tritiummarkiertem cGMP um die Bindung an ein Antiserum mit einer hohen Spezifität und Affinität zu cGMP. Die Menge an cGMP<sup>[3H]</sup>, welche an das Antiserum gebunden wird, ist umgekehrt proportional zum cGMP-Gehalt der eingesetzten Probe (TRK 500-Protokoll).

#### Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Die lyophilisierten Proben werden in je 120 µl Tris/EDTA-Puffer resuspendiert. Um eine vollständigen Resuspendierung zu gewährleisten, werden Vortex und Rührspatel verwendet. Nach kurzem Anzentrifugieren wird der Inhalt der beiden zusammengehörigen Tubes (erstes und zweites Abschaben) vereinigt. Nach dem Herstellen der cGMP-Standard-Lösungen (0.125 – 8 pmol cGMP pro 100 µl) wird der Assay gemäß Anleitung pipettiert. Dabei erhalten

zunächst alle Assay-Tubes 50 µl cGMP[<sup>3</sup>H]. In zwei Tubes werden je 100 µl Puffer zupipettiert („zero dose“), zwei weitere Tubes beinhalten je 100 µl Blank-Reagenz („blank“). Danach werden in die übrigen Tubes je 100 µl cGMP-Standard bzw. Probe pipettiert (jeweils Doppelbestimmung). In alle Assay-Tubes werden dann 50 µl Antiserum gegeben, für 5 s „gevortext“ und die Ansätze für mindestens 90 min im Eisbad bei 4°C inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wird 1 ml eiskaltes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Assay-Tube pipettiert (es werden nur so viele Tubes behandelt, wie gleichzeitig zentrifugiert werden können). Danach werden die Proben kurz „gevortext“, für 5 min im Eisbad inkubiert und dann 2 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C). Der Überstand wird verworfen, die Tubes getrocknet und vorsichtig ausgewischt/ausgeklopft, so daß keine Lösung mehr an den Innenwänden haftet. Das Pellet wird in 1.1 ml Aqua bidest. durch Vortexen gelöst. Von der Probe wird nun 1 ml in 4 ml Szintillationscocktail überführt und nach Abklingen über Nacht im Szintillationszähler für je 10 min vermessen. Die Auswertung erfolgt analog zum cAMP-Assay.

## **4.7 Calcium-Imaging**

Die Experimente zur Untersuchung der Calcium-Signale in subkultivierten Ratten-Astrocyten, C6-Rattenglioblastoma-Zellen, sowie in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 werden in der Abteilung für allgemeine Zoologie (AG Deitmer) unter der Anleitung von HP. Schneider durchgeführt.

### **4.7.1 Beladen der Zellen mit Fura-2 AM**

Die Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsiniert und ausgezählt. Es werden mehrere Gewebekulturschalen (Ø 35 mm) mit PDL-beschichteten Coverslips (siehe 4.2.7) mit der entsprechenden Zellzahl (Tab. 21) ausgesät. Die Ratten-Astrocyten werden – schon auf Coverslips ausgesät – von S. Bergstein (AG Deitmer) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen sollten zur Messung Zell-Zell-Kontakt haben, aber nicht zu dicht sein. Die Inkubationsdauer bei angegebener Aussaatdichte ist Tab. 21 zu entnehmen.

**Tab. 21:** Aussaatdichte der verschiedenen Zellen für die Ca<sup>2+</sup>-Messung

Zellsystem	Zellzahl pro Coverslip	Inkubationsdauer
Ratten-Astrocyten	n.b.	24-72 Std.
C6	8000	24 Std.
SNB75	8000	72 Std.
SF295	29000	24 Std.

n.b.: nicht bestimmt

Bevor die Zellen beladen werden können, muß die Fura-2 AM-Inkubationslösung hergestellt werden. Dazu werden in einem dunklen Gefäß 6 µl Fura-2 AM (2 mM in DMSO) in 6 ml Normalsalz-Lösung (Tab. 22) pipettiert, der Ansatz gevortext und für 8 min im Ultraschallbad inkubiert. Letzteres ist nötig, damit sich keine Fura-2 Kristalle bilden, welche später die Messung stören könnten.

Das Kulturmedium wird nun von den Zellen entfernt und der Zellrasen zweimal mit Normalsalz-Lösung gespült. Die „Spül-Lösung“ wird jeweils verworfen. Danach wird soviel der vorbereiteten Fura-2 AM-Lösung auf die Coverslips gegeben, bis diese vollständig bedeckt sind. Die Inkubation mit dem Farbstoff erfolgt im Dunkeln für 45 min. Nach dieser Zeit wird die Farbstofflösung abgesaugt (sie kann am selben Tag nochmals benutzt werden) und die Zellen zweimal mit Normalsalz-Lösung gespült, um überschüssiges Fura-2 zu entfernen. Die Zellen werden in Normalsalz-Lösung belassen und verbleiben bis zur Messung im Dunkeln.

#### 4.7.2 Benötigte Lösungen

Zum Messen der Calcium-Antworten und zum Kalibrieren des Meßsystems sind verschiedene Lösungen nötig, deren Zusammensetzung den Tab. 22 - 26 entnommen werden kann.

*Meßlösungen:***Tab. 22:** Zusammensetzung der Normalsalz-Lösung

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM

pH 7.4 mit NaOH einstellen

**Tab. 23:** Zusammensetzung der 0 Ca<sup>2+</sup>-Lösung

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
EGTA	0.5 mM

pH 7.4 mit NaOH einstellen

*Lösungen zur Kalibrierung:***Tab. 24:** Zusammensetzung der pCa<sub>∞</sub>-Lösung

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	85 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
EGTA	10 mM

pH 7.4 mit NaOH einstellen



**Tab. 25:** Zusammensetzung der pCa<sub>2</sub>-Lösung

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	130 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM

pH 7.4 mit NaOH einstellen

**Tab. 26:** Zusammensetzung der 2Mn-Lösung

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	2 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM

pH 7.4 mit NaOH einstellen

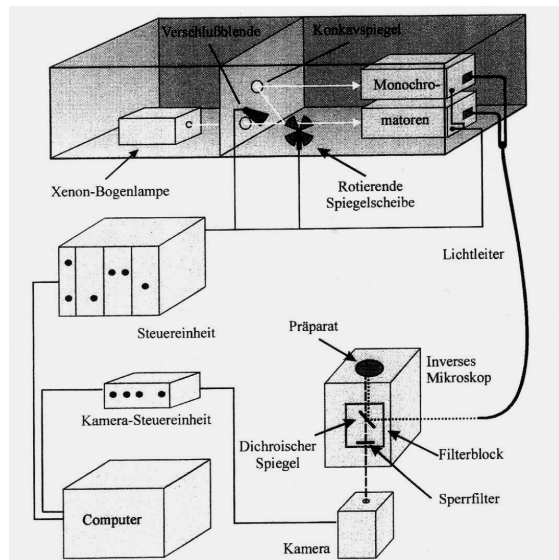
*Weitere Lösungen:*

- 4-bromo-A23187 (Stammlösung 20 mM in DMSO)
- Ionomycin (Stammlösung 5 mM in DMSO)
- Adenosintriphosphat (ATP; Stammlösung 10 mM in Aqua bidest.)
- Cyclopiazonsäure (CPA; Stammlösung 100 mM in DMSO)

## 4.7.3 Video-Imaging

### 4.7.3.1 Aufbau der Meßapparatur

Die Meßapparatur zur Aufzeichnung intrazellulärer Calciumspiegel ist in Abb. 29 dargestellt.



**Abb. 29:** Schema des Versuchsaufbaus für die fluorimetrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung am Video-Imaging System (Jung, 1998). Gepunktete Strahlen: Anregungslicht; gestrichelte Strahlen: Fluoreszenzemission

Ein rotierendes Spiegelrad bewirkt, daß das von einer Xenon-Bogenlampe abgestrahlte Licht abwechselnd auf einen von zwei Monochromatoren fällt (Frequenz: 50 Hz). Der Monochromator erzeugt aus diesem polychromatischen Licht durch Beugung an einem optischen Gitter Licht einer bestimmten, frei wählbaren Wellenlänge. Für die Calcium-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 betragen die Wellenlängen  $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ . Das monochromatische Licht gelangt über einen Lichtleiter zum Fluoreszenzeingang des Mikroskops und wird in den Strahlengang geleitet. Dort sorgt ein Filterblock für eine Trennung von Anregungs- und Emissionslicht. Dieser Filterblock enthält zum einen einen dichroischen Spiegel, der Licht mit  $\lambda < 400 \text{ nm}$  reflektiert und somit das Anregungslicht von  $\lambda = 340$  bzw.  $380 \text{ nm}$  durch das Objektiv auf das Präparat lenkt; zum anderen enthält er einen Langpaßfilter, welcher nur Licht mit  $\lambda > 480 \text{ nm}$  den Kamera-Detektor erreichen läßt. Die Kameradaten werden auf einem Monitor angezeigt und mit einem PC mit einer maximalen Aufnahme Frequenz von 0.5 Hz simultan aufgezeichnet.

#### 4.7.3.2 Durchführung der Messung

Vor Beginn der Messung wird der Zulaufschlauch zur Meßkammer einige Minuten mit Normalsalz-Lösung gespült. Währenddessen wird die Meßkammer gefettet, das Coverslip, welches die Kammerunterseite bildet, eingelegt und leicht angedrückt. Der Kammerdeckel wird nun vorsichtig festgedreht und die Kammerunterseite von eventuellen Fettresten gereinigt. Dann werden einige Tropfen Normalsalz-Lösung auf die Zellen gegeben und die Kammer in die Meßapparatur integriert.

Unter Durchlichtbedingungen wird die zu untersuchende Stelle auf dem Coverslip ausgewählt. Danach werden unter Fluoreszenzbedingungen die zur Messung nötigen Einstellungen an Steuereinheit und PC vorgenommen und die Meßregionen (ROI: „region of interest“) festgelegt. Der Zulaufhahn für die Superfusionslösung wird geöffnet und die Messung kann gestartet werden.

Alle Versuche werden in einem klimatisierten Raum bei 21°C durchgeführt; für die Messungen wird ein 40× Objektiv (Ölimmersion) verwendet. Der Wechsel der verwendeten Superfusionslösungen erfolgt durch Umhängen des Kammerzulaufs in die entsprechenden Vorratsgefäße.

#### 4.7.3.3 Kalibrierung

Nach Durchführung aller Messung ist eine Kalibrierung des Systems für jedes der verwendeten Zellsysteme nötig. Dabei werden die Zellen zunächst, wie unter 4.7.1 beschrieben, mit dem Farbstoffester Fura-2 AM beladen. Nach Einbau der Meßkammer werden die Zellen für etwa 5 min bis zum Erhalt einer Basislinie mit Normalsalz-Lösung superfundiert. Danach wird für ca. 10 min eine calciumfreie Lösung ( $pCa_{\infty}$ , Tab. 24) eingespült. Nach Abstoppen des Pufferzulaufs wird die in der Meßkammer befindliche Lösung sehr vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernt. Dann wird  $pCa_{\infty}$ -Lösung, welche ein Ionophorengemisch (20  $\mu$ M 4-bromo-A23187 und 10  $\mu$ M Ionomycin) enthält, auf die Zellen pipettiert und für etwa 30 min belassen. Nach einminütigem Spülen mit „reiner“  $pCa_{\infty}$ -Lösung wird die Badperfusion wiederum gestoppt, die Kammer-Lösung entfernt und durch ionophorenhaltige Hochcalcium-Lösung ( $pCa_2$ , Tab. 25) ersetzt. Diese Lösung verbleibt für etwa 10 min in der Meßkammer. Um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, werden die Zellen im Anschluß für ca. 20 min mit einer manganhaltigen, calciumfreien Lösung (2Mn, Tab. 26) superfundiert.

#### 4.7.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgt nach der unten angegebenen Gleichung von Grynkiewicz, welche von einer 1:1 Bindung zwischen Farbstoff und Meßion ausgeht (Grynkiewicz et al, 1985).

Der Wert für die Dissoziationskonstante  $K_d$  wird mit 225 nM aus der Literatur entnommen (Grynkiewicz et al, 1985; Molecular Probes Handbook, 2002), alle übrigen Parameter werden experimentell ermittelt (Abb. 30).

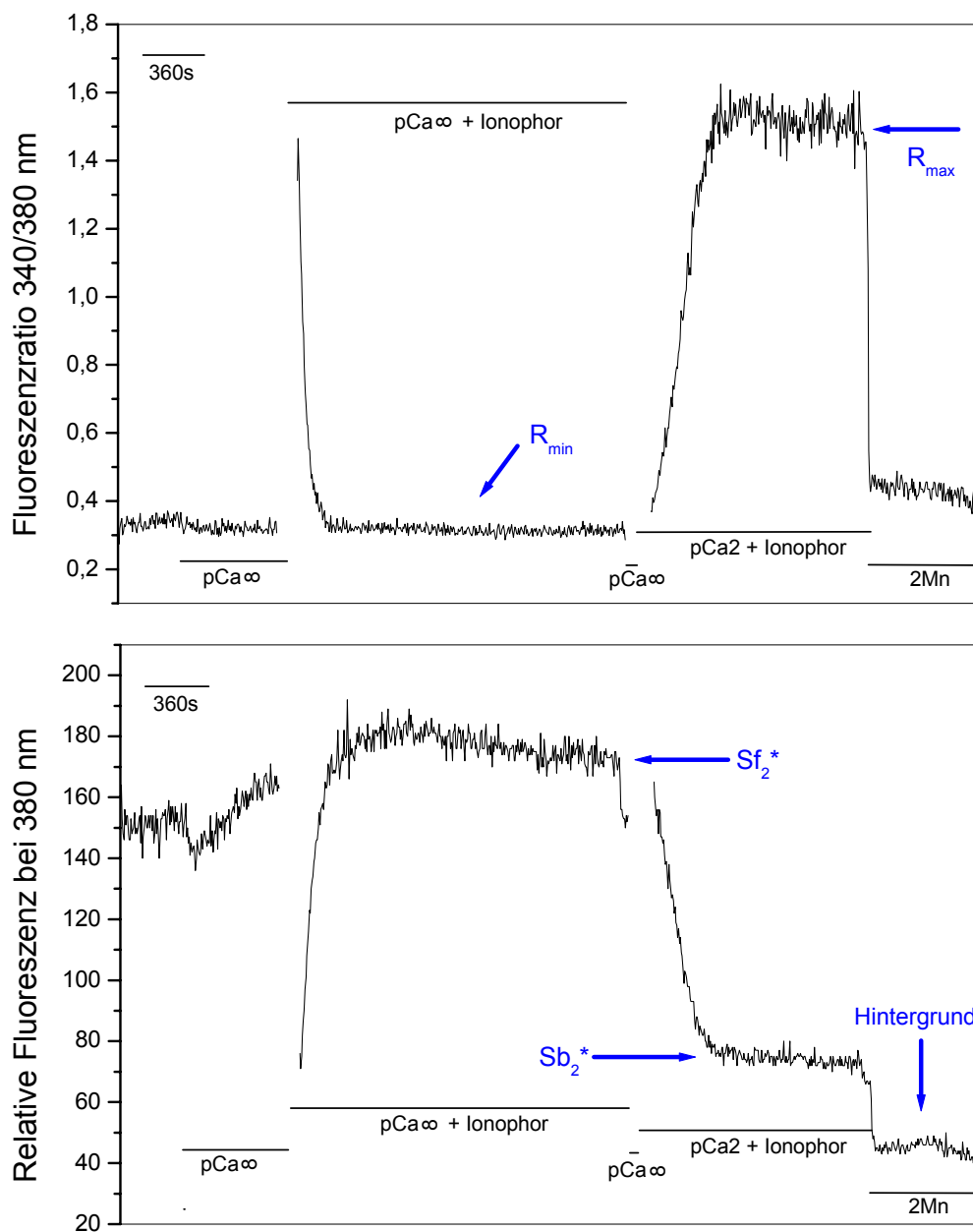


Abb. 30: Ermittlung der für die Kalibrierung der  $Ca^{2+}$ -Messung mit Fura-2 nötigen Parameter

Die Kalibrierung erfolgt für jedes Zellsystem separat, d.h. jedem Zellsystem liegen andere Gleichungsparameter zugrunde, welche Tab. 27 zu entnehmen sind.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{\text{Sf}_2}{\text{Sb}_2}$$

mit:  $K_d$ : Dissoziationskonstante des Farbstoff-Ion-Komplexes (225 nM)

R: Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda = 340$  nm und  $\lambda = 380$  nm

$R_{\min}$ : Fluoreszenzratio des freien Indikators

$R_{\max}$ : Fluoreszenzratio des vollständig gebundenen Indikators

$\text{Sf}_2$ : Fluoreszenzemission des freien Farbstoffes bei  $\lambda = 380$  nm ( $\text{Sf}_2^*$ ) abzüglich der Hintergrundfluoreszenz

$\text{Sb}_2$ : Fluoreszenzintensität des vollständig gebundenen Farbstoffes bei  $\lambda = 380$  nm ( $\text{Sb}_2^*$ ) abzüglich der Hintergrundfluoreszenz

**Tab. 27:** Ermittelte Werte zur Berechnung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Zellsystem	$R_{\min}$	$R_{\max}$	$\text{Sf}_2$	$\text{Sb}_2$
Ratten-Astrocyten	0.16	3.5	167.7	13.6
C6	0.10	21.7	122.0	2.4
SNB75	0.15	1.6	178.6	21.1
SF295	0.16	2.5	190.3	44.8

## 4.8 Bestimmung des PDE-Expressionsmusters in Rattenzellen

### 4.8.1 Präparation der mRNA

Die mRNA von subkultivierten Ratten-Astrocyten und der Rattenglioblastom-Zelllinie C6 wird mittels „QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech isoliert.

Die Zellen werden bei ca. 80 % Konfluenz für die mRNA-Präparation aufgearbeitet. Der Zellrasen wird zunächst mit kaltem PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin für 15 s inkubiert. Nach Entfernen der Trypsin-Lösung werden die an- bzw. abgelösten Zellen in 3 ml kaltem PBS aufgenommen und sofort auf Eis gestellt (Mengenangaben für 80 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche). Diese 3 ml Zellsuspension werden auf zwei Eppendorf-Tubes aufgeteilt und für 4 min

mit 14500 rpm bei 4°C zentrifugiert (Beckman Minifuge<sup>®</sup> R, Typ MFE). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 0.4 ml Extraktionspuffer durch „vortexen“ homogenisiert. Nach Verdünnung mit 0.8 ml Elutionspuffer wird die Zellsuspension noch einmal unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung der mRNA verläuft wie von der Firma Amersham beschrieben: Die im Zentrifugationsüberstand (Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415C) enthaltene mRNA wird an Oligo(dT)Cellulose gebunden und mehreren Waschschritten unterzogen. Nach Elution wird die erhaltene mRNA à 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.8.2 Design der Primer

Zum Design geeigneter Primer für PDE1A, 1B, 1C, 4A, 4B und 4D sowie β-Actin als Kontrolle werden die entsprechenden Sequenzen von *Rattus norvegicus* (Tab. 28-30) mit dem Computerprogramm DNASTAR/MegAlign miteinander verglichen (Modus: „clustal method with weighted residue weight table“).

**Tab. 28:** Dem Alignment zugrunde liegende Sequenzen für PDE1-Isoenzyme der Ratte

PDE	Medline Zugangsnummer
CaM-PDE, mRNA, complete cds	M94537
PDE1A, mRNA, complete cds	AF327838
PDE1B, mRNA	NM_022710
PDE1C2, mRNA, complete cds	L41045

cds: „coding sequence“

**Tab. 29:** Dem Alignment zugrunde liegende Sequenzen für PDE4-Isoenzyme der Ratte

PDE	Medline Zugangsnummer
PDE4, mRNA, partial cds	M25350
PDE4A10, mRNA, partial cds	AF110461
PDE4A, mRNA	NM_013101
PDE4B3, mRNA, complete cds	U95748
PDE4D4, mRNA, complete cds	AF031373

cds: „coding sequence“

**Tab. 30:** Sequenz für  $\beta$ -Actin der Ratte

Standard	Medline Zugangsnummer
$\beta$ -Actin, mRNA, partial cds	AF122902

cds: „coding sequence“

Bei der Wahl der Primersequenzen ist darauf zu achten, daß die fertigen Primer ähnliche Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) besitzen, nicht mit sich selbst bzw. untereinander hybridisieren können oder Sekundärstrukturen bilden.

Folgende Primersequenzen wurden ermittelt (Tab. 31) und die Synthese der Primer bei der Firma MWG Biotech in Auftrag gegeben. Die Primer werden in HPSF<sup>®</sup>-Qualität (High purity salt free) geliefert; das Lyophilisat wird in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen ( $c = 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ). Aus dieser Primer-Stammlösung wird ein Aliquot entnommen und eine Gebrauchslösung mit  $c = 5 \text{ }\mu\text{M}$  hergestellt.

**Tab. 31:** Primer für PDE1- und PDE4-Isoenzyme der Ratte, sowie  $\beta$ -Actin

Da einigen Primern mehrere Einzelsequenzen zu Grunde liegen, wird bei der „Lageangabe“ aller Primer die Nucleotidnumerierung der Consensus-Sequenz des jeweiligen Alignments angegeben.

#### ratPDE1Afw

PDE1A, forward primer      5' – GCC TAA TTG CCT TTG CAG AAG C – 3'  
(AF327838, n1145-n1166)       $T_m = 60.3^\circ\text{C}$

#### ratPDE1B(1)fw

PDE1B, forward primer 1      5' – GCT GAT GAC CAC GCT CTG CTG AGG -3'  
(NM\_022710, n1060-n1080)       $T_m = 63.7^\circ\text{C}$

#### ratPDE1B(2)fw

PDE1B, forward primer 2      5' – CCC ACA GTG TTT CTG ATG AG – 3'  
(NM\_022710, n1135-n1154)       $T_m = 57.3^\circ\text{C}$

#### ratPDE1Cfw

PDE1C, forward primer      5' – CTG CAC TTG TCT CAT TTG TGG – 3'  
(L41045, n1142-n1162)       $T_m = 57.9^\circ\text{C}$

**ratPDE1genrev**

PDE1, generic reverse primer 5' – CCT GTG TGC TCA TAG TCA TGG A – 3'  
(M94537, AF327838, T<sub>m</sub> = 60.3°C  
NM\_022710, L41045,  
n1343-n1322)

**ratPDE4genfw**

PDE4, generic forward primer 5' – GCT GTG TTC ACA GAC CTG G – 3'  
(M25350, AF110461, T<sub>m</sub> = 58.8°C  
NM\_013101, U95748,  
AF031373, n1775-n1793)

**ratPDE4genrev**

PDE4, generic reverse primer 5' – CAG GTC TCC CAC AAT GGA TG – 3'  
(M25350, AF110461, T<sub>m</sub> = 59.4°C  
NM\_013101, U95748,  
AF031373, n2379-n2360)

**ratPDE4Afw**

PDE4A, forward primer 5' – GTG CTG CGA CAG TCC CAG – 3'  
(M25350, AF110461, T<sub>m</sub> = 60.5°C  
NM\_013101, n1382-n1399)

**ratPDE4Arev**

PDE4A, reverse primer 5' – CCA GGT CTG TGA ACA CAG C – 3'  
(M25350, AF110461, T<sub>m</sub> = 58.8°C  
NM\_013101, n1793-n1775)

**ratPDE4Bfw**

PDE4B, forward primer 5' – GCC GCC TTC CCT GGG C -3'  
(U95748, n830-n845) T<sub>m</sub> = 62.0°C



**ratPDE4Dfw**

PDE4D, forward primer      5' – GTG CAA CCA ACC ATC CAT CAA C – 3'  
 (AF031373, n1066-n1087)       $T_m = 60.3^\circ\text{C}$

**ratPDE4BDrev**

PDE4B und D, reverse primer      5' – CAG GCT GGA GCT GTG CAT C – 3'  
 (U95748, AF031373, n1450-       $T_m = 61.0^\circ\text{C}$   
 n1432)

**ratBactinfw**

$\beta$ -Actin, forward primer      5' – CCC CAT TGA ACA CGG CAT TG – 3'  
 (AF122902, n 6-n 25)       $T_m = 59.4^\circ\text{C}$

**ratBactinrev**

$\beta$ -Actin, reverse primer      5' – GGA GTC CAT CAC AAT GCC AG – 3'  
 (AF122902, n 264-n 245)       $T_m = 59.4^\circ\text{C}$

**4.8.3 RT-PCR**

Bei der RT-PCR („reverse transcriptase polymerase chain reaction“) handelt es sich um eine PCR-Methode mit RNA als Ausgangsmaterial. In einem ersten Schritt erfolgt das Umschreiben der eingesetzten mRNA (siehe 4.8.1) in cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase. Danach erfolgt die eigentliche PCR-Reaktion, in welcher zahlreiche Kopien der durch die Primer definierten Sequenz generiert werden (Brown, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Titan One Tube RT-PCR System“ von Roche verwendet. Dabei können reverse Transkription und Amplifikation des „templates“ nacheinander ohne weitere Zugabe von Reagenzien in einem Ansatz durchgeführt werden. In dem Kit sind ein Enzym-Mix (RT aus AMV für die RT-Reaktion, Taq DNA Polymerase und Pwo DNA Polymerase für die eigentliche PCR-Reaktion), sowie RT-PCR-Reaktionspuffer (5 $\times$ ) und DTT-Lösung (100 mM) enthalten (Roche, 2000). Alle Arbeitsschritte werden unter RNase freien Bedingungen und auf Eis durchgeführt. Dabei werden zuerst die Master-Mixe 1 und 2 (Tab. 32 und 33) zusammenpipettiert, wobei der Enzym-Mix erst kurz vor Versuchsbeginn zugegeben wird. In die PCR-Reaktionstubes ( $V = 0.5 \text{ ml}$ ) werden die entsprechenden Primer

vorgelegt und dann nacheinander ein Aliquot Master-Mix 1 und 2 zugegeben (Tab. 34). Dabei wird der Ansatz vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt.

Die PCR wird mit den in Tab. 35 und Tab. 36 aufgelisteten Programmen durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen müssen dabei der Schmelztemperatur der entsprechenden Primer angepaßt werden.

**Tab. 32:** Master-Mix 1 (1×)

8 µl DEPC-H <sub>2</sub> O
2.5 µl DTT (100 mM)
1 µl dNTP (je 10 mM)
0.5 µl RNase Inhibitor
5 µl template RNA
17 µl

**Tab. 33:** Master-Mix 2 (1×)

14 µl DEPC-H <sub>2</sub> O
10 µl RT-PCR-Puffer (5×)
1 µl Enzym-Mix
25 µl

**Tab. 34:** RT-PCR-Ansatz

4 µl forward primer (5 µM)
4 µl reverse primer (5 µM)
17 µl Master-Mix 1
25 µl Master-Mix 2
50 µl

**Tab. 35:** PCR-Programm für die RT-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer
1	50°C	31 min
2	END	

**Tab 36:** PCR-Programm für die PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94°C	2 min
2	94°C	30 s
3	x°C	1 min
4	68°C	3 min
5	9 times to 2	
6	94°C	30 s
7	x°C	1 min
8	68°C	3 min
9	68°C	5 s + 5 s/cycle
10	25 times to 6	
11	68°C	7 min
12	4°C	0
13	END	

Denaturierung

Annealing

Elongation

Die verschiedenen **Annealing-Temperaturen** (x°C) betragen:

- 55°C für PDE1C, PDE4 (generic) und  $\beta$ -Actin
- 59°C für PDE1A, PDE1B und  $\beta$ -Actin
- 62°C für PDE4A, PDE4B, PDE4D und  $\beta$ -Actin

Die Analyse der Proben erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.9.6). Dazu werden 8  $\mu$ l PCR-Ansatz mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (6 $\times$ ) versetzt und die Bandengröße auf einem 1.5 %-igen Agarose-Gel mit 100 bp-Marker überprüft.

*Herstellung von DEPC-H<sub>2</sub>O:*

- 0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in Aqua bidest.
- Rühren (über Nacht)
- Autoklavieren, um das DEPC zu entfernen

## 4.9 Klonierung und Expression rekombinanter PDE1C

### 4.9.1 Der Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a

Der Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a (Abb. 31) stammt aus dem „Carboxy-terminal FLAG Mammalian Transient Expression Kit“ von Sigma. Dieser Vektor kann für die transiente intrazelluläre Expression von C-terminalen FLAG-Fusionsproteinen in Säugerzellen genutzt werden. Er enthält unter anderem (Sigma, 1999)

- eine „multiple cloning site“ (MCS), welche das Klonieren der gewünschten DNA erleichtert
- einen CMV-Promotor (CMV = humaner Cytomegalievirus) zum Steuern der Transkription
- ein FLAG-Tag zur Detektion des exprimierten Proteins mittels Anti-FLAG-Antikörpern
- *E. coli* „origin of replication“ für effiziente Replikation in *Escherichia coli*
- SV40 „origin of replication“ für effiziente Replikation in COS-Zellen
- Ampicillin-Resistenz zur Selektion

Beim Klonieren ist darauf zu achten, daß die cDNA des zu exprimierenden Proteins ein Startcodon, aber kein Stopcodon enthält sowie das passende Leseraster für den verwendeten Vektor besitzt, da sonst das nachfolgende FLAG-Tag nicht abgelesen werden kann.

### 4.9.2 Klonierung von pFLAG/1C

Zur näheren Untersuchung der PDE1C soll ein pFLAG-Konstrukt hergestellt werden, welches nach Transfektion in Säugerzellen humane PDE1C1 überexprimiert. Dieses Plasmid erhält den Namen pFLAG/1C.

Vorarbeiten (G. Pahlke):

Aus einer humanen Tumorbioptieprobe (anaplastisches Astrocytom TB1365, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Wiestler, Neuropathologie Bonn) wurde die cDNA der PDE1C1 mittels PCR vervielfältigt. Danach erfolgte die Klonierung der aufgereinigten DNA in den T/A-Klonierungsvektor pCR3.1. Aus diesem Konstrukt (pCR3.1/PDE1CTB1365) wurde die PDE1C1 mittels geeigneter Primer zur Generierung von Restriktionsstellen für *EcoRI* und *BamHI* amplifiziert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI*. Das geschnittene, nochmals aufgereinigte Fragment von 1923 bp wurde mir freundlicherweise von G. Pahlke für die weitere Klonierung zur Verfügung gestellt.

Vorbereitung des Vektors:

Als Vorbereitung zur „FLAG-Klonierung“ wird der Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI*, die beide in der MCS des Vektors schneiden (Tab. 40, Abb. 31), verdaut. Die spätere Ligation kann somit gerichtet über sogenannte „sticky ends“ erfolgen. Es wird eine Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose, siehe 4.9.6) durchgeführt und das 4617 bp große, geschnittene Vektorfragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Dieses Fragment wird mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, 1999a) aus dem Gel eluiert, gereinigt und einer photometrischen DNA-Gehaltsbestimmung unterzogen (siehe 4.9.4.2).

Ligation:

Die Ligation erfolgt für zwei Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C zum Abstoppen der Reaktion. Der genaue Ligationsansatz ist Tab. 37 zu entnehmen. Das Mengenverhältnis von Vektor zu Insert beträgt 1:1, wobei der unterschiedlichen Fragmentgröße Rechnung getragen wird.

**Tab. 37:** Ligationsansatz zur Klonierung von pFLAG/1C

1 µl pFLAG-CMV-5a (*EcoRI*, *BamHI*) c ≈ 50 ng/µl  
6 µl PDE1C1 (*EcoRI*, *BamHI*) c ≈ 40 ng/µl  
1 µl T<sub>4</sub>-Ligase (5U/ml)  
4 µl T<sub>4</sub>-Ligase-Puffer  
8 µl Aqua bidest.

---

20 µl

### 4.9.3 Chemotransformation von Bakterien

Um Plasmide vermehren zu können, müssen diese zuerst in Bakterien eingeschleust werden. Dies erfolgt mit der Methode der Chemotransformation. Dazu werden 15 µl des oben beschriebenen Ligationsansatzes zu 150 µl chemokompetenter Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5α pipettiert. Das Bakterien/Plasmid-Gemisch wird zunächst 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgt für 120 s ein „Hitzeschock“ im Wasserbad bei exakt 42°C, gefolgt von einer mindestens 2-minütigen Inkubation auf Eis. Durch diese Prozedur gelangt die DNA in die Bakterienzelle; der genaue Mechanismus der Aufnahme ist noch nicht bekannt (Brown, 1996). Dann wird 1 ml LB-Medium (Tab. 38) zugegeben und die Bakteriensuspension eine Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. In dieser Zeit laufen in den transformierten

Bakterien die Plasmidreplikation und die Genexpression – u.a. des Resistenzgens, das gegen die Wirkung des Selektionsantibiotikums unempfindlich macht – an (Brown, 1996). Die Bakterien werden dann auf LB-Agar-Platten ( $\varnothing$  92 mm, Tab. 39) mit Ampicillin als Selektionsmarker (Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Nur die Bakterien, welche das Konstrukt pFLAG/1C mit der enthaltenen Ampicillin-Resistenz exprimieren, können auf den LB-amp-Platten Kolonien bilden.

**Tab. 38:** Zusammensetzung von LB-Medium

Reagenz	Eingesetzte Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

pH 7.4, autoklavieren

Herstellung von LB-amp-Medium durch Zugabe von Ampicillin  
(Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ )

**Tab. 39:** Zusammensetzung LB-Agar

Reagenz	Eingesetzte Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

pH 7.4, autoklavieren

Herstellung von LB-Agar-Platten: bei einer Temperatur von etwa 55°C wird das Selektionsantibiotikum (Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt. Die etwa handwarme Agar-Lösung wird ca. 0.5 cm hoch in Platten ( $\varnothing$  92 mm) gegossen und aushärten gelassen.

## 4.9.4 DNA-Präparation

### 4.9.4.1 Mini-Plasmid-Präparation

Die Mini-Plasmid-Präparation dient zur Isolation der Plasmid-DNA der bei der Chemotransformation erzeugten Bakterienklone. Dazu werden mehrere einzelne Bakterienkolonien von den bebrüteten Agar-Platten (siehe 4.9.3) in Röhrcchen mit 6 ml LB-amp-Medium (Tab. 38) überimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert.

Die Aufreinigung der DNA wird mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wird zunächst durch alkalische Lyse der Bakterienzellen freigesetzt. Nach Neutralisierung des Lysats bildet sich ein Präzipitat aus denaturierten Proteinen und Zellfragmenten, welches durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Zentrifuge 5415C) abgetrennt wird. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA, welche an eine DEAE (Diethylaminoethyl)-Säule nach Zentrifugation (30-60 s, 14000 rpm, Raumtemperatur) bindet. Danach wird die Säule mit Pufferlösung gewaschen. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 50 µl Aqua bidest. von der Säule eluiert. (Qiagen, 1999b)

Zur Identifizierung „positiver“ Bakterienklone wird die gewonnene DNA nun einer Restriktionsanalyse (siehe 4.9.5) unterzogen. Das gewünschte Plasmid kann anschließend im größeren Maßstab amplifiziert und aufgereinigt werden (siehe Maxi-Plasmid-Präparation).

Außerdem wird von den positiven Klonen eine Glycerinkultur angelegt.

#### Herstellung einer Glycerinkultur:

Zu 790 µl der Bakterienkultur werden 210 µl Glycerol gegeben. Anschließend wird gut gemischt und die Glycerinkultur der Bakterien bei -80°C eingefroren und gelagert. Aus den so gewonnenen Glycerin-Stocks lässt sich jederzeit durch Ausplattieren und/oder Animpfen von LB-amp-Medium eine neue Bakterienkultur ansetzen.

### **4.9.4.2 Maxi-Plasmid-Präparation**

Eine kleine Menge der Glycerinkultur eines „positiven“ Bakterienklons wird mit einer sterilen Pipettenspitze abgeschabt und in 5 ml LB-amp-Kulturmedium überimpft (Vorkultur). Nach einer etwa 7-stündigen Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator wird ein Teil der Bakterien-suspension in ein größeres Kulturvolumen von 200 ml LB-amp-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert (Hauptkultur).

Nach Anlegen einer Glycerinkultur unter sterilen Bedingungen (siehe oben) erfolgt die Maxi-Plasmid-Präparation mit Hilfe des „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“. Das DNA-Aufreinigungsprinzip ist analog der Mini-Plasmid-Präparation (Zentrifuge: Beckman J2-21). Allerdings wird bei der Anreicherung der DNA keine „Spin-Säule“ verwendet, sondern eine Anionen-Austauscher-Säule mit DEAE-Matrix, von welcher die DNA in einem Hochsalz-Puffer eluiert wird. (Qiagen, 1998)

Abhängig von der Größe des DNA-Pellets nach Isopropanol-Fällung und Ethanol-Waschung (70%) wird dieses in einer angemessenen Menge Aqua bidest. aufgenommen und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt (siehe unten). Zur Überprüfung des Plasmids erfolgt eine Restriktionsanalyse (siehe 4.9.5).

#### Bestimmung des DNA-Gehaltes der Plasmidpräparation:

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgt photometrisch bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $280 \text{ nm}$ .

Dabei wird zuerst ein Leerwert (500  $\mu\text{l}$  Aqua bidest.) vermessen, gefolgt von der Probe in Doppelbestimmung (5  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung + 495  $\mu\text{l}$  Aqua bidest.).

Der DNA-Gehalt errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\text{DNA-Gehalt } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{VF}$$

VF = Verdünnungsfaktor (hier: VF = 100)

Die Reinheit der DNA wird durch den Quotienten  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  ermittelt. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption beider Wellenlängen bei 1.8 (Brown, 1996).

### **4.9.5 Restriktionsanalyse**

Unter einer Restriktionsanalyse versteht man das „Schneiden“ der DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Restriktionsendonucleasen); die dabei erhaltenen Fragmente müssen definierte Größen aufweisen (Brown, 1996). Diese erwarteten Größen können vorher anhand der Nucleotidsequenz eines Plasmids ermittelt werden; der Nachweis erfolgt über Auftrennung der Proben in einem Agarose-Gel. Zum Größenvergleich dient der auf dem Gel mitgeführte DNA-Marker.

#### Restriktionsanalyse von pFLAG/1C:

Aufgrund der Nucleotid-Sequenz des Konstrukts pFLAG/1C (Abb. 31), werden nach Restriktion mit den unten aufgeführten Enzymen die in Tab. 40 aufgezeigten Fragmentgrößen erwartet.



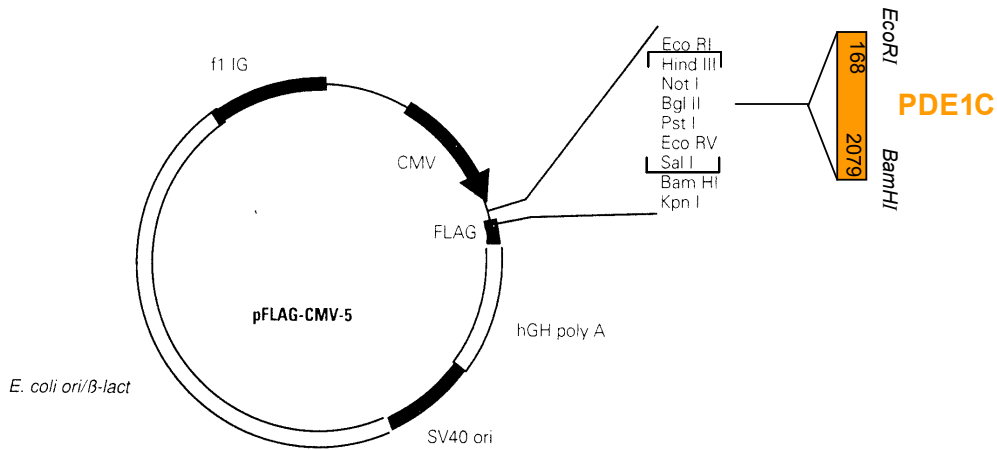


Abb. 31: Plasmidkarte von pFLAG/1C (6540 bp)

Tab. 40: Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau

Enzym	Schnittstelle im Vektor	Schnittstelle im Insert	Fragmentgröße [bp]
<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>	n912, n963	kloniert an: n168, n2079	4617, 1923
<i>PvuII</i>	n71, n2224	n648, n969	2515, 2377, 1327, 321
<i>HindIII</i>	zerstört	n340	6540 (linearisiert)
<i>HindIII</i> , <i>StuI</i>	n1971	n340	3787, 2753
<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i>	912, 948 (zerstört)	n 168 (kloniert), n1246	5456, 1084

Das Pipettierschema für die verschiedenen Restriktionsansätze ist den Tab. 41 und 42 zu entnehmen. Nach 90 min Inkubation im Wasserbad (37°C) werden je 4  $\mu$ l Ladepuffer (6 $\times$ , Tab. 44) zugegeben. Falls die Elektrophorese nicht direkt erfolgt, können die Reaktionsansätze bei -20°C gelagert werden.

Tab. 41: Restriktionsanalyse des Vektors pFLAG-CMV-5a (c = 1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

0.2 $\mu$ l pFLAG-CMV-5a	0.2 $\mu$ l pFLAG-CMV-5a
1.0 $\mu$ l <i>EcoRI</i>	2.0 $\mu$ l <i>PvuI</i>
2.0 $\mu$ l Reaktionspuffer	2.0 $\mu$ l Reaktionspuffer
16.8 $\mu$ l Aqua bidest.	15.8 $\mu$ l Aqua bidest.
<hr/> 20.0 $\mu$ l	<hr/> 20.0 $\mu$ l

**Tab. 42:** Restriktionsanalyse des Konstrukts pFLAG/1C (c = 1 µg/µl)

0.9 µl pFLAG/1C	1.0 µl pFLAG/1C
1.0 µl <i>EcoRI</i>	1.0 µl <i>PvuII</i>
1.0 µl <i>BamHI</i>	2.0 µl Reaktionspuffer
2.0 µl Reaktionspuffer	16.0 µl Aqua bidest.
15.1 µl Aqua bidest.	<hr/>
<hr/>	20.0 µl
20.0 µl	
0.9 µl pFLAG/1C	1.0 µl pFLAG/1C
1.0 µl <i>HindIII</i>	1.0 µl <i>EcoRI</i>
1.0 µl <i>StuI</i>	1.0 µl <i>PstI</i>
2.0 µl Reaktionspuffer	2.0 µl Reaktionspuffer
15.1 µl Aqua bidest.	15.1 µl Aqua bidest.
<hr/>	<hr/>
20.0 µl	20.0 µl

#### 4.9.6 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, die negativ geladenen DNA-Moleküle/-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufzutrennen. Der Agarosegehalt bestimmt hierbei die Porengröße des Gels und somit die Größe der DNA-Moleküle, die sich damit trennen lassen (Brown, 1996). Für die verwendeten Plasmide pFLAG-CMV-5a und pFLAG/1C werden 1 %-ige Agarose-Gele verwendet. Dazu werden 0.3 g bzw. 1 g Agarose in 30 ml bzw. 100 ml TAE-Puffer (Tab. 43) unter Rühren auf der Heizplatte gelöst und dann unter fließendem Wasser langsam und gleichmäßig auf ca. 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1.5 bzw. 4.2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wird die Agarose-Lösung luftblasenfrei in den vorbereiteten Gießstand gegossen. Nach Aushärten der Gelmatrix wird die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer befüllt und der Probenkamm gezogen. Nun können ein geeigneter DNA-Größenmarker (hier 1 kb- und 100 bp-Marker) und die Proben – nach Zugabe von Ladepuffer (Tab. 44) – in die entstandenen Taschen gefüllt werden. Durch Anlegen der Spannung (60 V bzw. 70 V) wird die Elektrophorese gestartet.

Nach Beenden der Elektrophorese werden die aufgetrennten Banden mit Hilfe des Eagle Eye™II unter UV detektiert. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid erkennt man Fluoreszenzbanden an den Positionen, die den verschiedenen Größen der DNA-Fragmente entsprechen (Brown, 1996).

**Tab. 43:** Zusammensetzung des TAE-Puffers (1×)

Reagenz	Endkonzentration
Tris-Acetat	0.04 M
EDTA	0.001 M

**Tab. 44:** Zusammensetzung des Ladepuffers (6×)

Reagenz	Endkonzentration
Bromphenolblau	0.25 % (v/v)
Saccharose in Aqua bidest.	40 % (w/v)

### 4.9.7 Calcium-Phosphat-Transfektion

Eine weit verbreitete Technik, klonierte Eukaryonten-DNA in Säugerzellkulturen einzuschleusen, ist die Calcium-Phosphat-Transfektion. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar, es wird jedoch vermutet, daß es sich hierbei um Endocytose handelt. Nach der Aufnahme ins Cytoplasma der Zelle gelangt die DNA in den Nucleus. Die Calcium-Phosphat-Transfektion ist eine effiziente Methode, um DNA in einer großen Anzahl von Zellen gleichzeitig transient zu exprimieren. (Sambrook et al, 1989)

#### Durchführung:

COS-7-Zellen werden, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, abtrypsinisiert und ausgezählt. Die Zellen werden dann in Gewebekulturschalen (Ø 92 mm; zwei pro Konstrukt) ausgesät ( $3-4 \times 10^5$  Zellen pro Platte) und 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Morgen (die Zellen sollten etwa 50-60% konfluent sein) wird das Kulturmedium abgesaugt und durch 9 ml frisches Vollmedium ersetzt. Zwei Stunden später erfolgt die Calcium-Phosphat-Transfektion. Dazu wird 1 ml Plasmid- $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Tab. 45) tropfenweise zu 1 ml HBS (2×; Tab. 46) pipettiert. Dabei wird die HBS-Lösung konstant mit Luft durchsprudelt. Es ist darauf zu achten, daß das Zupipettieren langsam erfolgt (ca. ein Tropfen pro Sekunde), da sich sonst kein feinkristallines Präzipitat bilden kann. Nach dem Zutropfen wird der Ansatz 6 s gevortext und dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wird das Präzipitat resuspendiert. Auf jede Platte werden 960 µl der Lösung vorsichtig und gleichmäßig verteilt. Ein Ansatz reicht für zwei Gewebekulturplatten. Nach fünfständiger Inkubation im  $\text{CO}_2$ -Inkubator erfolgt ein Glycerolschock. Dieser soll die Transfektionseffizienz erhöhen. Zuerst wird das Medium von den Zellen entfernt und der Zellrasen einmal mit 5 ml PBS (37°C, Tab. 12) gewaschen. Dann werden 2 ml einer Glycerol-Lösung (10 % Glycerol in Vollmedium)

auf die Zellen gegeben. Nach genau 2 min werden 5 ml PBS zupipettiert und die Lösung sofort abgesaugt. Danach wird der Zellrasen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und mit 10 ml Medium für 40 Stunden inkubiert. (Sambrook et al., 1989)

Es folgt die Aufarbeitung der transfizierten COS-7-Zellen und die Testung im PDE-Assay (siehe 4.5).

**Tab. 45:** Herstellung der Plasmid-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Ansatz für zwei 92 mm-Platten)

x µl Plasmid (≈ 5-10 µg DNA/Platte)*	*: pFLAG-CMV-5a: 20 µg pro Ansatz
100 µl CaCl <sub>2</sub> (2.5 M, steril filtriert)	pFLAG/1C: 16 µg pro Ansatz
ad 1000 µl mit Aqua bidest. (steril)	

**Tab. 46:** Herstellung von HBS (2×)

Reagenz	Endkonzentration
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	1.5 mM
D-Glucose	12 mM
HEPES	50 mM

exakt pH 7.05, steril filtrieren und aliquotieren. Nach dem Sterilfiltrieren muß der pH-Wert nochmals überprüft werden.

## 4.10 Verwendete Materialien

### Zellkultur AK Eisenbrand

Astrocyte growth medium AGM™ (astrocyte basal medium ABM + single quots: FBS, Progesteron, hEGF, GA-1000 (Gentamicinsulfat, Amphotericin B), Insu- lin, Transferrin)	Bio Whittaker
DMEM (11966-025)	Invitrogen
Fetales Kälberserum	Invitrogen
Neubauer-Zählkammer	Brand
Penicillin (10000 Units/ml) / Streptomycin (10000 µg/ml)	Invitrogen
RPMI 1640 (21875-034)	Invitrogen
Trypan Blau-Lösung 0.4 %	Sigma
Trypsin, 1:250	Serva

### Zellkultur AK Deitmer

BME (B9638)	Sigma
BSA	Boehringer Ingelheim
DMEM (D7777)	Sigma
DNaseI, Grad II	Roche
EGF, Maus, GradI	Roche
FKS	Gibco
Insulin	Boehringer Ingelheim, Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
Transferrin	Roche
Trypsin, 2.5 %	Roche

**Zellkultur AK Zankl**

Bactotrypsin-Lösung	Difco
Colcemid-Lösung	Sigma
Giemsa-Lösung	Merck
Trypsin-EDTA-Lösung	Bio Whittaker

**Chemikalien**

$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
5'AMP (Dinatriumsalz)	Sigma
5'GMP (Dinatriumsalz)	Sigma
Agar-Agar	Roth
Agarose	Gibco BRL
Albumin Standard, bovine albumine, Fraktion V	Pierce
Ampicillin	Roth
ATP	Alexis
$\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$	Fluka
Bacto-Trypton	ICN
Bromphenolblau	Serva
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
cAMP (Natriumsalz)	Sigma
cGMP (Natriumsalz)	Sigma
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G-250	Roth
Cyclopiazonsäure	Alexis
DAPI/SR101	Partec
D-Glucose	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
DMSO	Fluka
EDTA	Serva
EGTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Sigma
Hefe-Extrakt	Gibco BRL
HEPES	Roth

KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel de Haën
MES	Serva
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	Merck
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	Riedel de Haën
NaCl	Roth
Saccharose	Merck
Sulforhodamin B	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris	ICN
Tris Base	Boehringer Mannheim
Triton <sup>®</sup> X-100	Serva
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	Merck

### Radiochemikalien

[2,8- <sup>3</sup> H] Adenosine 3',5' cyclic phosphate, NH <sub>4</sub> -salt, TRK 498 Spezifische Aktivität: 43.0 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech
[8- <sup>3</sup> H] Guanosine 3',5' cyclic phosphate, NH <sub>4</sub> -salt, TRK 392 Spezifische Aktivität: 18.0 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech

### Protease-Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Leupeptin	Alexis
Pepstatin A	Alexis
PMSF	Alexis
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	Roche

### PDE-Modulatoren

Calmodulin (Schweinehirn)	Boehringer Mannheim
Rolipram (Racemat)	Schering AG Hamburg

**Fluoreszenzfarbstoffe und Ionophoren**

Fura-2 AM	Molecular Probes
4-bromo-A23187	Sigma
Ionomycin, freie Säure	Calbiochem

**Enzyme, Marker und PCR**

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	Roche, MBI Fermentas
<i>Pst</i> I	Roche
<i>Pvu</i> II	Roche
<i>Stu</i> I	Roche
DNA-Marker (100 bp)	Gibco BRL, MBI Fermentas, NEB
DNA-Marker (1 kb)	Gibco BRL
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase (5 Units/μl)	Gibco BRL
dNTP-Mix (je 10 mM)	MBI Fermentas, Gibco BRL, peqlab
Primer	MWG Biotech
RNAse-Inhibitor	Roche

**Kits**

Carboxy-terminal FLAG Mammalian Transient Expression Kit	Sigma
cyclic AMP[ <sup>3</sup> H] assay system (TRK 432)	Amersham
cyclic GMP[ <sup>3</sup> H] assay system (TRK 500)	Amersham
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Titan One Tube RT-PCR System	Roche

**Verbrauchsmaterialien**

Cellulose Acetat Filter (0.2 μm)	Sartorius
Combitips (5 ml, 12.5 ml)	Eppendorf
Coverslips (Ø 15 mm)	Assistent



Cryo-Röhrchen	Greiner bio-one
Eppendorf-Tubes	Greiner bio-one
Falcon <sup>®</sup> Easy Grip™ Petrischale (Ø 35 mm)	Becton Dickinson
Film	Kodak Farbwelt 100 ASA
Gewebekulturflaschen (A = 25 cm <sup>2</sup> , 80 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc
Gewebekulturschalen (Ø 92 mm)	Nunc
Gewebekulturschalen (24 well)	Greiner bio-one
Glas-Petrischalen STERIPLAN (Ø 100 mm)	Fisher Scientific
Glaspipetten	Roth
Kulturröhrchen	Sarstedt
Microfuge Tube Polyallomer	Beckman
Mikrotiterplatten (96-well)	Greiner bio-one
Nucleobond <sup>®</sup> AX Falten-Filter	Macherey-Nagel
Omnifix-F 1ml	B. Braun
Pasteurpipetten	Roth
PCR-Tubes, 0.5 ml, ultradünn	Biozym
Petrischalen für Bakterienkultivierung	Roth, Greiner
Pipettenspitzen	Greiner bio-one
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Ritips <sup>®</sup> (2.5 ml)	Roth
Röhrchen (13 ml)	Sarstedt
Rührspatel	Sarstedt, Roth
SafeSeal Filter Tips <sup>®</sup>	Biozym
Serologische Pipetten	Helena Biosciences
Spritzenfilter, PVDF (0.22 µm), steril	Roth
Sterican Ø 0.45 × 25 mm	B. Braun
Super-Frost Objektträger	Roth
Szintillationscocktail Ready Safe™	Beckman Coulter
Szintillationsgefäße Zinsser Minis <sup>®</sup> 2002	Zinsser Analytik
Trockenblock	Schleicher und Schuell
Zentrifugenflasche (50 ml, 250 ml)	Nalgene

**Geräte**

Autoklav	Systek Tischautoklav Typ 5075EL
Biofreezer	Sanyo MDF-U60865
CO <sub>2</sub> -Inkubator	CB210, WTB Binder
Detektionssystem für Agarose-Gele	Eagle Eye™II, Stratagene
Elektrophorese	Horizon® 58, Life Technologies MWG Biotech Biorad Power Pac 200
Glas-Homogenisator	Wheaton
Heizplatte	Bachofer
Kamera (Mikroskop)	Zeiss 45 60 70
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop	Leitz Labovert Zeiss Axioscop 20
pH-Meter und pH-Elektrode	Knick 763, Mettler Toledo InLab®
Photometer	Beckman DU® 649 Microplate Reader, Model 450, Biorad Uvikon 930, Kontron Instruments
Pipetten	10µl und 1000µl, Eppendorf (variabel) 200µl und 250µl, Eppendorf (fest) P2, P10, P100, P200 und P1000, Gilson
Pipettierhilfe	accu-jet®, Brand Pipetus® akku, Hirschmann Laborgeräte
Speedvac	Univapo 150 H, Uniequip Vakuumpumpe RD 3, Brand
Sterilbank	Heraeus LaminAir® HBB 2448 Heraeus LaminAir® HLB 2448 GS Jouan LC 2.12
Szintillationszähler	Betaszint BF 5000, Berthold LS1701, Beckman
Thermocycler	PTC-100™, MJ Research, Inc.
Trockenschrank	Heraeus KTG800 Memmert
Ultraschallbad	Transsonic 460/H, Elma

Video-Imaging Meßplatz	<p>Filterblock DM400, Nikon</p> <p>Fluoreszenzdetektor: SIT-Kamera (Silicon-Intensified-Target) C2400, Hamamatsu</p> <p>Gerätekomponenten: PTI</p> <p>Inverses Mikroskop Nikon Diaphot</p> <p>Software: ImageMaster, PTI</p> <p>Xenon Bogenlampe 75W, Osram</p>
Vortex-Mixer	<p>MS1 Minishaker, IKA</p> <p>Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG</p>
Waage	<p>Sartorius A 200 S</p> <p>Sartorius BP 210 S</p> <p>Sartorius L 610 D</p>
Wasserbad	<p>Haake D3</p> <p>Julabo PC</p>
Zentrifuge	<p>Beckman J2-21</p> <p>Beckman Microfuge<sup>®</sup> R, Typ MFE</p> <p>Beckman Optima<sup>™</sup> TL Ultrazentrifuge</p> <p>Eppendorf Zentrifuge 5415C</p> <p>Heraeus Labofuge 400R</p> <p>Heraeus Minifuge RF</p> <p>Heraeus Minifuge T</p>

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 PDE-Aktivität und „second messenger“-Spiegel**

#### **5.1.1 cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten, C6-Rattenglioblastomzellen und in humanen Glioblastomzelllinien**

Bei einer Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  cNMP wurden sowohl die cAMP-spezifische PDE-Aktivität, als auch die cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von subkultivierten Ratten-Astrocyten, C6-Glioblastomzellen und den humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF268, SF539, SF268 untersucht. Zur Bestimmung der PDE1-Aktivität wurde  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  verwendet; zur Bestimmung des PDE4-Anteils an der Gesamt-PDE-Aktivität kam Rolipram [10  $\mu\text{M}$ ] zum Einsatz. Die cNMP-spezifische PDE-Aktivität, welche ohne Modulatoreinsatz bei einer Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  cNMP gemessen wurde, ist im folgenden auch als PDE-Grundaktivität bezeichnet.

Die Ergebnisse sind nach Spezies getrennt aufgeführt. Die Enzymaktivitäten in [pmol cNMP/min  $\times$  mg Protein] wurden in Triplikaten pro Einzelexperiment ermittelt. Die prozentuale Steigerung bzw. Hemmung von PDE-Aktivitäten durch die beiden Modulatoren  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und Rolipram wurde für jedes Einzelexperiment ermittelt und danach der Mittelwert aus der Anzahl der Einzelexperimente errechnet.

#### **PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die PDE1- und PDE4-Isoenzymexpression von nicht-malignen und malignen ZNS-Zellen miteinander verglichen werden, um eventuelle Unterschiede in der Isoenzymverteilung festzustellen. Dazu wurde ein System aus subkultivierten Ratten-Astrocyten und der Rattenglioblastomzelllinie C6 gewählt.

**Tab. 47:** cAMP-spezifische PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

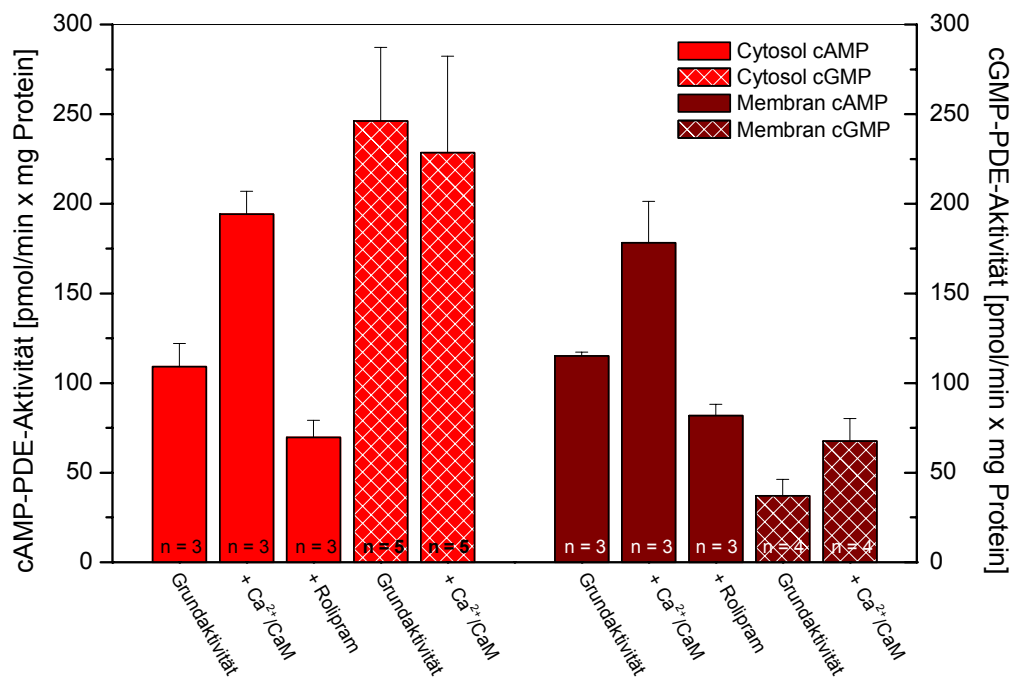
<b>Cytosol-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>+ Ca<sup>2+</sup>/CaM</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>Ca<sup>2+</sup>/CaM-Steigerung</b> [%]	<b>+ Rolipram</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>Rolipram-Hemmung</b> [%]
<b>Ratten-Astrocyten</b>	109.1 ± 13.0	194.3 ± 12.7	82.1 ± 12.8	69.7 ± 9.6	35.9 ± 6.3
<b>C6</b>	53.8 ± 8.9	77.2 ± 6.2	61.2 ± 4.5	14.7 ± 7.2	69.7 ± 17.5
<b>Membran-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>+ Ca<sup>2+</sup>/CaM</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>Ca<sup>2+</sup>/CaM-Steigerung</b> [%]	<b>+ Rolipram</b> [pmol cAMP/ min · mg Protein]	<b>Rolipram-Hemmung</b> [%]
<b>Ratten-Astrocyten</b>	115.2 ± 2.1	178.2 ± 23.1	74.0 ± 7.2	81.9 ± 6.2	29.9 ± 5.7
<b>C6</b>	12.1 ± 1.0	14.8 ± 2.0	27.1 ± 9.7	6.8 ± 0.2	49.5 ± 3.4

In Ratten-Astrocyten (Abb. 32, Tab. 47) zeigt sich eine 1:1-Verteilung der cAMP-spezifischen PDE-Aktivität zwischen Cytosol und Membran. Die cAMP-spezifische PDE-Aktivität ist in beiden Kompartimenten durch Ca<sup>2+</sup>/CaM um 82 % bzw. 74 % stimulierbar, was auf das Vorhandensein von PDE1 hindeutet. Bei der im Assay gewählten Substratkonzentration von 1µM cAMP ist bevorzugt die PDE1C-Isoform aktiv. Die beiden PDE1-Isoformen PDE1A und PDE1B sind unter diesen Bedingungen weniger aktiv und bilden daher vermutlich nicht den Hauptanteil der detektierten PDE1-Aktivität (Zhao et al., 1997). Die prozentualen Anteile der Rolipram-hemmbarer cAMP-spezifische PDE-Aktivität (36 %) ist in Cytosol- und Membran-Fraktion vergleichbar (36 % bzw. 30 %), was zeigt, daß der Anteil der PDE4 an der Gesamt-PDE-Aktivität gering ist.

**Tab. 48:** cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

<b>Cytosol-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cGMP/ min · mg Protein]	<b>+ Ca<sup>2+</sup>/CaM</b> [pmol cGMP/ min · mg Protein]	<b>Ca<sup>2+</sup>/CaM-Steigerung</b> [%]
<b>Ratten-Astrocyten</b>	246.1 ± 41.2	228.58 ± 53.85	---
<b>C6</b>	34.5 ± 6.7	37.02 ± 10.94	---
<b>Membran-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cGMP/ min · mg Protein]	<b>+ Ca<sup>2+</sup>/CaM</b> [pmol cGMP/ min · mg Protein]	<b>Ca<sup>2+</sup>/CaM-Steigerung</b> [%]
<b>Ratten-Astrocyten</b>	37.1 ± 9.2	67.5 ± 12.7	88.8 ± 27.7
<b>C6</b>	8.6 ± 5.1	6.9 ± 2.8	---

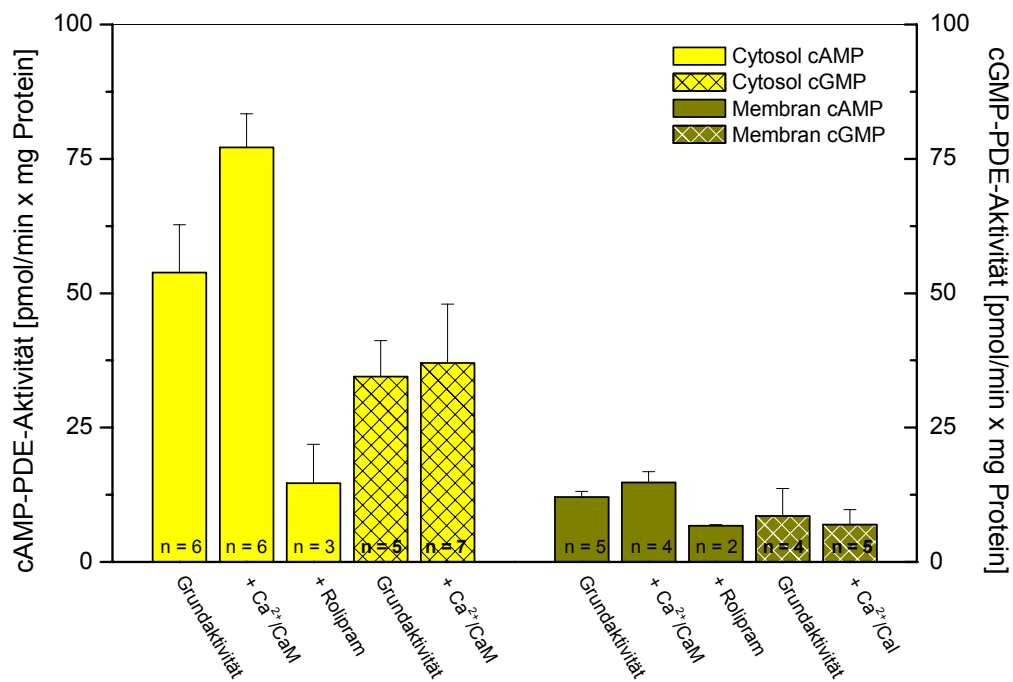
---: nicht vorhanden



**Abb. 32:** cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von Ratten-Astrocyten.

Die cGMP-hydrolytische Aktivität im Cytosol der Ratten-Astrocyten (Abb. 32) liegt mit 246 pmol cGMP/min × mg Protein etwa doppelt so hoch als die gemessene cAMP-spezifische PDE-Aktivität. Sie ist jedoch durch Ca<sup>2+</sup>/CaM nicht stimulierbar. Im Vergleich zur Cytosol-Fraktion ist in der Membran-Fraktion eine geringe cGMP-spezifische PDE-Aktivität (37 pmol cGMP/min × mg Protein) detektierbar; sie ist jedoch durch Ca<sup>2+</sup>/CaM noch um etwa 89 % stimulierbar (Abb. 32, Tab. 48).

In C6-Glioblastomzellen (Abb. 33, Tab. 47) zeigt sich in der cytosolischen Fraktion eine etwa 4.5-fach höhere cAMP-spezifische PDE-Aktivität als in der Membran-Fraktion. Die cAMP-spezifische PDE-Aktivität im Cytosol ist durch Ca<sup>2+</sup>/CaM um 61 % stimulierbar. In der Membran-Fraktion ist die Stimulierung nur etwa halb so groß. Ein großer Teil der cAMP-spezifischen PDE-Aktivität (70 % in der Cytosol- und 50 % in der Membran-Fraktion) ist in beiden Kompartimenten durch Rolipram hemmbar. Die cGMP-spezifische PDE-Aktivität (Abb. 33, Tab. 48) liegt sowohl in der Cytosol- als auch in der Membran-Fraktion um etwa das 1.5-fache niedriger als die cAMP-spezifische PDE-Aktivität und ist nicht durch Ca<sup>2+</sup>/CaM stimulierbar.



**Abb. 33:** cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von C6-Glioblastomzellen.

Ein direkter Vergleich der PDE-Aktivitäten von Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen findet sich bei der Darstellung der Ergebnisse zur Etablierung eines Ratten-Zellmodells (siehe 5.3).

### PDE-Aktivität in humanen Glioblastomzelllinien

Weiterhin wurden vier humane Glioblastomzelllinien des NCI-Zelllinienpanels bezüglich ihrer PDE1- und PDE4-Expression näher charakterisiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die verschiedenen malignen Zelllinien Unterschiede im PDE1- und PDE4-Expressionsmuster aufweisen.

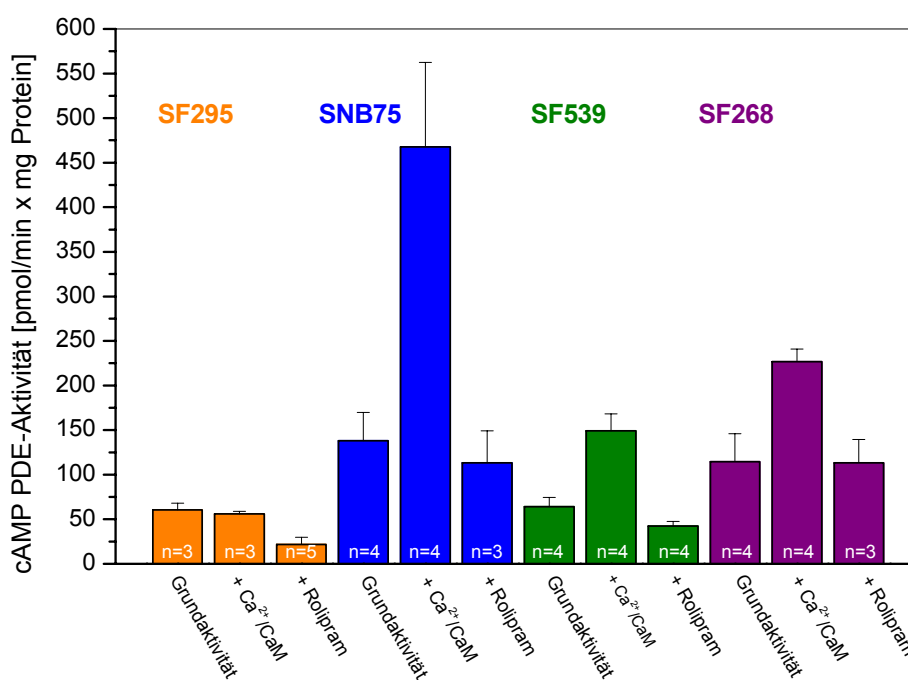
Die cAMP-PDE-Daten für die humanen Glioblastomzelllinien SF295, SF539 und SF268 wurden von S. Anbari im Rahmen eines Forschungspraktikums ermittelt. Zur Bestimmung des Rolipram-hemmbareren Anteils der Gesamt-PDE-Aktivität wurde eine Rolipram-Konzentration von 50 µM eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurden die Werte für die Zelllinie SNB75 im Rahmen dieser Arbeit bei einer Rolipram-Konzentration von 10 µM bestimmt.

**Tab. 49:** cAMP-spezifische PDE-Aktivität in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF295, SF539, SF268.

Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

Cytosol-Fraktion	Grundaktivität [pmol cAMP/min · mg Protein]	+ Ca <sup>2+</sup> /CaM [pmol cAMP/min · mg Protein]	Ca <sup>2+</sup> /CaM-Steigerung [%]	+ Rolipram [pmol cAMP/min · mg Protein]	Rolipram-Hemmung [%]
<b>SNB75</b>	138.1 ± 31.6	467.9 ± 94.6	247.9 ± 40.0	113.1 ± 36.1	18.1 ± 8.4
<b>SF295</b>	60.4 ± 7.4	55.9 ± 2.8	---	21.6 ± 8.3	75.4 ± 4.2
<b>SF539</b>	64.1 ± 10.2	149.0 ± 19.1	135.8 ± 20.0	42.5 ± 5.2	29.9 ± 18.6
<b>SF268</b>	111.4 ± 31.4	226.9 ± 14.0	118.4 ± 49.0	113.1 ± 26.4	---
Membran-Fraktion	Grundaktivität [pmol cAMP/min · mg Protein]	+ Ca <sup>2+</sup> /CaM [pmol cAMP/min · mg Protein]	Ca <sup>2+</sup> /CaM-Steigerung [%]	+ Rolipram [pmol cAMP/min · mg Protein]	Rolipram-Hemmung [%]
<b>SNB75</b>	36.9 ± 13.6	150.1 ± 9.8	441.6 ± 300.8	n.a.	n.a.
<b>SF295</b>	29.1 ± 7.4	33.5 ± 15.8	---	13.2 ± 4.9	53.4 ± 19.0
<b>SF539</b>	22.3 ± 4.3	28.8 ± 6.0	---	n.b.	n.b.
<b>SF268</b>	18.4 ± 4.3	74.4 ± 5.6	335.6 ± 101.1.	n.b.	n.b.

---: nicht vorhanden, n.a.: nicht auswertbar, n.b: nicht bestimmt



**Abb. 34:** Cytosolische cAMP-spezifische PDE-Aktivität in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF295, SF539 und SF268.

Aus Abb. 34 wird deutlich, daß sich die vier Glioblastomzelllinien in ihrer cAMP-spezifischen PDE-Grundaktivität und ihrem Anteil an CaM-stimulierbarer PDE1- bzw. Rolipram-



hemmbarer-PDE4-Aktivität zum Teil deutlich unterscheiden. Die Zelllinien SF539 und SF268 weisen – mit einer Steigerung der PDE-Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  um 136 % bzw. 118 % – ähnliche PDE1-Muster auf. In den SF268-Zellen ist keine Rolipram-hemmbar PDE-Aktivität erkennen, die Zelllinie SF539 besitzt einen PDE4-Anteil von 30 %. Gravierende Unterschiede im PDE1- und PDE4-Muster werden zwischen den Zelllinien SNB75 und SF295 deutlich. Die Zelllinie SF295 zeigt mit 60 pmol cAMP/min  $\times$  mg Protein eine niedrige cAMP-PDE-Grundaktivität, welche nicht durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  stimulierbar ist. Darüberhinaus weisen die Zellen einen hohen Anteil an Rolipram-hemmbarer PDE4-Aktivität (75 %) auf. Im Vergleich dazu zeigt die Glioblastomzelllinie SNB75 mit 138 pmol cAMP/min  $\times$  mg Protein eine etwa zweifach höhere cAMP-PDE-Grundaktivität als die Zelllinie SF295. Diese Aktivität kann durch den Modulator  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  um etwa 250 % gesteigert werden. Der Rolipram-hemmbar PDE4-Anteil ist mit 18 % relativ gering.

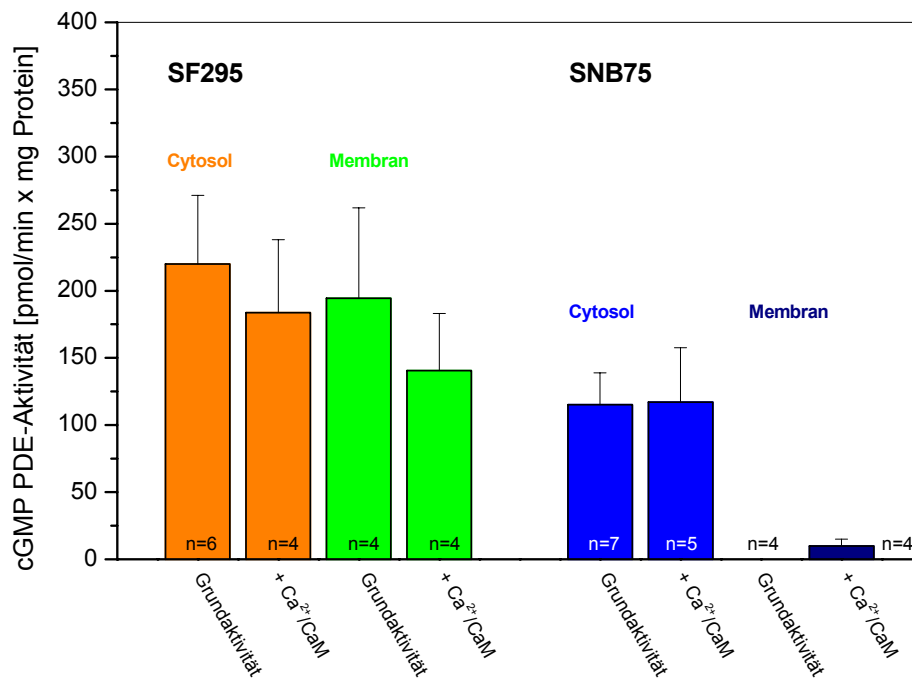
Da die beiden humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 zwei „Extreme“ bezüglich ihrer PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung darstellen, wird der Großteil der nachfolgenden Untersuchungen an humanen Glioblastomzellen nur noch mit diesen beiden Zelllinien durchgeführt.

Auf eine graphische Darstellung der PDE-Daten für die Membran-Fraktion der untersuchten Zelllinien (Tab. 49) wurde verzichtet, da die ein Teil der Werte wegen starker Schwankungen der Einzelexperimente bzw. aufgrund der geringen PDE-Aktivitäten nicht aussagekräftig ist.

**Tab. 50:** cGMP-spezifische PDE-Aktivität in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

<b>Cytosol-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cGMP/ min $\cdot$ mg Protein]	<b>+ <math>\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}</math></b> [pmol cGMP/ min $\cdot$ mg Protein]	<b><math>\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}</math>- Steigerung</b> [%]
<b>SNB75</b>	115.2 $\pm$ 23.7	117.0 $\pm$ 40.7	---
<b>SF295</b>	219.9 $\pm$ 51.1	183.6 $\pm$ 54.4	---
<b>Membran-Fraktion</b>	<b>Grundaktivität</b> [pmol cGMP/ min $\cdot$ mg Protein]	<b>+ <math>\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}</math></b> [pmol cGMP/ min $\cdot$ mg Protein]	<b><math>\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}</math>- Steigerung</b> [%]
<b>SNB75</b>	---	10.0 $\pm$ 5.1	n.a.
<b>SF295</b>	194.6 $\pm$ 67.3	140.5 $\pm$ 42.5	---

---: nicht vorhanden, n.a.: nicht auswertbar



**Abb. 35:** cGMP- spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion der Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295.

Die Zelllinie SF295 zeigt in beiden Kompartimenten vergleichbare cGMP-PDE-Grundaktivitäten um circa 200 pmol cGMP/min × mg Protein, welche sich nicht durch Ca<sup>2+</sup>/CaM stimulieren lassen (Abb. 35, Tab. 50). In den SNB75-Glioblastomzellen ist die cytosolische cGMP-spezifische PDE-Aktivität um etwa die Hälfte geringer als in den SF295-Zellen, aber ebenso wie in diesen nicht Ca<sup>2+</sup>/CaM-stimulierbar. In der Membran-Fraktion kann erst nach Zugabe des Modulators Ca<sup>2+</sup>/CaM eine sehr geringe cGMP-spezifische PDE-Aktivität detektiert werden (Abb. 35, Tab. 50).

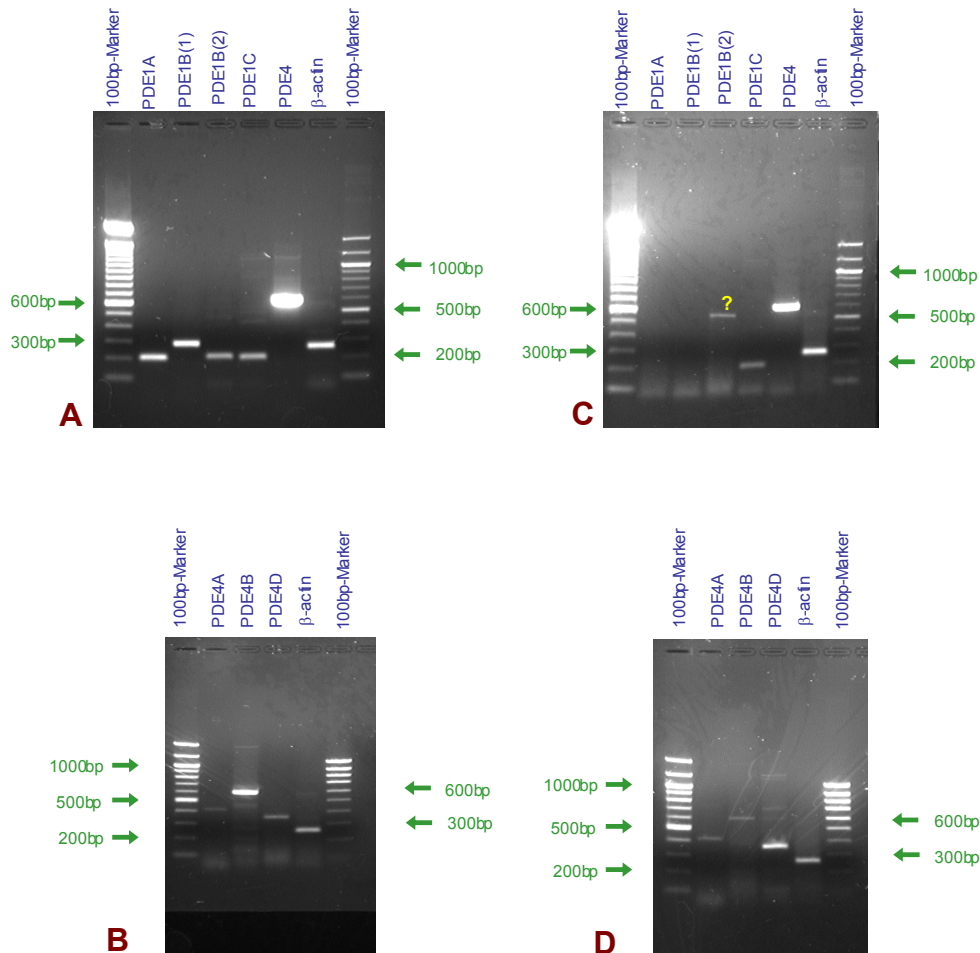
### Expressionsmuster der PDE1- und PDE4-Isoenzyme

Für die weitere Charakterisierung des PDE1- und PDE4-Expressionsmusters in Ratten-Astrocyten, C6-Glioblastomzellen sowie den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 wurden RT-PCR-Versuche mit subtyp-spezifischen Primern durchgeführt. Die Daten für die humanen Glioblastomzelllinien wurden von G. Pahlke mittels RT-PCR und semi-quantitativer RT-PCR (Real-Time TaqMan PCR) generiert (unveröffentlichte Ergebnisse) und werden erst im Diskussionsteil berücksichtigt. Im folgenden sind die RT-PCR-Daten für Ratten-Astrocyten und C6-Zellen dargestellt. Tab. 51 zeigt eine Übersicht der erwünschten Primerprodukte mit der erwarteten Fragmentgröße für jedes Amplifikat. Es wurden keine Primer

für den PDE4C-Subtyp eingesetzt, da diese PDE-Isoform im Gehirn nur in geringen Mengen vorkommt (Engels et al., 1995). Als Kontrolle wird das ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Actin-Gen mitgeführt.

**Tab. 51:** Amplifikate mit den dazugehörigen Fragmentgrößen

<b>Amplifikat</b>	<b>Fragmentgröße [bp]</b>
PDE1A	177
PDE1B(1)	262
PDE1B(2)	185
PDE1C	180
PDE4 (generic)	585
PDE4A	393
PDE4B	602
PDE4D	366
$\beta$ -Actin	239



**Abb. 36:** PDE1- und PDE4-Fragmente in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen nach RT-PCR (1.5 % Agarose). **A** und **B**: PDE1 und PDE4-Fragmente aus Ratten-Astrocyten, **C** und **D**: PDE1 und PDE4-Fragmente aus der C6-Glioblastomzelllinie

In Ratten-Astrocyten wurden DNA-Fragmente für Transkripte jeder PDE1-Isoform (PDE1A-C) erhalten (Abb. 36A). Für die PDE4-Subtypen A, B und D (Abb. 36B) konnten ebenfalls DNA-Fragmente detektiert werden. Die C6-Zellen wiesen nur DNA-Fragmente für Transkripte des PDE1C-Subtyps auf (Abb. 36C). Für alle untersuchten PDE4-Subtypen waren Fragmente erkennbar (Abb. 36D).

Durch die RT-PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich Ratten-Astrocyten und C6-Zellen in der Expression der PDE1-Isoenzyme unterscheiden. Während Ratten-Astrocyten alle PDE1-Isoformen besitzen, kommt in der Glioblastomzelllinie C6 nur die PDE1C-Isoform vor. Wird die Intensität der DNA-Banden für Transkripte der PDE4-Isoenzymfamilie in beiden Zellsystemen verglichen, so scheint es, daß in Ratten-Astrocyten die PDE4B am stärksten exprimiert wird; in C6-Zellen die PDE4D (bei etwa gleicher Intensität der  $\beta$ -Actin-Bande).

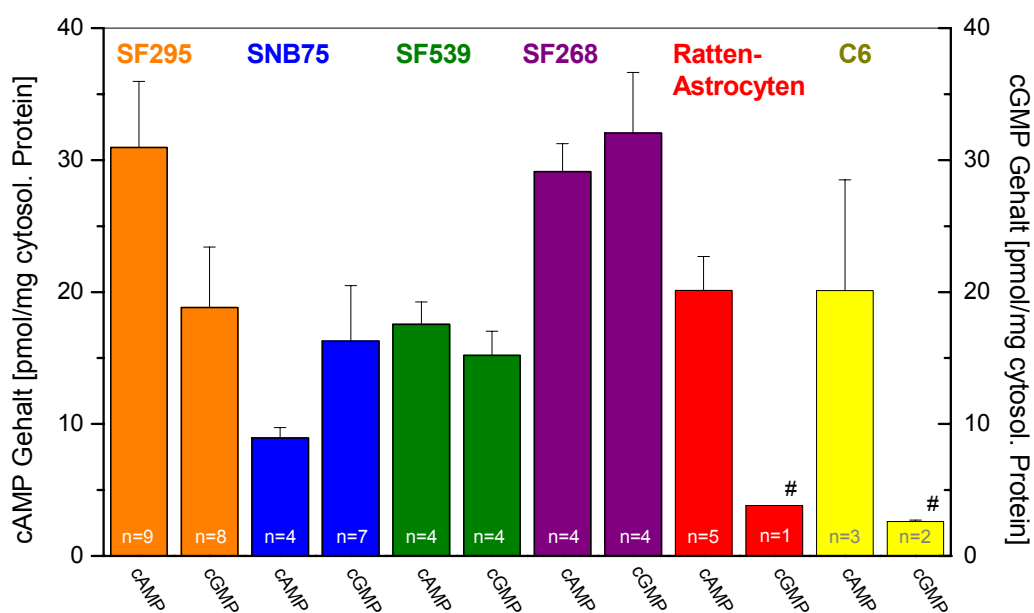
### 5.1.2 cAMP- und cGMP-Gehalt in den untersuchten Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollte ein eventueller Zusammenhang zwischen den cytosolischen cNMP-Spiegeln und den PDE-Aktivitäten näher beleuchtet werden. Hierzu wurden die verschiedenen Glioblastomzelllinien bzw. die nicht-malignen Ratten-Astrocyten bezüglich ihres Gehalts an cyclischen Nucleotiden näher charakterisiert (Tab. 52 und Abb. 37). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mehrerer Doppelbestimmungen (n) mit dem mittleren absoluten Fehler des Mittelwerts angegeben.

**Tab. 52:** Cytosolischer cAMP- und cGMP-Gehalt der untersuchten Glioblastomzelllinien und nicht-maligner Ratten-Astrocyten. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

Zellsystem	cAMP		cGMP	
	[pmol/mg cytosol. Protein]	n	[pmol/mg cytosol. Protein]	n
SF295	31.0 ± 5.0	n = 9	18.8 ± 4.6	n = 8
SNB75	9.0 ± 0.8	n = 4	16.3 ± 4.2	n = 7
SF539	17.6 ± 1.7	n = 4	15.2 ± 1.8	n = 4
SF268	29.1 ± 2.1	n = 4	32.0 ± 4.6	n = 4
Ratten-Astrocyten	20.1 ± 2.6	n = 5	3.8 <sup>#</sup>	n = 1
C6	20.1 ± 8.4	n = 3	2.6 ± 0.1 <sup>#</sup>	n = 2

<sup>#</sup>: Werte liegen an der Nachweisgrenze des Assays



**Abb. 37:** Cytosolischer cAMP- und cGMP-Gehalt in humanen Glioblastomzelllinien, C6-Rattenglioblastomzellen und nicht-malignen Ratten-Astrocyten. #: Werte liegen an der Nachweisgrenze des Assays

Dabei zeigt sich, daß die Zelllinie SNB75 von allen untersuchten Zellen den niedrigsten Gehalt an cAMP aufweist (9 pmol cAMP/mg cytosol. Protein), wohingegen die Zelllinien SF295 und SF268 einen etwa 3-4-fach höheren Gehalt an cAMP zeigen. Zwischen Ratten-Astrocyten und der C6-Rattenglioblastomzelllinie ist kein Unterschied im cAMP-Gehalt, welcher bei 20 pmol cAMP/mg cytosol. Protein liegt, zu erkennen.

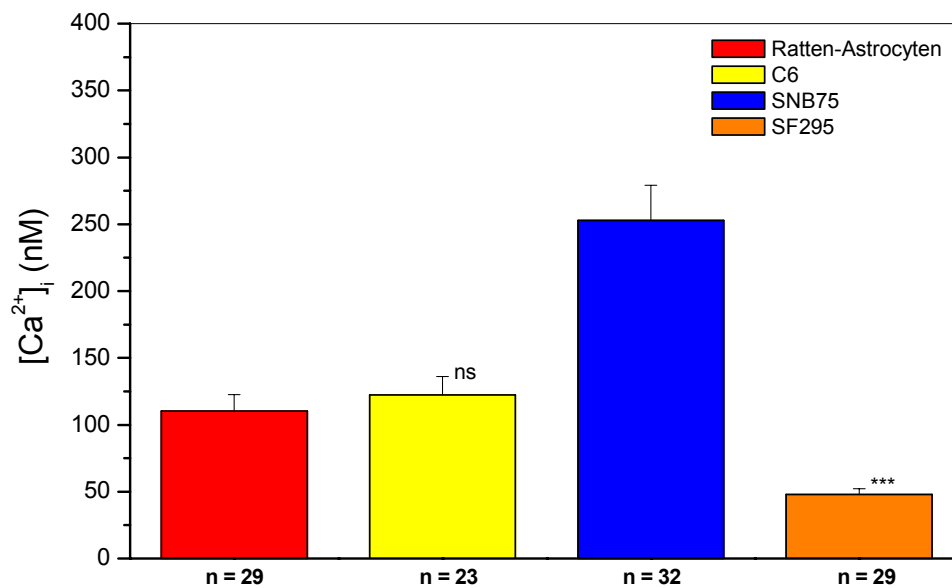
Bezüglich ihrer cNMP-Spiegel verhalten sich die Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 komplementär: Der Gehalt an cGMP liegt in den SF295-Zellen mit ca. 19 pmol cGMP/mg cytosol. Protein um etwa die Hälfte niedriger als der cAMP-Spiegel; in SNB75-Zellen ist er etwa doppelt so hoch als der cAMP-Gehalt (16 pmol cGMP/mg cytosol. Protein). In der Zelllinie SF539 liegen die Spiegel für cAMP und cGMP mit etwa 16 pmol cNMP/mg cytosol. Protein auf einem Niveau. Auch bei der Zelllinie SF268 sind die cAMP- und cGMP-Gehalte vergleichbar (30 pmol cNMP/mg cytosol. Protein).

Die Messung des cGMP-Gehalts in Ratten-Astrocyten und C6-Zellen gestaltete sich schwierig, da die erhaltenen Werte an der Nachweisgrenze des Assays lagen. Somit ist eine Aussage über diese beiden Werte praktisch nicht möglich. Allerdings wird erkennbar, daß der cytosolische cAMP-Gehalt deutlich höher liegt.

### **5.1.3 Ca<sup>2+</sup>-Signalling in Ratten-Astrocyten und C6-Zellen sowie in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295**

Um die verschiedenen Zellsysteme weiter zu charakterisieren, wurden neben den intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegeln Signalling-Aspekte des „second messengers“ Ca<sup>2+</sup> näher untersucht. Es sollte u.a. überprüft werden, ob Zelllinien, welche wie SNB75 eine hohe CaM-abhängige PDE1C-Aktivität aufweisen, im Vergleich zu Zelllinien mit wenig PDE1-Aktivität (z.B. SF295-Zellen) Unterschiede im intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalt und im Ca<sup>2+</sup>-Signalling aufweisen. Dazu wurden die auf Coverslips ausgesäten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen und mittels Video-Imaging untersucht. Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Extrazellulärlösung lag bei 2 mM Ca<sup>2+</sup>.

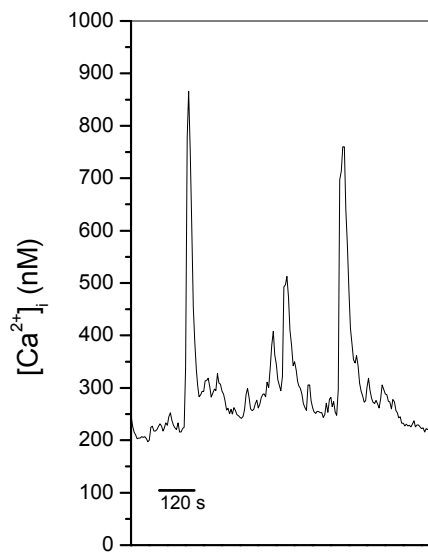
In Abb. 38 ist die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ruhekonzentration in verschiedenen Zellsystemen dargestellt. Dabei zeigt sich bei Ratten-Astrocyten und C6-Zellen kein Unterschied in der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, welche mit etwa 100 nM im beschriebenen Bereich der Ruhe-Calcium-Konzentration von 30-150 nM in Gliazellen liegt (Deitmer et al., 1998). Im Vergleich dazu ist die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in der humanen Glioblastomzelllinie SNB75 mit 250 nM deutlich erhöht, während der Ca<sup>2+</sup>-Spiegel in den SF295-Zellen mit 48 nM im unteren Bereich liegt.



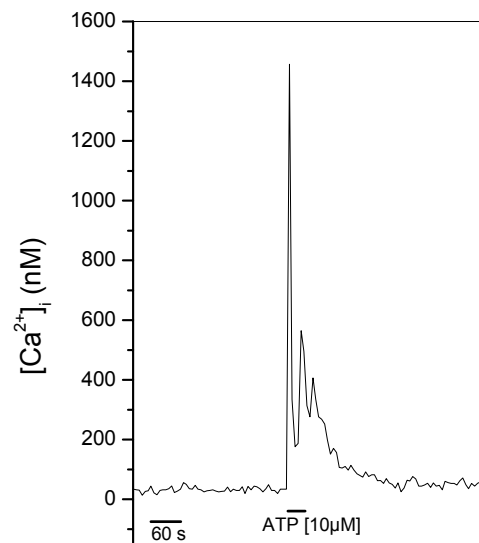
**Abb. 38:** Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den getesteten Zellsystemen. Ratten-Astrocyten/C6: ungepaarter t-Test, P = 0.5074, SNB75/SF295: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur, P < 0.0001, ns: nicht-signifikant, \*\*\*: hoch signifikant

Weiterhin wurden die Zellen mit verschiedenen Agonisten wie ATP [10 µM], Noradrenalin [20 µM] und Phenylephrin [5 µM] superfundiert. (Daten nicht gezeigt). Da die Zellen nur auf ATP reagierten, wurde dieser purinerge Rezeptoragonist für die weiteren Versuche eingesetzt. Dabei zeigten 47 % der Ratten-Astrocyten, 38 % der SNB75-Zellen sowie 5 % der SF295-Zellen eine Antwort auf ATP. C6-Rattenglioblastom-zellen zeigen in Normalsalz-Lösung ein spontanes Oszillieren der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Abb. 39). Diese Oszillationen überlagern einen möglichen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bei ATP-Applikation, so daß für diese Zelllinie keine Angabe über die Reaktion auf den Rezeptoragonisten ATP gemacht werden kann.

Der ATP-induzierte Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> kann in Ratten-Astrocyten auch als oszillierende Antwort erfolgen (Abb. 40).



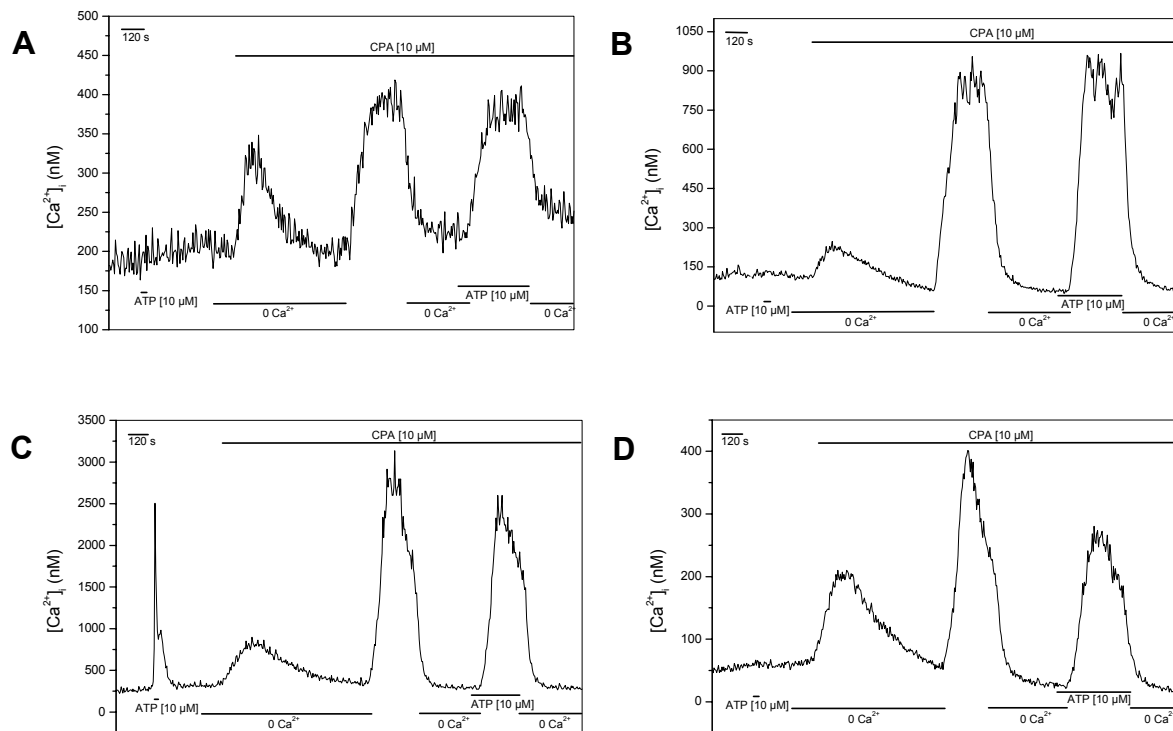
**Abb. 39:** Spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  von C6-Glioblastomzellen in Normalsalzlösung



**Abb. 40:** Triphasische  $Ca^{2+}$ -Antwort von Ratten-Astrocyten auf ATP-Applikation in 2 mM  $Ca^{2+}$

Um eventuelle Unterschiede im  $Ca^{2+}$ -Signalling der verschiedenen Zellsysteme zu erfassen, wurde der Effekt des SERCA-Inhibitors CPA [10  $\mu$ M] sowie des Rezeptoragonisten ATP [10  $\mu$ M] untersucht. In jedem der getesteten Zellsysteme zeigten 100 % der Zellen eine Reaktion auf die CPA-Applikation (Abb. 41). CPA bewirkt in einer  $Ca^{2+}$ -freien Lösung eine transiente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Da CPA mit hoher Spezifität die SERCAs blockiert (Groeger et al., 1988) und so ein Wiederauffüllen der Speicher verhindert (Demaurex et al., 1992), kommt es zu einer fortschreitenden Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher durch „ $Ca^{2+}$ -Leckströme“. Der beobachtete Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Entleerung der CPA-sensitiven  $Ca^{2+}$ -Speicher der Zellen zurückzuführen. Wurde nach Depletion der CPA-sensitiven  $Ca^{2+}$ -Speicher in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung 2 mM  $Ca^{2+}$  zur CPA-haltigen Extrazellularlösung zugegeben, kam es zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Erhöhung erfolgt vermutlich durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über speichergesteuerte  $Ca^{2+}$ -abhängige Kanäle (SOCC) in der Zellmembran. Dasselbe Phänomen beobachtet man bei Co-Applikation von ATP, CPA und 2 mM  $Ca^{2+}$  (Abb. 41).



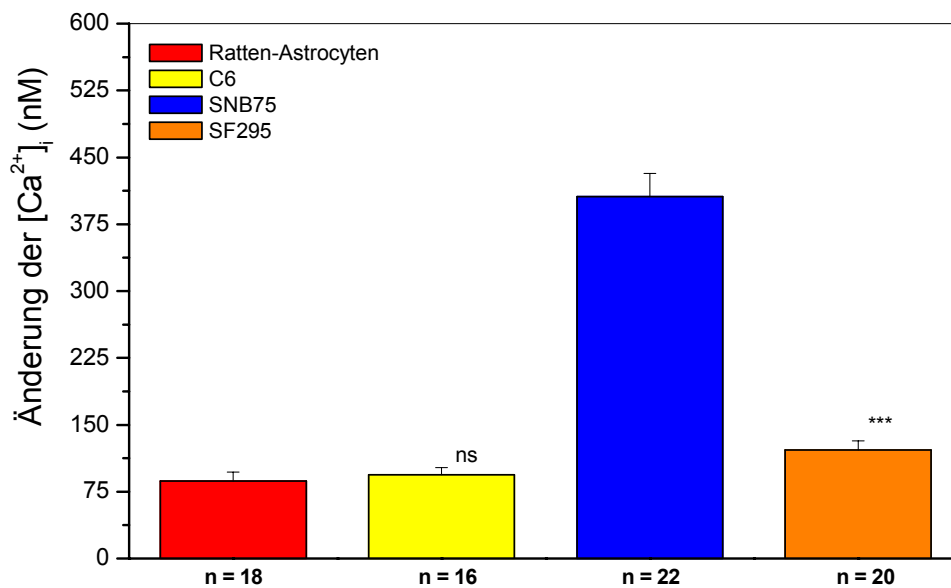


**Abb. 41:** Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Einfluß des purinergen Rezeptoragonisten ATP und des SERCA-Inhibitors CPA in  $Ca^{2+}$ -freier und  $Ca^{2+}$ -haltiger Extrazellulärlösung. Die Ordinaten weisen eine unterschiedliche Skalierung auf. **A:** Ratten-Astrocyten, **B:** C6-Ratten-Glioblastomzellen, **C:** SNB75-Glioblastomzellen, **D:** SF295-Glioblastomzellen

Die Auswertung aller Meßkurven für Ratten-Astrocyten, C6-Glioblastomzellen sowie die humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 ist in Tab. 53 und den Abb. 42 - 45 dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der Einzelmessungen sowie der Standardfehler. Bei Angaben zur Signifikanz der Daten wurden Ratten-Astrocyten mit C6-Rattenglioblastomzellen bzw. die beiden humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 miteinander verglichen.

**Tab. 53:** Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  durch CPA bzw. CPA, ATP und 2 mM  $Ca^{2+}$ . Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts.

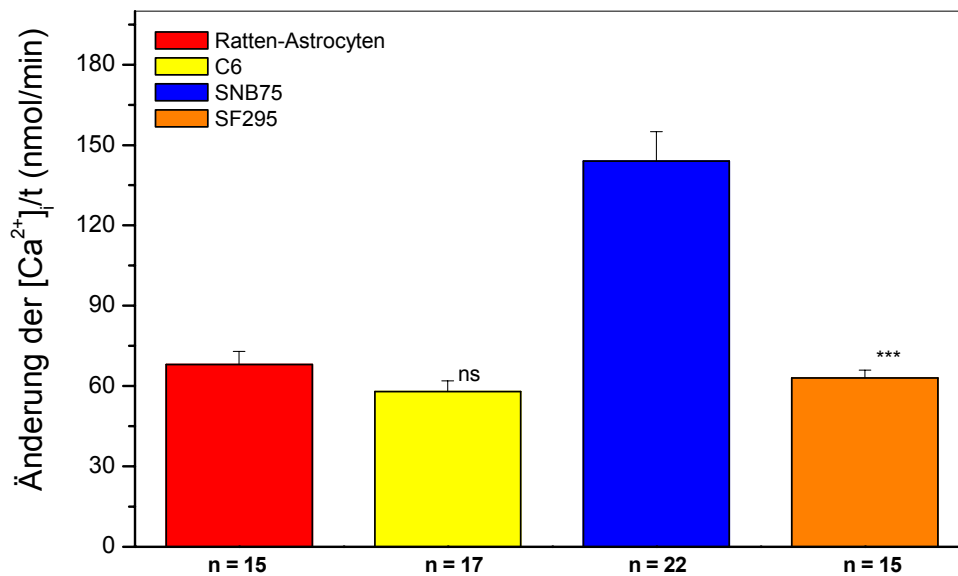
Zellsystem	$[Ca^{2+}]_i$ (nM)	+ CPA (nM)	$\Delta$ CPA (nmol/min)	+ CPA, ATP, 2 mM $Ca^{2+}$ (nM)	$\Delta$ CPA, ATP, 2 mM $Ca^{2+}$ (nmol/min)
<b>Ratten-Astrocyten</b>	110 ± 12	87 ± 10	68 ± 5	70 ± 9	64 ± 3
<b>C6</b>	123 ± 13	94 ± 8	58 ± 4	398 ± 60	270 ± 16
<b>SNB75</b>	253 ± 26	406 ± 26	144 ± 11	1166 ± 363	468 ± 137
<b>SF295</b>	48 ± 4	122 ± 10	63 ± 3	125 ± 24	42 ± 8



**Abb. 42:** Absolute Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von CPA [10  $\mu$ M] in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung. Ratten-Astrocyten/C6: ungepaarter t-Test,  $P = 0.6273$ , SNB75/SF295: ungepaarter t-Test,  $P < 0.0001$ , ns: nicht signifikant; \*\*\*: hoch signifikant

Unter Einfluß von CPA sind die Absolutänderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Ratten-Astrocyten und C6-Zellen nicht signifikant unterschiedlich (durchschnittlich 90 nM), wohingegen die Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in der Zelllinie SNB75 mit 406 nM signifikant höher ist als in den SF295-Zellen (Abb. 42). Dies könnte bedeuten, daß in SNB75-Zellen sehr viel mehr  $Ca^{2+}$  in CPA-sensitiven Speichern vorliegt.

Betrachtet man die Zeitabhängigkeit der Speicherentleerung während der Applikation von CPA (Abb. 43), ist erkennbar, daß die Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen mit derselben Geschwindigkeit von etwa 60-70 nmol/min abläuft. Werden die beiden humanen Glioblastomzelllinien miteinander verglichen, so zeigt sich in den SNB75-Zellen mit 144 nmol/min eine doppelt so schnelle Speicher-Entleerung wie in SF295 mit 63 nmol/min.

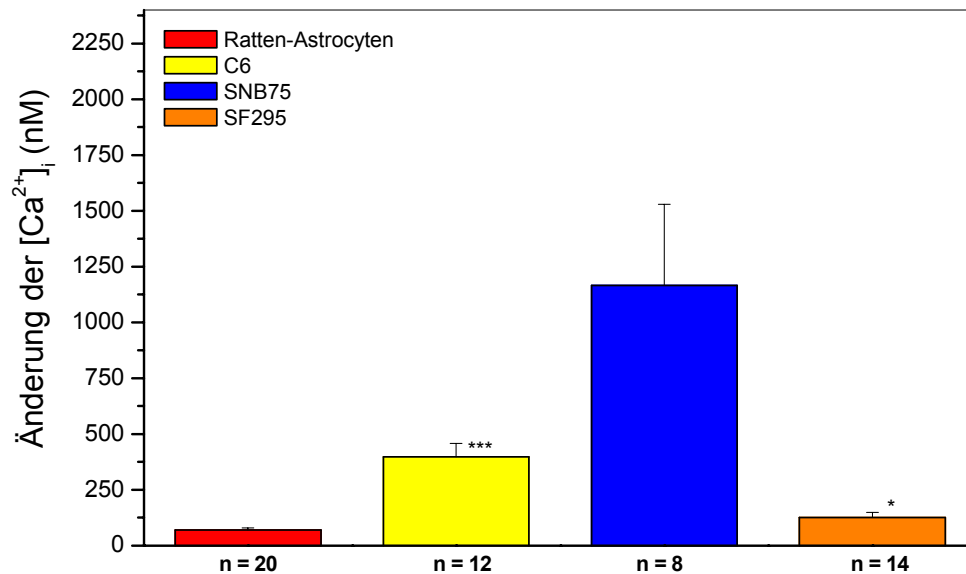


**Abb. 43:** Geschwindigkeit des Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  während Applikation von CPA  $[10 \mu M]$  in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung. Ratten-Astrocyten/C6: ungepaarter t-Test,  $P = 0.1144$ , SNB75/SF295: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur,  $P < 0.0001$ , ns: nicht signifikant; \*\*\*: hoch signifikant

Als weiterer Parameter sollte der speicherabhängige  $Ca^{2+}$ -Einstrom (SOCE) untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach Depletion der CPA-sensitiven  $Ca^{2+}$ -Speicher in  $Ca^{2+}$ -freier Extrazellulärlösung mit  $Ca^{2+}$ -haltiger Lösung superfundiert. Die gleichzeitige Gabe von CPA ist nötig, da Veränderungen der Amplitude des  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch ein Auffüllen der Speicher überlagert werden würden (Wu et al., 1999). Der beobachtete Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beruht vermutlich auf einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der durch Kanäle erfolgt, welche durch die Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher geöffnet wurden (capacitativer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, CCE).

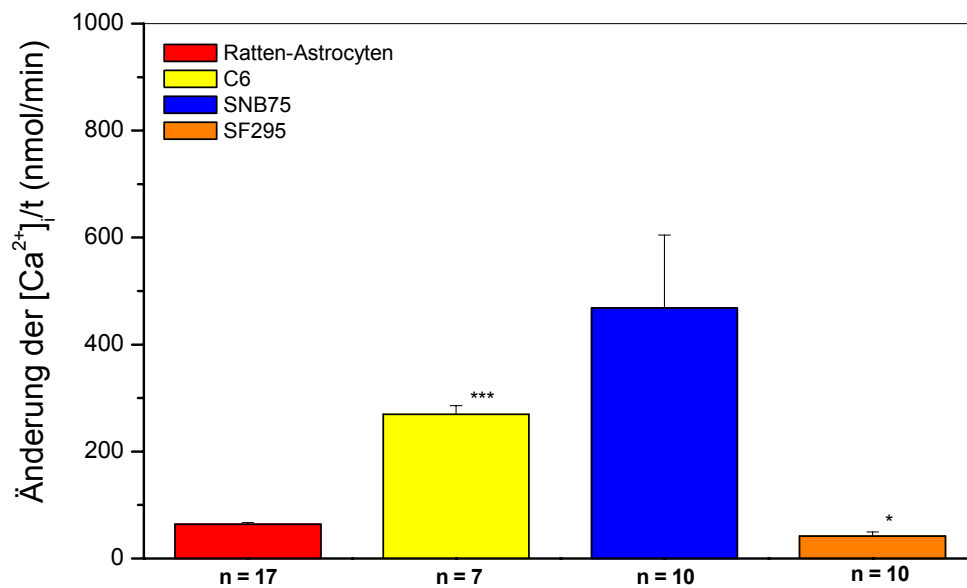
Jung et al. (2000) konnten in Ratten-Astrocyten neben dem CCE auch eine speicherunabhängige, nicht-capacitative Komponente des  $Ca^{2+}$ -Anstiegs nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Anlehnung an das Protokoll von Jung et al. (2000) die Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach CPA-induzierter Speicherentleerung unter Zugabe von  $2mM Ca^{2+}$  in Anwesenheit des Rezeptoragonisten ATP in CPA-haltiger Extrazellulärlösung betrachtet werden (Abb. 41), um evtl. Hinweise auf diese nicht-capacitative Komponente in den untersuchten Zellen zu finden. Bei dem zur Auswertung nötigen Vergleich beider Amplituden des  $Ca^{2+}$ -Einstroms ( $2mM Ca^{2+}$  bzw. ATP +  $2mM Ca^{2+}$ ; Abb. 41) konnten keine deutlichen Unterschiede gemessen werden. Dies könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, daß die Zellen nicht regelmäßig auf Applikation des Rezeptoragonisten reagierten. Im Hinblick auf das Vorhandensein einer nicht-capacitative

Komponente des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms konnte folglich keine Aussage getroffen werden. Da sich die Amplituden-Daten kaum unterschieden, wurden sie für die nachfolgenden Darstellungen in einen Datensatz zusammengefaßt.



**Abb. 44:** Absolute Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach CPA-induzierter Speicherentleerung in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung und Wiedergabe von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in CPA-haltiger Extrazellulärlösung. Ratten-Astrocyten/C6: ungepaarter t-Test,  $P = 0.0002$ , SNB75/SF295: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur,  $P = 0.0241$ , \*: signifikant; \*\*\*: hoch signifikant

Die nach Speicherentleerung ausgelöste Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Extrazellulärlösung ist in C6-Zellen mit 398 nM signifikant höher als in Ratten-Astrocyten (70 nM; Abb. 44). In SNB75-Zellen (1166 nM) ist der Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gegenüber der Zelllinie SF295 mit 125 nM wesentlich höher. Daraus läßt sich folgern, daß der CCE in den Zelllinien C6 und SNB75 wahrscheinlich größer ist als in den Vergleichszellen (Abb. 44).



**Abb. 45:** Geschwindigkeit des Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  nach CPA-induzierter Speicherentleerung in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung und erneuter Zugabe von 2 mM  $Ca^{2+}$  in CPA-haltiger Extrazellulärlösung. Ratten-Astrocyten/C6: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur,  $P < 0.0001$ , SNB75/SF295: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur,  $P = 0.0126$ , \*: signifikant; \*\*\*: hoch signifikant

Die zeitabhängige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 45) aufgrund des CCE ist in C6-Glioblastomzellen mit 270 nmol/min etwa viermal schneller als in Ratten-Astrocyten. In der Zelllinie SNB75 verläuft der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  mit 468 nmol/min um etwa das Zehnfache schneller als in den SF295-Zellen mit 42 nmol/min. Dies weist darauf hin, daß der CCE in C6- und SNB75-Zellen schneller verläuft.

## 5.2 Einfluß von PDE-Inhibitoren auf das Wachstum ausgewählter Zellsysteme

Weiterhin wurden Versuche zur Inhibierung des Wachstums von Ratten-Astrocyten, C6-Glioblastomzellen sowie den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 durch die PDE4-Inhibitoren DC-TA-46 und Rolipram sowie den CaM-Antagonist Calmidazoliumchlorid durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit eines bestimmten PDE-Inhibitors auf das Zellwachstum und der Isoenzymausstattung der entsprechenden Zelllinie besteht. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Hemmstoffe auch in den nicht-malignen Zellen eine Wirkung zeigen. Für DC-TA-46 und Calmidazoliumchlorid konnten bei allen untersuchten Zellsystemen IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung des Zellwachstums ermittelt werden (Tab. 54). Rolipram zeigte in Ratten-Astrocyten und den Zelllinien SNB75 und SF295 bei der Testkonzentration von 100 µM keine Wachstumshemmung; der T/C-Wert lag – unter Berücksichtigung der Fehlerbalken – nahezu unverändert bei ca. 100 % (Tab. 54). Bei den C6-Zellen überlebten ca. 58 % der Zellen bei der eingesetzten Substanzkonzentration.

**Tab. 54:** IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung verschiedener PDE-Inhibitoren an den untersuchten Zellsystemen

Zellsystem	DC-TA-46 (E481) IC <sub>50</sub> [µM]	Calmidazoliumchlorid IC <sub>50</sub> [µM]	Rolipram T/C [%]
Ratten-Astrocyten	1.8 ± 0.3	< 1	84.7 ± 17.8
C6	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	57.6 ± 7.5
SNB75	4.5 ± 0.6	3.0 ± 0.3	104.0 ± 11.0
SF295	3.1 ± 1.0	2.9 ± 0.1	95.8 ± 12.7

Betrachtet man die Ergebnisse für DC-TA-46 (Tab. 54), so zeigt sich Folgendes: Zwischen nicht-malignen Ratten-Astrocyten und malignen C6-Zellen besteht praktisch kein Unterschied im IC<sub>50</sub>-Wert. Dies bedeutet, daß nicht-maligne Zellen von DC-TA-46 genauso stark in ihrem Wachstum gehemmt werden wie die entsprechende Tumorzelllinie. Vergleicht man die für die humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte miteinander, so liegen diese in der gleichen Größenordnung. Da der PDE4-Anteil an der cAMP-spezifischen PDE-Gesamtaktivität in der Zelllinie SF295 höher ist als in SNB75-Zellen (PDE4-Hemmung: 75 % gegenüber 18 %), scheint die PDE4-Expression nur eine geringe Rolle bei der Wachstumshemmung durch den PDE4-Inhibitor DC-TA-46 zu spielen.

Als weitere Testsubstanz wurde Calmidazoliumchlorid eingesetzt. Bei diesem Hemmstoff handelt es sich um einen CaM-Antagonisten, auf welchen alle ZNS-Zelllinien empfindlich reagieren (Tab. 54). Neben der PDE1 werden auch weitere CaM-abhängige Proteine durch den Einsatz von Calmidazoliumchlorid beeinträchtigt. Daraus läßt sich erklären, daß sich die IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung in den Zellsystemen gleichen. Besonders deutlich ist der Effekt von Calmidazoliumchlorid in nicht-malignen Ratten-Astrocyten, deren Zellwachstum schon durch geringste Konzentrationen der Substanz stark gehemmt wird (Tab. 54).

Um den Einfluß verschiedener Substituenten (Benzylamin, Pyrrolidin, Thiazolidin) in den Positionen 4 und 7 des Pteridingrundgerüsts (Abb. 24) auf die Wachstumshemmung zu zeigen, werden die IC<sub>50</sub>-Werte ausgewählter Pteridin-Derivate an C6-Zellen ermittelt (Tab. 55; Strukturformeln sind in Abb. 25 gezeigt). Leitsubstanz ist dabei DC-TA-46 (E481).

**Tab. 55:** IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung verschiedener Pteridin-Derivate an C6-Glioblastomzellen

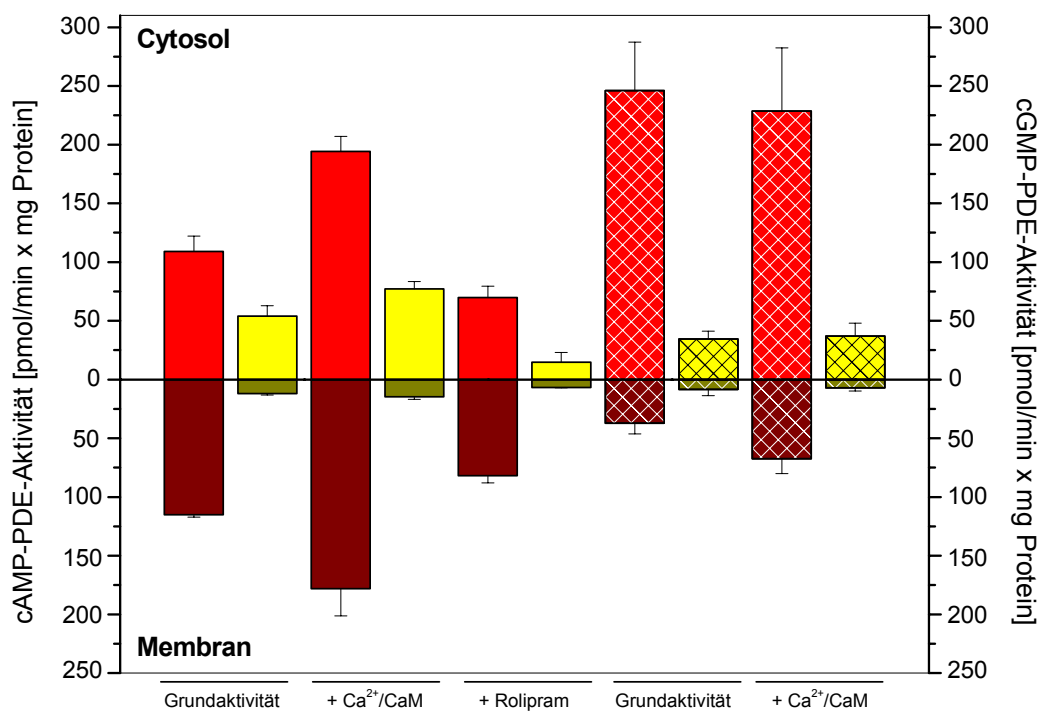
Substanz	IC <sub>50</sub> [µM] an C6
<b>DC-TA-46 (E481)</b>	1.4 ± 0.1
<b>E276</b>	2.6 ± 0.4
<b>E281</b>	2.5 ± 0.9
<b>E288</b>	4.4 ± 0.4
<b>E289</b>	4.7 ± 0.9
<b>E499</b>	3.5 ± 0.5

Bei Betrachten der Daten ist erkennbar, daß die Leitsubstanz DC-TA-46 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1.4 µM die stärkste Hemmwirkung in C6-Zellen aufweist. Die Substanzen E276 und E281 wirken mit IC<sub>50</sub>-Werten von 2.5 µM etwas weniger effektiv als DC-TA-46; als dritte Gruppe sind die Substanzen E288, E289 zu nennen, deren IC<sub>50</sub>-Werte in der gleichen Größenordnung von etwa 4.5 µM liegen. Die Substanz E499 liegt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3.5 µM in ihrer Hemmwirkung zwischen den beiden letztgenannten Gruppen.

### 5.3 Etablierung eines Ratten-Zellmodells zur Untersuchung der Bedeutung der PDE1 in ZNS-Tumorzellen

Für den Vergleich des PDE1-Expressionsmusters in nicht-malignen und malignen Zellen, wurde ein System aus subkultivierten Ratten-Astrocyten und C6-Rattenglioblastomzellen gewählt. Das Ausweichen auf ZNS-Zellen der Ratte war notwendig, da in Deutschland primäre humane Astrocyten, welche als Vergleich zu den humanen Glioblastomzelllinien eingesetzt werden müßten, nicht erhältlich sind.

Zum besseren Vergleich der PDE-Aktivitäten von Ratten-Astrocyten und C6-Zellen, welche in Kapitel 5.1.1 näher erläutert sind, wurden die Daten in einer Grafik (Abb. 46) zusammengefaßt.



**Abb. 46:** cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen

Ratten-Astrocyten	C6-Glioblastomzellen
<span style="color: red;">■</span> cAMP, Cytosol	<span style="color: yellow;">■</span> cAMP, Cytosol
<span style="color: red;">▨</span> cGMP, Cytosol	<span style="color: yellow;">▨</span> cGMP, Cytosol
<span style="color: darkred;">■</span> cAMP, Membran	<span style="color: olive;">■</span> cAMP, Membran
<span style="color: darkred;">▨</span> cGMP, Membran	<span style="color: olive;">▨</span> cGMP, Membran



Verglichen mit Ratten-Astrocyten liegt in den malignen C6-Zellen sowohl die cAMP- als auch die cGMP-PDE-Grundaktivität deutlich niedriger. Dies gilt für beide Kompartimente. Nähere Angaben über die verschiedenen Anteile an  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-stimulierbarer- bzw. Rolipram-hemmbarer PDE-Aktivität in beiden Zellsystemen sind in Kapitel 5.1.1 zu finden. Zusammengefaßt ist festzustellen, daß nicht-maligne Ratten-Astrocyten einen höheren Anteil an CaM-abhängiger PDE1-Aktivität besitzen als C6-Zellen; der Anteil an Rolipram-hemmbarer PDE4-Aktivität ist dagegen in C6-Zellen deutlich größer.

In Ratten-Astrocyten wird die cAMP-Hydrolyse durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM um ca. 82 % im Cytosol und 74 % in der Membran-Fraktion erhöht. In den transformierten C6-Zellen ist die cAMP-Hydrolyse sowohl im Cytosol (61 %) als auch in der Membran (27 %) weniger gut durch CaM stimulierbar. Der Rolipram-hemmbarer-PDE-Anteil liegt in Ratten-Astrocyten zwischen 36% (Cytosol) und 30 % (Membran); in der Glioblastomzelllinie C6 beträgt er 70 % in der Cytosol-Fraktion bzw. 50 % in der Membran-Fraktion.

Um herauszufinden, ob die Differenz in den cAMP- und cGMP-spezifischen PDE-Aktivitäten und der PDE-Isoenzymverteilung auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen (Kulturmedium,  $\text{CO}_2$ -Gehalt) der beiden Zellarten zurückzuführen ist, wurden zunächst die Kulturbedingungen der C6-Zelllinie soweit als möglich an die der Ratten-Astrocyten angepaßt (Kern, 2002). Ein sofortiges Kultivieren der C6-Zellen in dem für Ratten-Astrocyten verwendeten Medium A war nicht möglich, da die Zellen trotz Verwendung Poly-D-Lysin-beschichteter Kulturflaschen abstarben. Ein Absterben von C6-Zellen in serum-freiem DMEM bzw. DMEM mit Zusätzen von Insulin und Transferrin wurde bereits von Pollack et al. (1990) beschrieben. Zur Anpassung des Kulturmediums der C6-Zellen an das der subkultivierten Ratten-Astrocyten wurde deshalb das ursprüngliche DMEM-Kulturmedium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) zusätzlich mit 4.5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-Pyruvat versetzt (das Medium wird im folgenden als DMEM+ bezeichnet). Die FKS-Konzentration wurde dann sukzessive von 10 % auf 0.5 % gesenkt, um den Zellen ein Anpassen an die veränderten Kulturbedingungen zu ermöglichen (Kern, 2002). Die an den niedrigen FKS-Gehalt von 0.5 % in DMEM+ angepaßten C6-Zellen waren nun auch in PDL-beschichteten Kulturflaschen mit Medium A kultivierbar.

Von M. Kern wurden cAMP-PDE-Assays mit den adaptierten C6-Zellen (0.5 % FKS/DMEM+) durchgeführt (Kern, 2002). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß ein Angleichen der Kulturbedingungen den Unterschied in der cytosolischen PDE-Aktivität zwischen Ratten-Astrocyten und C6-Zellen weiter verstärkt. Diese Ergebnisse werden in der Diskussion detaillierter berücksichtigt.

Ein weiterer Unterschied in der Kultivierung der beiden Zellsysteme war die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator. Diese lag für die Kultivierung der Ratten-Astrocyten mit 10 % CO<sub>2</sub> doppelt so hoch wie für die Kultur der C6-Zellen. Eine Kultivierung der C6-Glioblastomzelllinie bei der erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration war aus technischen und logistischen Gründen nicht durchführbar.

Zusätzlich wurde sowohl die Verdopplungszeit der C6-Zellen unter den adaptierten Bedingungen als auch die Verdopplungszeit im ursprünglichen Kulturmedium (DMEM + 10 % FKS, 1 % P/S) ermittelt (Tab. 56).

**Tab. 56:** Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Verdopplungszeit von C6-Glioblastomzellen. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

Zellsystem	Verdopplungszeit [Std]	
<b>C6 (10 % FKS in DMEM)</b>	16.50 ± 5.5	n = 5
<b>C6 (0.5 % FKS in DMEM+)</b>	33.25 ± 9.5	n = 7
<b>C6 (0.5 % FKS in Medium A, PDL)</b>	28.50 ± 3.0	n = 4

Die Verdopplungszeit für die Kultur in DMEM + 10 % FKS entspricht – unter Berücksichtigung des Fehlers – dem Literaturwert von 22.5 Stunden (Vogelbaum et al., 1998). Durch die veränderte Zusammensetzung des Kulturmediums ist die Verdopplungszeit auf das Zweifache verlängert. Es zeigte sich somit, daß die Verdopplungszeit der C6-Zellen durch das adaptierte Medium beeinflusst wird.

Darüber hinaus wurde die Wirkung zweier ausgewählter Pteridin-Derivate (E481 und E281) auf die Hemmung des Zellwachstums unterschiedlich kultivierter C6-Zellen untersucht (Tab. 57).

**Tab. 57:** Einfluß der unterschiedlichen Kulturbedingungen für C6-Glioblastomzellen auf die IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung zweier Pteridin-Derivate

Substanz	IC <sub>50</sub> [µM] (10 % FKS in DMEM)	IC <sub>50</sub> [µM] (0.5 % FKS in DMEM+)
<b>DC-TA-46 (E481)</b>	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1
<b>E281</b>	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.5

Die IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung sind in den unterschiedlich kultivierten C6-Zellen für das jeweilige Pteridin-Derivat praktisch gleich. Im Gegensatz zur Verdopplungszeit wurde die Zellwachstumshemmung nicht von den unterschiedlichen Kulturbedingungen beeinflusst.

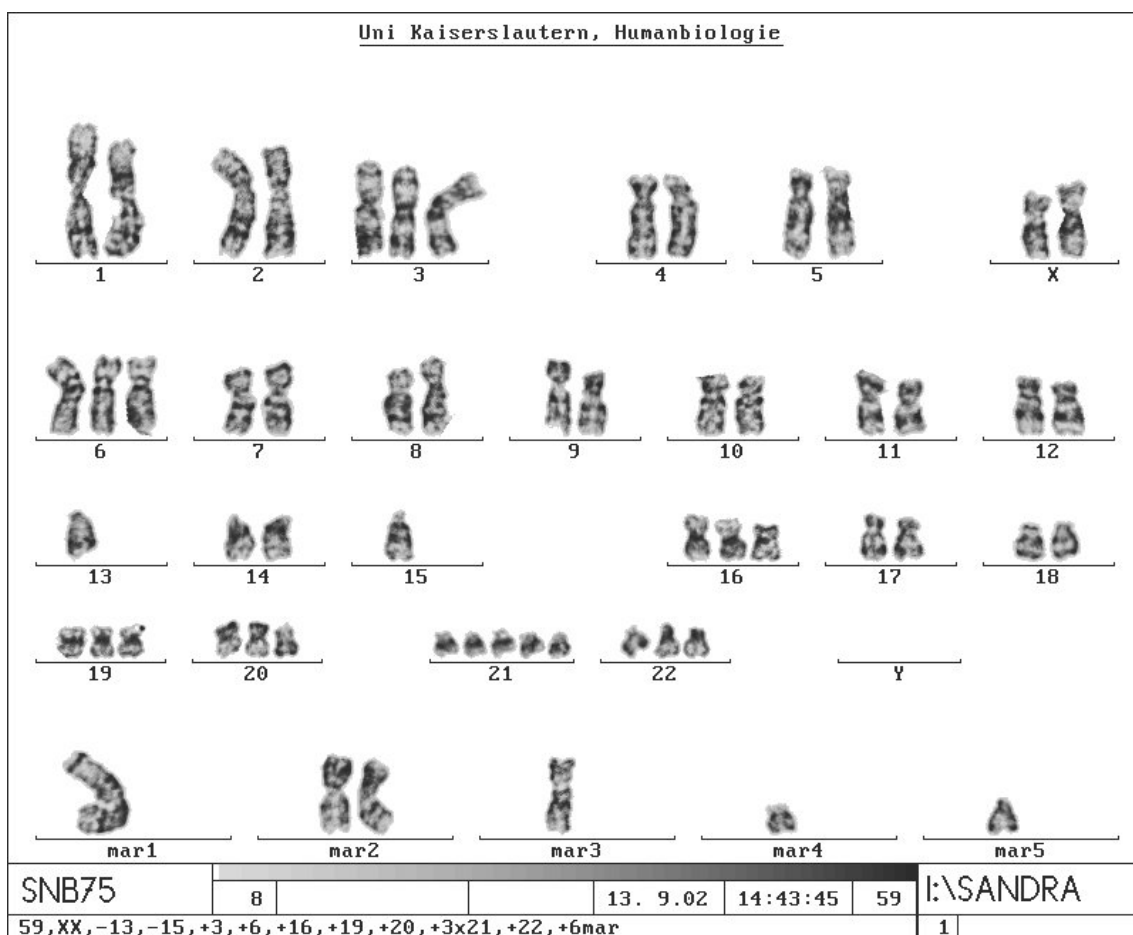
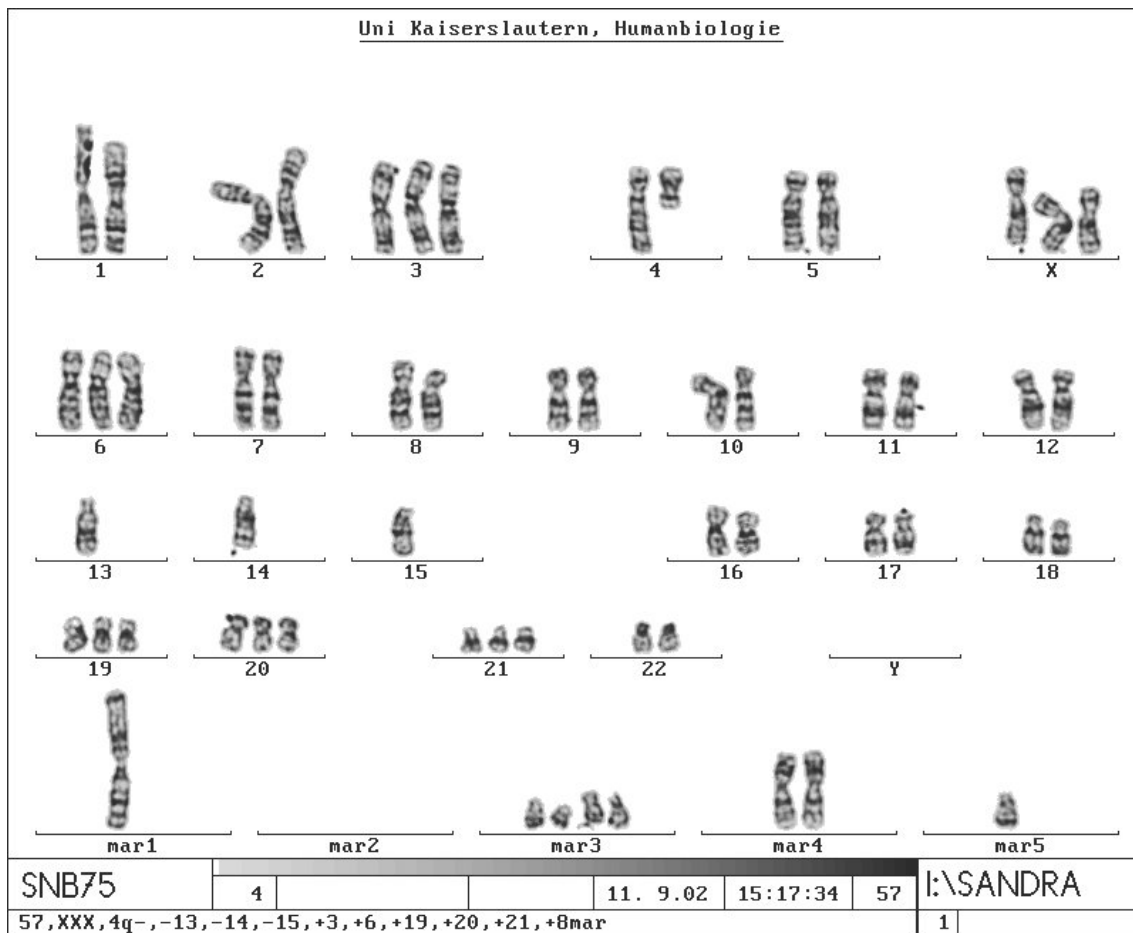
## **5.4 Weitere Charakterisierung der humanen Glioblastomzelllinie SNB75**

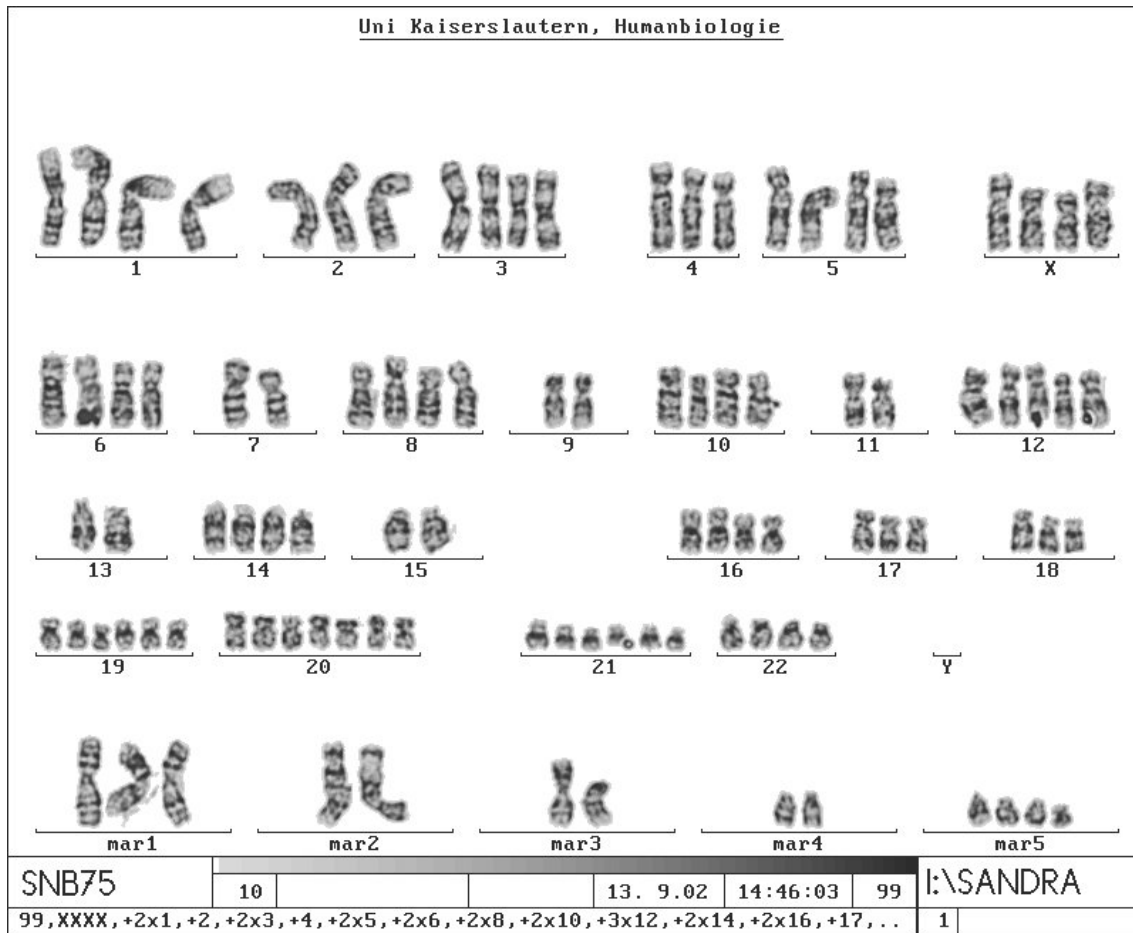
Für die humane Glioblastomzelllinie SNB75 waren keine Detail-Informationen bezüglich Alter des Patienten, Lokalisation des Originaltumors, Etablierung der Zelllinie aus diesem Tumor, Karyotyp sowie Verdopplungszeit der Zelllinie verfügbar. Aus diesem Grund wurde versucht, die letzten beiden Parameter im Rahmen dieser Arbeit zu bestimmen.

### **5.4.1 Karyotyp**

Die Karyotypisierung wurde in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern durchgeführt. Dazu werden die präparierten Chromosomen einer G-Banden-Färbung unterzogen, danach Metaphasen ausgezählt und Karyogramme ermittelt.

Wertet man die Chromosomenzahl der angefärbten Metaphasen ( $n = 29$ ) aus, so kann man zwei Populationen erkennen: eine mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 58 Chromosomen sowie eine zweite Population mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 106 Chromosomen. Dabei hat die Population mit durchschnittlich 58 Chromosomen einen Anteil von 86 % an der Gesamtpopulation.





**Abb. 47:** Drei Karyogramme mit den für SNB75-Zellen (Passage x + 72) typischen Veränderungen in der Chromosomenzahl und charakteristischen Aberrationen. Der erhaltene Karyotyp ist unter der jeweiligen Abbildung vermerkt.

Bei der Auswertung der Karyogramme ist ein bestimmtes Muster in den Chromosomenveränderungen erkennbar. Drei exemplarische Karyogramme sind in Abb. 47 dargestellt. Nach Auswertung aller Karyogramme zeigte sich, daß jedes Chromosom wenigstens einmal von einer Veränderung seiner Anzahl betroffen ist. Dabei treten die folgenden Aberrationen mit besonderer Häufigkeit auf: + 3, + 6, -13, -15, + 19, + 20, + 2 × 21, + 3 × 21 (Tab. 58 ). Darüber hinaus wurden auch Veränderungen in der Gonosomenzahl (+ X) beobachtet. Die durchschnittliche Anzahl der „Marker“ (Chromosomen, die nicht zugeordnet werden können, da sie Deletionen, Translokationen etc. aufweisen) beträgt acht.

**Tab. 58:** Häufigkeit bestimmter Chromosomenaberrationen in den ausgezählten Karyogrammen  
(durchschnittliche Chromosomenzahl: 58)

Chromosomenaberration	Häufigkeit (x von y)
+ 3	6/13
+ 6	9/13
- 9	4/13
- 13	10/13
- 14	5/13
- 15	12/13
+ 17	4/13
+ 19	10/13
+ 20	8/13
+ 2 × 21	7/13
+ 3 × 21	5/13
+ 2 × 22	4/13
+ X	4/13

### 5.4.2 Verdopplungszeit

Als zweiter Parameter zur näheren Charakterisierung der SNB75-Glioblastomzelllinie wurde die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt (Tab. 59). Zusätzlich zum „Standard“-Kulturmedium der Zelllinie (RPMI-Medium + 10 % FKS) wurde ein Medium für humane primäre Astrocyten (AGM-Medium: ABM-Medium + FBS, Progesteron, hEGF, Insulin, Transferrin) eingesetzt. Ähnlich wie bei den ZNS-Zellen der Ratte sollte auch hier der Einfluß von unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Verdopplungszeit erfaßt werden.

**Tab. 59:** Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Verdopplungszeit der humanen Glioblastomzelllinie SNB75. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

Zellsystem	Verdopplungszeit [Std]
SNB75 (RPMI + 10 % FKS)	37.50 ± 7.0      n = 4
SNB75 (AGM-Medium)	32.25 ± 4.5      n = 3

Für die Kultur der Zelllinie SNB75 in RPMI-Medium mit 10 % FKS ergibt sich eine Verdopplungszeit von 37.50 ± 7.0 Stunden. Die für die Kultivierung in AGM-Medium ermittelte Ver-

dopplungszeit von  $32.25 \pm 4.5$  Stunden weicht kaum von der Verdopplungszeit in RPMI-Medium ab. Die unterschiedlichen Medien, die hier getestet wurden, beeinflussen somit nicht die Verdopplungszeit der humanen Glioblastomzelllinie SNB75.

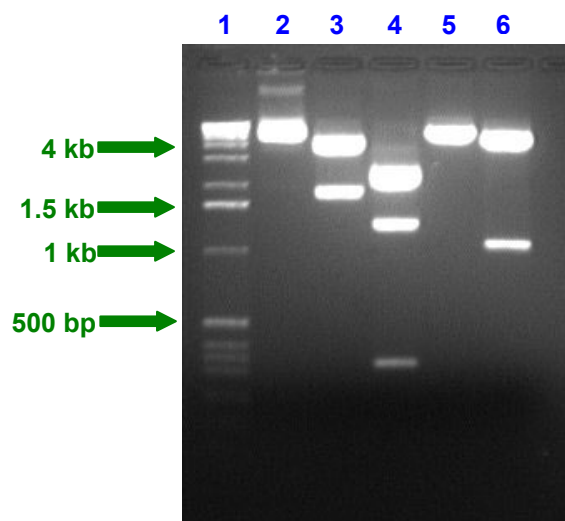
Darüberhinaus wurden von M. Kern cAMP-PDE-Assays an SNB75-Zellen durchgeführt, die in AGM-Medium kultiviert wurden (Kern, 2002). Diese Daten werden in der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt.

## 5.5 Klonierung und Expression einer rekombinanten PDE1C

Um die Eigenschaften des PDE1C-Isoenzymen näher zu charakterisieren, wurde eine rekombinante PDE1C in COS-7-Zellen überexprimiert. Hierfür wurde die cDNA der PDE1C aus humanem Biopsiematerial (TB1365) in den Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a kloniert. Das neue Konstrukt erhielt den Namen pFLAG/1C. Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde ein Kontrollverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt (Abb. 48).

- 1 1kb-Marker
- 2 pFLAG/1C (unverdaut)
- 3 pFLAG/1C (*EcoRI*, *Bam*HI)
- 4 pFLAG/1C (*Pvu*II)
- 5 pFLAG/1C (*Hind*III)
- 6 pFLAG/1C (*EcoRI*, *Pst*I)

Enzym	Fragmente [bp]
<i>EcoRI</i> , <i>Bam</i> HI	4617, 1923
<i>Pvu</i> II	2515, 2377, 1327, 321
<i>Hind</i> III	6540
<i>EcoRI</i> , <i>Pst</i> I	5456, 1084



**Abb. 48:** Restriktionsverdau von pFLAG/1C (1 % Agarose)

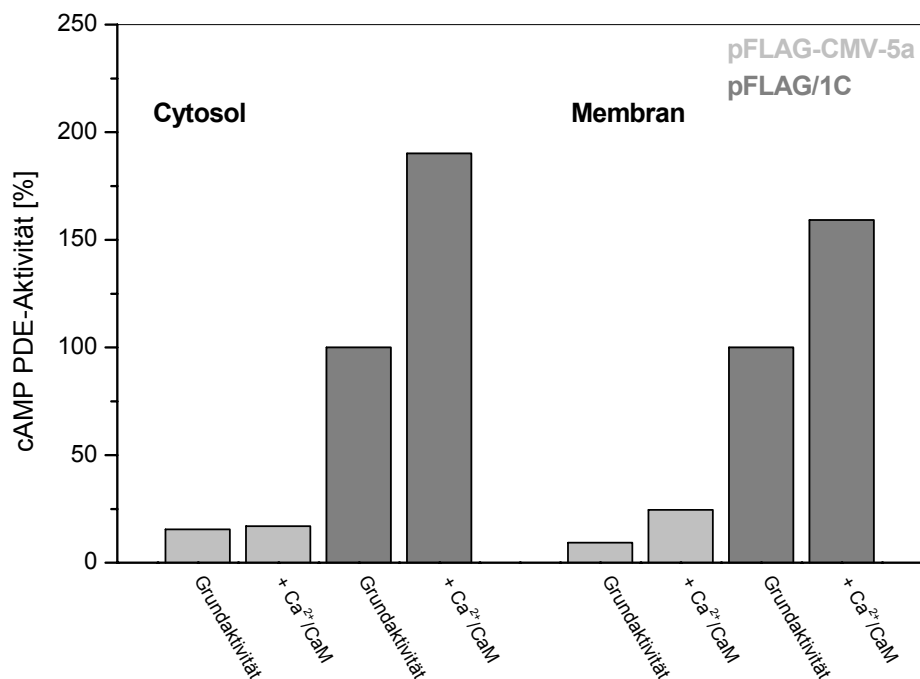
Es ist deutlich zu erkennen, daß alle erwarteten Bandenmuster für die einzelnen Restriktionsenzyme vorhanden sind. Damit kann davon ausgegangen werden, daß die PDE1C im Vektor pFLAG-CMV-5a komplett inseriert ist.

Zur Überexpression der PDE1C aus humanem Biopsiegewebe wurden COS-7-Zellen mit dem Konstrukt pFLAG/1C transient überexprimiert. Diese Zellen eignen sich für die Expression

rekombinanter PDE1C, da ihre intrinsische PDE1-Aktivität sehr niedrig ist (Yan et al., 1995; Yan et al., 1996). Die PDE-Aktivität in beiden Kompartimenten von pFLAG-CMV-5a und pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen ist nachfolgend vergleichend dargestellt (Tab. 60 und Abb. 49). Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit der PDE1-Aktivität wird  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  eingesetzt. Da es sich hier um exemplarische Meßdaten handelt, sind keine Fehlerbalken angegeben. Die Grundaktivität der Zellen mit rekombinanter PDE1C wird auf 100 % gesetzt; alle weiteren Angaben werden auf diesen Wert bezogen.

**Tab. 60:** Exemplarische Daten für die cAMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von pFLAG-CMV-5a und pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen.

Cytosol-Fraktion	Grundaktivität [pmol cAMP/ min · mg Protein]	Grundaktivität [%]	+ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [pmol cAMP/ min · mg Protein]	$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ - Steigerung [%]
pFLAG-CMV-5a	42.8	15.5	46.9	17.0
pFLAG/1C	276.1	<b>100</b>	525.1	190.2
Membran-Fraktion	Grundaktivität [pmol cAMP/ min · mg Protein]	Grundaktivität [%]	+ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [pmol cAMP/ min · mg Protein]	$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ - Steigerung [%]
pFLAG-CMV-5a	8.8	9.4	23.2	24.6
pFLAG/1C	94.4	<b>100</b>	150.3	159.2



**Abb. 49:** Exemplarische Bestimmung der cAMP-spezifischen PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von pFLAG-CMV-5a und pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen.



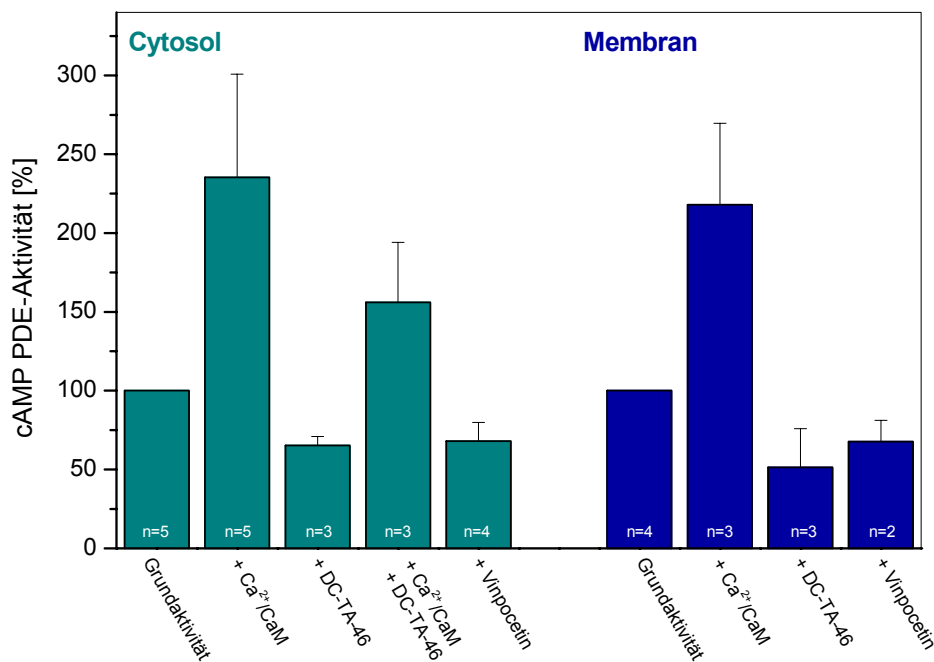
Es wird deutlich, daß die cAMP-spezifische PDE-Aktivität der pFLAG-CMV-5a-transfizierten COS-7-Zellen („mock“-transfizierte Kontrollzellen) in beiden Kompartimenten mit 15 bzw. 9 % deutlich unter dem Wert für die mit pFLAG/1C transfizierten Zellen liegt. Darüber hinaus sind die „mock“-transfizierten Zellen nur in sehr geringem Maße durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  stimulierbar. Die PDE-Aktivität der rekombinanten PDE1C wurde durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  um etwa das Doppelte gesteigert. Dies bedeutet, daß die Überexpression (~ Faktor 7) der rekombinanten PDE1C erfolgreich war.

Weiterhin sollte die Wirkung verschiedener Modulatoren auf die cAMP-Hydrolyse der rekombinanten PDE1C mit Hilfe des cAMP-PDE-Assays untersucht werden. Als Modulatoren wurden  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , DC-TA-46 [10  $\mu\text{M}$ ] und Vinpocetin [100  $\mu\text{M}$ ] eingesetzt. Die Werte wurden gegen die PDE-Grundaktivität der COS-7-Zellen korrigiert. Bei der Auswertung der Daten für die rekombinante PDE1C zeigte sich, daß u.a. aufgrund der schwankenden Transfektionseffizienz die Werte für die PDE-Aktivität in [pmol cAMP/min  $\times$  Protein] stark variieren. Die Grundaktivität der überexprimierten PDE1C wurde daher auf 100 % gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse unter Modulatorwirkung zu erreichen. Die in Gegenwart eines Modulators erhaltenen Werte wurden dazu in Relation gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte mehrerer Dreifachbestimmungen pro Einzelexperiment sowie der mittlere absolute Fehler des Mittelwerts. Die prozentuale Aktivierung bzw. Hemmung der PDE-Aktivität wurde für jedes Einzelexperiment ermittelt und anschließend der Mittelwert errechnet (Tab. 61).

**Tab. 61:** cAMP- spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

pFLAG/1C	cAMP-PDE Grundaktivität [%]	+ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ Aktivität in [%]	+ DC-TA-46 Aktivität in [%]	+ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/$ + DC-TA-46 Aktivität in [%]	+ Vinpocetin Aktivität in [%]
<b>Cytosol-Fraktion</b>	100	235.3 $\pm$ 65.5	65.2 $\pm$ 5.7	156.1 $\pm$ 38.1	77.0 $\pm$ 11.9
<b>Membran-Fraktion</b>	100	218.0 $\pm$ 51.6	51.3 $\pm$ 24.5	n.b.	67.7 $\pm$ 13.4

n.b.: nicht bestimmt



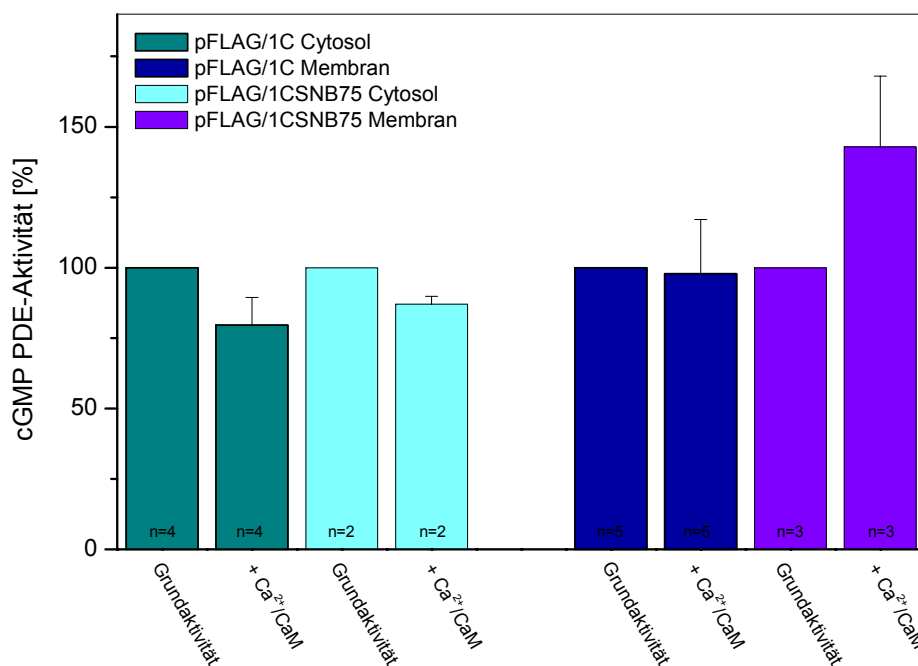
**Abb. 50:** cAMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen unter Einfluß verschiedener Modulatoren.

Durch Zusatz von Ca<sup>2+</sup>/CaM kann die cAMP-spezifische PDE-Aktivität der überexprimierten PDE1C um etwa das 1.5-fache gesteigert werden (Abb. 50). DC-TA-46 hemmt die PDE-Aktivität um 35 % (Cytosol) bzw. 49 % (Membran). Verglichen mit DC-TA-46 zeigt Vinpocetin mit 23 % bzw. 32 % eine etwas geringere Hemmung der PDE1C-Aktivität (Abb. 50). Im Vergleich zu Ca<sup>2+</sup>/CaM alleine (+ 130 %) hemmt eine Co-Inkubation von Ca<sup>2+</sup>/CaM und DC-TA-46 die stimulierte PDE1C (+ 50 %).

Da es sich bei den PDE1-Isoenzymen um Dual-Substrat-PDEs handelt, wurde zusätzlich zur cAMP-Hydrolyse auch die cGMP-spezifische PDE-Aktivität der rekombinanten PDE1C betrachtet. In den Versuchen zur cGMP-Hydrolyse der überexprimierten PDE1C wurde nur die Stimulierbarkeit durch Ca<sup>2+</sup>/CaM untersucht. Neben dem rekombinanten Protein aus der Biopsieprobe TB1365 (pFLAG/1C) wurde auch die rekombinante PDE1C aus der humanen Glioblastomzelllinie SNB75 (pFLAG/1CSNB75, Knerr, 2001) eingesetzt (Tab. 62, Abb. 51).

**Tab. 62:** cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion pFLAG/1C- bzw. pFLAG/1CSNB75-transfizierter COS-7-Zellen. Angegeben sind der Mittelwert und die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert.

Cytosol-Fraktion	cGMP-PDE Grundaktivität [%]	+ Ca <sup>2+</sup> /CaM Aktivität in [%]
pFLAG/1C	100	79.6 ± 9.8
pFLAG/1CSNB75	100	87.1 ± 2.7
Membran-Fraktion	cGMP-PDE Grundaktivität [%]	+ Ca <sup>2+</sup> /CaM Aktivität in [%]
pFLAG/1C	100	97.8 ± 19.4
pFLAG/1CSNB75	100	142.9 ± 18.5



**Abb. 51:** cGMP-spezifische PDE-Aktivität in Cytosol- und Membran-Fraktion von pFLAG/1C- und pFLAG/1CSNB75-transfizierten COS-7-Zellen.

Beide überexprimierten PDE1C-Isoenzyme verhalten sich bezüglich des Modulators Ca<sup>2+</sup>/CaM im cGMP-PDE-Assay ähnlich (Abb. 51): In der Cytosol-Fraktion konnte keine Stimulierung der PDE-Aktivität durch Ca<sup>2+</sup>/CaM gemessen werden. Allein in der Membran-Fraktion der pFLAG/1CSNB75-transfizierten COS-7-Zellen ist eine geringe Stimulierung der cGMP-PDE1C-Aktivität durch Ca<sup>2+</sup>/CaM erkennbar (+ 40 %). Obwohl gezeigt werden konnte, daß beide rekombinanten PDE1C-Isoenzyme überexprimiert werden und sowohl cAMP

und cGMP hydrolysieren, konnte nur im cAMP-PDE-Assay eine deutliche Stimulierung der PDE-Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM gemessen werden (vorliegende Arbeit; Knerr, 2001).

---

## 6 Diskussion

### 6.1 PDE-Aktivität und „second messenger“-Spiegel

#### PDE-Aktivität und cNMP-Spiegel in humanen Glioblastomzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 bezüglich ihrer PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung näher charakterisiert.

In den SNB75-Zellen zeigte sich eine cytosolische PDE-Aktivität von 138 pmol cAMP/min  $\times$  mg Protein, welche durch den PDE1-Aktivator  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM um 250 % gesteigert werden konnte. Bei der durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM stimulierbaren PDE-Aktivität muß es sich um die PDE1C-Isoform handeln, da die beiden anderen PDE1-Isoformen PDE1A und PDE1B bei der im Assay gewählten Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  cAMP wenig aktiv sind (Zhao et al., 1997). Darüber hinaus wurden in der Zelllinie SNB75 für die PDE1A und 1B keine Transkripte bei der RT-PCR erhalten (G. Pahlke, persönliche Mitteilung). Der durch Hemmung mit Rolipram ermittelte PDE4-Anteil an der cAMP-spezifischen PDE-Aktivität beträgt 18 %. Im Vergleich dazu zeigt die Zelllinie SF295 mit 60 pmol cAMP/min  $\times$  min Protein eine wesentlich geringere PDE-Grundaktivität, welche durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM nicht stimuliert werden kann. Dies bedeutet, daß in SF295 keine PDE1-Aktivität vorliegt. Der PDE4-Anteil beträgt 75 % der Grundaktivität. Im cGMP-PDE-Assay zeigen die SF295-Zellen eine höhere Grundaktivität als die Zelllinie SNB75. Die cGMP-spezifische PDE-Aktivität ist in beiden Zelllinien nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM stimulierbar. Die erhaltenen Ergebnisse werden durch weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe gestützt. So zeigten Vergleichsdaten von S. Anbari ebenfalls eine Stimulierung der PDE1C in SNB75-Zellen (+ 94 %) bei gleichzeitig niedriger PDE4-Aktivität (9 % der Grundaktivität) (Anbari, 2001). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten konnte jedoch im cGMP-Assay eine Stimulierung der PDE1C um 79 % detektiert werden (Anbari, 2001). Eventuell sind die CaM-Charge und das Alter der CaM-Lösung für eine deutliche Stimulierung der PDE1-Aktivität kritisch, da S. Knerr bei ihren Untersuchungen zur cAMP-Hydrolyse nach Wechsel zu einer neuen CaM-Charge die Steigerungsraten verdoppeln konnte (Knerr, 2001). Gegen diese Vermutung spricht allerdings, daß es mit allen verwendeten CaM-Lösungen möglich war, die cAMP-spezifische PDE-Aktivität zu stimulieren, während kein Effekt auf die cGMP-Hydrolyse zu beobachten war. Die Gründe für die „Nicht-Stimulierung“ der cGMP-Hydrolyse durch CaM sind noch nicht geklärt.

Die unterschiedliche PDE1- und PDE4-Isoenzymverteilung in den Zelllinien SNB75 und SF295 wird auch durch Untersuchungen mit semi-quantitativer Real-Time TaqMan PCR un-

---

terstützt (G. Pahlke, unveröffentlichte Ergebnisse). Es wurden sogenannte Delta  $C_T$ -Werte ermittelt, wobei ein niedriger Delta  $C_T$ -Wert einer hohen Expression entspricht. Die Glioblastomzelllinie SNB75 weist einen Delta  $C_T$ -Wert von  $5.29 \pm 0.58$  für PDE1C und einen Delta  $C_T$ -Wert von  $10.97 \pm 0.86$  für PDE4B auf. Im Gegensatz dazu zeigen die SF295-Zellen einen Delta  $C_T$ -Wert von  $9.67 \pm 0.23$  für PDE1C und einen Delta  $C_T$ -Wert von  $11.16 \pm 0.67$  für PDE4B auf. Zwar ist in SF295 auf mRNA-Ebene ein Transkript für PDE1C detektierbar, was jedoch nicht zwangsläufig zu einem funktionsfähigen Enzym translatiert werden muß. Die Daten weisen eher auf ein unterschiedliches, anscheinend reziprokes Expressionsmuster der PDE1- und PDE4-Isoenzyme in den untersuchten Zelllinien hin. Ang und Antoni (2002) konnten eine solche reziproke Regulation von PDE1- und PDE4-Isoenzymen bereits in der neuroendocrinen Zelllinie AtT20 nachweisen.

Die Zelllinie SNB75 weist von allen untersuchten humanen Glioblastomzelllinien den niedrigsten Gehalt an cAMP auf. Dies korreliert mit den Untersuchungen zur cAMP-Hydrolyse, in welchen die Zelllinie SNB75 die höchste cAMP-spezifische PDE-Aktivität zeigt. Im Gegensatz dazu besitzt die Zelllinie SF295 einen sehr hohen cAMP-Gehalt bei gleichzeitig niedriger cAMP-spezifischer PDE-Aktivität. Bei den Zelllinien SF539 und SF268 ist keine deutliche Korrelation zwischen cAMP-Gehalt und cAMP-Hydrolyse zu erkennen.

Obwohl die Zelllinien SNB75 und SF295 vergleichbare Spiegel an cGMP aufweisen, ist die cGMP-Hydrolyse in SNB75-Zellen um etwa die Hälfte niedriger als in SF295-Zellen. Auch hier scheint es keine deutliche Korrelation zwischen cGMP-Gehalt und cGMP-spezifischer PDE-Aktivität zu geben.

Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, daß die Versuche zur cAMP- bzw. cGMP-Hydrolyse bei einer Substratkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  cNMP durchgeführt wurden. Folglich wurden im cNMP-PDE-Assay nur die PDE-Isoenzyme erfaßt, die bei dieser Substratkonzentration aktiv sind. Im Gegensatz dazu spiegelt die Bestimmung des cNMP-Gehalts den Zustand der Zelle ohne „Limitierung“ der Substratkonzentration wider. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß bei den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen nicht immer eine Korrelation der cNMP-Gehalte und der PDE-Aktivität erkennbar ist.

### **PDE-Aktivität und cNMP-Spiegel in Ratten-Astrocyten und C6-Glioblastomzellen**

Bei Betrachtung der PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten im Vergleich zur PDE-Aktivität in der Ratten-Glioblastomzelllinie C6 ist ein Unterschied in der Verteilung der PDE1- und PDE4-Isoenzymaktivitäten feststellbar. Untersuchungen mittels qualitativer RT-PCR unterstützten diese Beobachtung. So zeigen Ratten-Astrocyten, deren PDE-Aktivität gut durch

---

Ca<sup>2+</sup>/CaM stimuliert werden kann, Signale für alle drei PDE1-Subtypen auf mRNA-Ebene. Im Gegensatz dazu findet sich für C6-Zellen nur ein DNA-Fragment für das Transkript der PDE1C-mRNA. Bei einem Vergleich der Bandenstärke der für alle PDE4-Isoformen erhaltenen DNA-Fragmente in Relation zu einer gleich stark ausgeprägten  $\beta$ -Actin-Bande zeigen Ratten-Astrocyten die stärkste Bandenintensität für die PDE4B-Isoform; in C6-Zellen ist das DNA-Fragment für PDE4D am deutlichsten. Die Expression des PDE4C-Subtyps wurde nicht überprüft, da diese PDE4-Isoform im Gehirn nur in geringen Mengen vorkommt (Engels et al., 1995). Zum Nachweis einer Überexpression von PDE1C in Ratten-Astrocyten und zur Untersuchung der PDE4-Isoenzymverteilung in beiden Zellsystemen wären semi-quantitative RT-PCR-Versuche (Real-Time TaqMan PCR) hilfreich bzw. Western Blot-Analysen nötig. Versuche mittels Western Blot erwiesen sich allerdings aufgrund mangelnder Sensitivität der käuflich erwerbbarer Antikörper als wenig aufschlußreich (Kern, 2002).

Im Ratten-Zellsystem wurde im cGMP-PDE-Assay ebenfalls nur eine geringe bzw. keine Stimulierung der cGMP-Hydrolyse durch Ca<sup>2+</sup>/CaM detektiert werden. Dies wurde auch schon von Brostrom und Wolff (1974) beobachtet, welche zeigen konnten, daß die Hydrolyse-Rate von cAMP in C6-Zell-Homogenaten durch Zugabe von CaM bei den getesteten Substratkonzentrationen von 0.25  $\mu$ M und 25  $\mu$ M weitaus stärker stimuliert werden konnte als die cGMP-Hydrolyse.

Eine vertiefende Diskussion der Daten zur PDE1- und PDE4-Ausstattung der Ratten-Astrocyten und der C6-Zellen findet bei der Diskussion des Ratten-Zellmodells (siehe 6.3) statt.

Die Ratten-Astrocyten und die Zelllinie C6 zeigen vergleichbare intrazelluläre cAMP- bzw. cGMP-Level. Dabei liegt der cAMP-Gehalt mit 20 pmol/mg cytosol. Protein deutlich über jenem von cGMP, welcher sich mit 2.6-3.8 pmol/mg cytosol. Protein bereits an der Nachweisgrenze des Assays befindet. Untersuchungen an Hippocampus-Schnitten in Lewis-Ratten zeigen vergleichbare Spiegel an cyclischen Nucleotiden. Für cAMP wurde ein Gehalt von  $37.94 \pm 4.94$  pmol/mg Protein, für cGMP ein Wert von  $1.77 \pm 0.17$  pmol/mg Protein beschrieben (van Staveren et al., 2001).

Sowohl bei Ratten-Astrocyten als auch bei C6-Zellen ist keine deutliche Korrelation zwischen dem cAMP- bzw. cGMP-Gehalt und der cAMP- bzw. cGMP-Hydrolyse zu erkennen. Wie bereits bei den Untersuchungen der humanen Glioblastomzelllinien diskutiert, wurden auch hier im PDE-Assay nur die PDE-Isoenzyme erfaßt, die bei einer Substratkonzentration von 1  $\mu$ M aktiv sind, wohingegen bei der Bestimmung des cNMP-Gehalts die Substratkonzentration

---

on nicht limitiert war. Dies könnte auch im Ratten-Zellsystem der mögliche Grund dafür sein, daß keine Korrelation zwischen den cNMP-Gehalten und der PDE-Aktivität erkennbar ist.

### **Ca<sup>2+</sup>-Signalling in den untersuchten Zellsystemen**

Neben den cyclischen Nucleotiden cAMP und cGMP ist Ca<sup>2+</sup> ein weiterer wichtiger „second messenger“ in der Zelle. Oft sind die cNMP-Signalwege eng mit dem Ca<sup>2+</sup>-Signalling verknüpft (Abb. 17). Ca<sup>2+</sup> vermag in Verbindung mit CaM – neben vielen anderen zellulären Proteinen – auch die für die vorliegende Arbeit wichtige PDE1 zu stimulieren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die verschiedenen Zellen/Zelllinien auch auf Unterschiede bezüglich ihrer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel und Ca<sup>2+</sup>-Transienten untersucht.

Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> liegt in Ratten-Astrocyten und der C6-Glioblastomzelllinie mit 110 bzw. 122 nM in der gleichen Größenordnung. Vergleichbare Werte sind auch in der Literatur beschrieben. So ist für Ratten-Astrocyten eine [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von 95 ± 5 nM (Wu et al., 1999) angegeben, für C6-Zellen liegen die Werte für [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zwischen 75 und 200 nM (Lin et al., 1992).

Im Unterschied zu Ratten-Astrocyten zeigten C6-Zellen bei 2 mM Ca<sup>2+</sup> in der Extrazellulärlösung in den meisten Fällen spontane Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen. Diese zeigen meist – wie die C6-Zelllinie in dieser Untersuchung – eine konstante Basislinie, welche periodisch von Ca<sup>2+</sup>-Spikes unterbrochen wird (Berridge und Irvine, 1989). Oft hören die Oszillationen abrupt auf, wenn das externe Ca<sup>2+</sup> entfernt wird (Jacob et al., 1988). Dies konnte auch bei der hier untersuchten Zelllinie C6 beobachtet werden.

Der deutliche Unterschied in der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der beiden humanen Glioblastomzelllinien SNB75 (250 nM) und SF295 (48 nM) könnte sich möglicherweise auf die PDE-Aktivität der Zelllinien auswirken: In SNB75-Zellen könnte ein positives „feedback“-System vorliegen, in welchem die hohe cAMP-spezifische PDE-Aktivität einerseits zu einem niedrigen cAMP-Spiegel führt; andererseits könnte durch die hohe [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> eine Rekrutierung von Ca<sup>2+</sup> an Calmodulin erfolgen, was dann eine Aktivierung der CaM-sensitiven PDE1C nach sich zieht. Ein komplementäres Verhalten zeigt die Zelllinie SF295, welche neben einem hohen Gehalt an cAMP eine geringe [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sowie keine meßbare CaM-abhängige PDE1-Aktivität besitzt.

Da die Mehrheit der Zellen/Zelllinien hauptsächlich auf ATP reagierte, wurde dieser Rezeptoragonist für die Versuchsreihe verwendet. Die Wirkung von ATP wird über Rezeptoren der P<sub>2y</sub>-Familie vermittelt, welche ihrerseits das Signal über IP<sub>3</sub> weiterleiten (Centemeri et al., 1997, Abb. 3). Über den Botenstoff IP<sub>3</sub> bewirkt ATP nachfolgend eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Ho et al., 1995). Das aus den Speichern



---

mobilisierte  $\text{Ca}^{2+}$  ist nach Bindung an CaM in der Lage, diverse Proteine, wie z.B. die CaM-PDE, zu aktivieren (Simmons und Murphy, 1995).

Durch Applikation des Mykotoxins CPA kommt es zu einer fortschreitenden Entleerung der CPA-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des endoplasmatischen Retikulums, da CPA die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des endoplasmatischen und sarcoplasmatischen Retikulums (SERCAs) mit hoher Spezifität blockiert (Groeger et al., 1988) und so das Wiederauffüllen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher verhindert wird (Demaurex et al., 1992). Werden die Meßdaten zur absoluten und zeitabhängigen Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei CPA-Applikation betrachtet, ist zwischen Ratten-Astrocyten und C6-Zellen kein Unterschied in der Speicherkapazität und Geschwindigkeit der Speicherentleerung erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigt die humane Glioblastomzelllinie SNB75 einen größeren CPA-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und eine schnellere Speicherentleerung als die Zelllinie SF295. Neben der Speicherkapazität des ER sollte der capacitative Calcium-Einstrom (CCE) nach Speicherentleerung in den verschiedenen Zellsystemen näher charakterisiert werden. In Anwesenheit von CPA konnte nach Zugabe von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in die Extrazellulär-Lösung ein starker  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg beobachtet werden, welcher mit dem gängigen Modell des CCE in Einklang steht (Jung et al., 2000). Das bei der Messung erhaltene  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateau spiegelt vermutlich einen Gleichgewichtszustand zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch den CCE sowie die Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsproteine und  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen bzw. -Austauscher in der Zellmembran wider (Wu et al., 1999).

Bei Untersuchung des CCE zeigten sich Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling von Ratten-Astrocyten und C6-Zellen. Im Vergleich zu Ratten-Astrocyten ist die vermutlich durch den CCE ausgelöste Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  – sowohl bei der absoluten als auch bei der zeitabhängigen Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  – in der Ratten-Glioblastomzelllinie C6 signifikant größer und schneller. Das Vorhandensein eines CCE in C6-Zellen wurde bereits von Chiono et al. (1995) und Wu et al. (1997) beschrieben. Interessanterweise besitzen C6-Zellen mehrere Typen an intrazellulären Speichern, welche auch unterschiedlich reguliert werden. So konnte durch Versuche an der Zelllinie C6 gezeigt werden, daß ATP die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Thapsigargin-sensitiven Speichern bewirkt (die Wirkung von Thapsigargin ist vergleichbar mit der Wirkung von CPA). Eine Depletion dieser Speicher bewirkt einen CCE. Eine Applikation von LPA (Lysophosphatidylsäure) bewirkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Thapsigargin-insensitiven Speichern, welche nicht mit dem CCE gekoppelt sind. (Hildebrandt und Hildebrandt, 1997)

Bei einem Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten des SOCE in den beiden humanen Glioblastomzelllinien zeigen die SNB75-Zellen einen größeren und schnelleren CCE als die Zelllinie SF295. Bisher gibt es in der Literatur zu beiden Zelllinien keine Angaben bezüglich ihres  $\text{Ca}^{2+}$ -

---

Signallings. Ob weitere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wie in C6-Zellen vorkommen, ist demnach nicht bekannt.

Aufgrund der unbekanntenen Rezeptorausstattung der Zellen ist die Interpretation der Daten erschwert. Es wird angenommen, daß Gliazellen aus verschiedenen Hirnregionen ein unterschiedliches Expressionsmuster bezüglich ihrer für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wichtigen Rezeptoren aufweisen (Deitmer et al., 1998). Dieses Rezeptormuster kann aufgrund von Kulturbedingungen oder Kulturdauer variieren (Shao und McCarthy, 1994; Kastiris und McCarthy, 1993).

## **6.2 Einfluß von PDE-Inhibitoren auf das Wachstums ausgewählter Zellsysteme**

An Ratten-Astrocyten, der Ratten-Glioblastomzelllinie C6 sowie den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 werden Versuche zum wachstumshemmenden Potential ausgewählter Substanzen durchgeführt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um die PDE4-Hemmstoffe DC-TA-46 und Rolipram sowie den CaM-Antagonisten Calmidazoliumchlorid. Letzterer wird oft als PDE1-Inhibitor eingesetzt, hat darüber hinaus aber aufgrund seiner Wirkungsweise als CaM-Antagonist (Kakkar et al., 1999) auch Einfluß auf andere CaM-abhängige Proteine.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte des Pteridin-Derivats DC-TA-46 liegen in Ratten-Astrocyten und C6 Zellen zwischen 1 und 2  $\mu\text{M}$ ; in den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 mit 4.5  $\mu\text{M}$  bzw. 3  $\mu\text{M}$  geringfügig darüber. Ein Zusammenhang zwischen der PDE1 bzw. PDE4-Isoenzymausstattung und dem wachstumshemmenden Potential von DC-TA-46 ist nicht erkennbar. Wäre dies der Fall, müßten die Unterschiede in der Wachstumshemmung zwischen Ratten-Astrocyten und C6-Zellen bzw. zwischen den humanen Glioblastomzelllinien SNB75 (hohe PDE1-Aktivität) und SF295 (hohe PDE4-Aktivität) größer sein. Drees et al. (1993) zeigten an der murinen B16 Melanomzelllinie, daß DC-TA-46 mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4.3  $\mu\text{M}$  auch die PDE1 hemmt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von DC-TA-46 für die PDE4-Hemmung liegt bei 0.03  $\mu\text{M}$ . Die Selektivität von DC-TA-46 gegenüber der PDE4-Familie ist also um Faktor 140 höher als zu PDE1-Isoenzymen. Allerdings weist das als PDE1-Hemmstoff angesehene 8-MeOM-IBMX mit 60  $\mu\text{M}$  einen 15-fach höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert als DC-TA-46 für die PDE1-Hemmung in B16 Melanomzellen auf. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von DC-TA-46 für die Wachstumshemmung an dieser Zelllinie wird mit  $\sim 2 \mu\text{M}$  angegeben; für 8-MeOM-IBMX ließ sich bis zu

---

einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine deutliche Wachstumshemmung ermitteln. (Drees et al., 1993)

Calmidazoliumchlorid zeigt in allen getesteten Tumorzelllinien  $\text{IC}_{50}$ -Werte von 2-3  $\mu\text{M}$ . Dies könnte darauf beruhen, daß Calmidazoliumchlorid als CaM-Antagonist wirkt und demzufolge – neben einer Hemmung der PDE1 – auch Effekte auf andere durch CaM regulierte Proteine hat. In den nicht-malignen Ratten-Astrocyten zeigt sich bei Inkubation mit Calmidazoliumchlorid ein extrem niedriger  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $< 1\mu\text{M}$ . Die Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Calmidazoliumchlorid könnten mit der relativen CaM-Konzentration in subkultivierten Ratten-Astrocyten einerseits und den immortalen Zelllinien andererseits einhergehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es von Vorteil, den CaM-Gehalt der Zellen zu untersuchen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

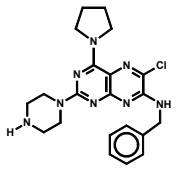
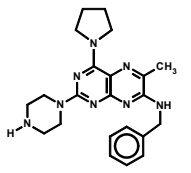
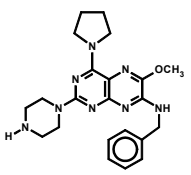
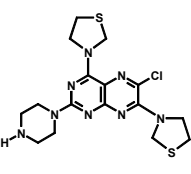
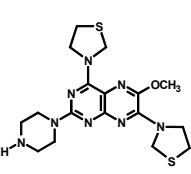
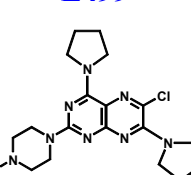
Der selektive PDE4-Inhibitor Rolipram, ein Pyrrolidinon-Derivat, wird in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  getestet. Ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert kann nicht bestimmt werden, da die Substanz in den getesteten Zellen – mit Ausnahme der Zelllinie C6 – keine inhibitorische Wirkung zeigt. Dies konnte bereits für andere Tumorzellen wie die humane Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L gezeigt werden (Wagner et al., 2002).

Ein möglicher Grund für die Unterschiede von Substanzhemmwirkungen zwischen ZNS-Tumorzellen und anderen Tumorzelllinien wie z.B. der humanen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L (Tab. 63) bzw. zwischen den ZNS-Zellen untereinander könnte die Verfügbarkeit (d.h. Aufnahme und Metabolismus) der entsprechenden Substanz sein. Daten unserer Arbeitsgruppe an LXFL529L-Zellen zeigen, daß Rolipram an aufgearbeiteten Zellpräparationen bzw. an tumor-isolierter PDE4 eine sehr gute PDE4-Hemmung zeigt. Werden jedoch intakte Zellen mit Rolipram inkubiert, ist keine effektive PDE-Hemmung detektierbar. Versuche mittels HPLC/MS/MS zeigten, daß Rolipram nur zu einem geringen Anteil in LXFL529L-Zellen aufgenommen wird. (Wagner et al., 2002) DC-TA-46 hingegen wird gut von den LXFL529L-Zellen aufgenommen (Marko et al., 2002). Untersuchungen, wie effektiv die Substanzen DC-TA-46, Calmidazoliumchlorid und Rolipram in die verschiedenen ZNS-Zellsysteme aufgenommen werden, wären eine sinnvolle Ergänzung zu den Versuchen zur Wachstumshemmung. Es scheint allerdings sehr unwahrscheinlich, daß eine Substanz wie Rolipram nicht in die ZNS-Zellen gelangt, da es sich hierbei um eine neuroaktive Verbindung handelt, welche in klinischen Studien als Anti-Depressivum eingesetzt wurde (Cherry und Davies, 1999).

Weiterhin soll die Struktur-Wirkungsbeziehung der Pteridin-Derivate DC-TA-46 (E481), E276, E281, E288, E289 und E499 an der Zelllinie C6 näher untersucht werden. Die Substan-

zen wurden von K.-H. Merz und Mitarbeitern im Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand (Universität Kaiserslautern) synthetisiert.

**Tab. 63:** IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung verschiedener Pteridin-Derivate in C6-Glioblastomzellen und LXFL529L-Zellen (<sup>1</sup> Merz et al, 1998; <sup>2</sup> Müller, 2000; <sup>3</sup> eigene Daten).

Substanz	IC <sub>50</sub> [µM] an C6	IC <sub>50</sub> [µM] an LXFL529L
<b>DC-TA-46 (E481)</b> 	1.4 ± 0.04	2.3 ± 0.3 <sup>1)</sup>
<b>E276</b> 	2.6 ± 0.4	4.1 ± 0.3 <sup>2)</sup>
<b>E281</b> 	2.5 ± 0.9	3.5 ± 0.2 <sup>2)</sup>
<b>E288</b> 	4.4 ± 0.4	6.4 ± 0.6 <sup>3)</sup>
<b>E289</b> 	4.7 ± 0.9	6.7 ± 1.7 <sup>3)</sup>
<b>E499</b> 	3.5 ± 0.5	4.7 ± 0.4 <sup>3)</sup>

---

Bei Betrachtung der Daten (Tab. 63) wird deutlich, daß in C6-Zellen die Leitsubstanz DC-TA-46 die beste Wachstumshemmung aufweist ( $IC_{50} = 1.4 \pm 0.1 \mu M$ ). Der  $IC_{50}$ -Wert für die PDE-Hemmung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen liegt mit  $4.0 \pm 0.9 \mu M$  etwas höher (die Daten wurden von J. Schröder im Rahmen eines Forschungspraktikums ermittelt). Die Wechselwirkungen der Pteridine mit Enzymen wie z.B. der PDE wurden bei K.-H. Merz diskutiert (Merz, 1999). Es ist noch offen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen PDE4-Hemmung und Wachstumshemmung bei den hier getesteten Substanzen und Zellsystemen besteht.

Die Substanzen E276 und E281 besitzen statt eines Chloratoms in 6-Position eine Methyl- bzw. Methoxy-Gruppe. Sie wirken mit  $IC_{50}$ -Werten um  $2.5 \mu M$  (C6-Zellen) etwas weniger effektiv als DC-TA-46 (Tab. 63). Es ließe sich diskutieren, daß der -M-Effekt des Chlors durch einen +M-Effekt der Methyl- bzw. Methoxy-Gruppe ersetzt wird, welche Elektronen ins Ringsystem „schieben“.

Die Substanzen E288 und E289 besitzen in 4- und 7-Position je einen Thiazolidinring. Im Vergleich zur Leitsubstanz DC-TA-46 liegt in E288 und E289 in Position 7 ein kleinerer Ring (Thiazolidin < Benzylamin); in Position 4 ein Ring mit mehr Raumbedarf (S > N) vor. Dies weist darauf hin, daß die Ringgröße des Substituenten in Anwesenheit von Heteroatomen einen deutlich modulatorischen Effekt ausübt, da die Substanzen E288 und E289 mit  $IC_{50}$ -Werten um  $4.5 \mu M$  (C6-Zelllinie) etwas weniger effektiv als DC-TA-46 hemmen (Tab. 63). Der Substituent in 6-Position (Chlor bzw. eine Methoxy-Gruppe) hat bei diesen Derivaten praktisch keinen Einfluß auf die Wachstumshemmung, da die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen E288 und E289 praktisch gleich sind.

Im Unterschied zu DC-TA-46 besitzt E499 in 7-Position statt eines Benzylaminrings einen Pyrrolidinring. Die inhibitorischen Eigenschaften von E499 auf das Wachstum der Glioblastomzelllinie C6 liegen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $3.5 \mu M$  (Tab. 63) etwas schlechter als bei der Leitsubstanz DC-TA-46, aber besser als bei den beiden Derivaten, welche Thiazolidin-Substituenten tragen (E288, E289). Der  $IC_{50}$ -Wert für die PDE-Hemmung nach Vorinkubation der Zellen mit E499 wurde von J. Schröder auf  $5.9 \pm 0.8 \mu M$  bestimmt.

Bei den hier getesteten Substanzen wurden nur Veränderungen im Bereich der Positionen 4 und 7 des Pteridinrings im Vergleich zur Leitsubstanz DC-TA-46 durchgeführt. Dies scheint der Grund dafür zu sein, daß die Daten für die Wachstumshemmung in C6-Zellen relativ nahe beieinander liegen. Dasselbe Ergebnis erhält man mit vergleichbaren Versuchen an der humanen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L. Vergleicht man die Daten der beiden Zelllinien miteinander (Tab. 63), scheinen DC-TA-46 und seine Strukturanaloga in der ZNS-Zelllinie C6

---

eine etwas effektivere Hemmwirkung als in der Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L aufzuweisen.

### **6.3 Etablierung eines Ratten-Zellmodells zur Untersuchung der Bedeutung der PDE1 im ZNS**

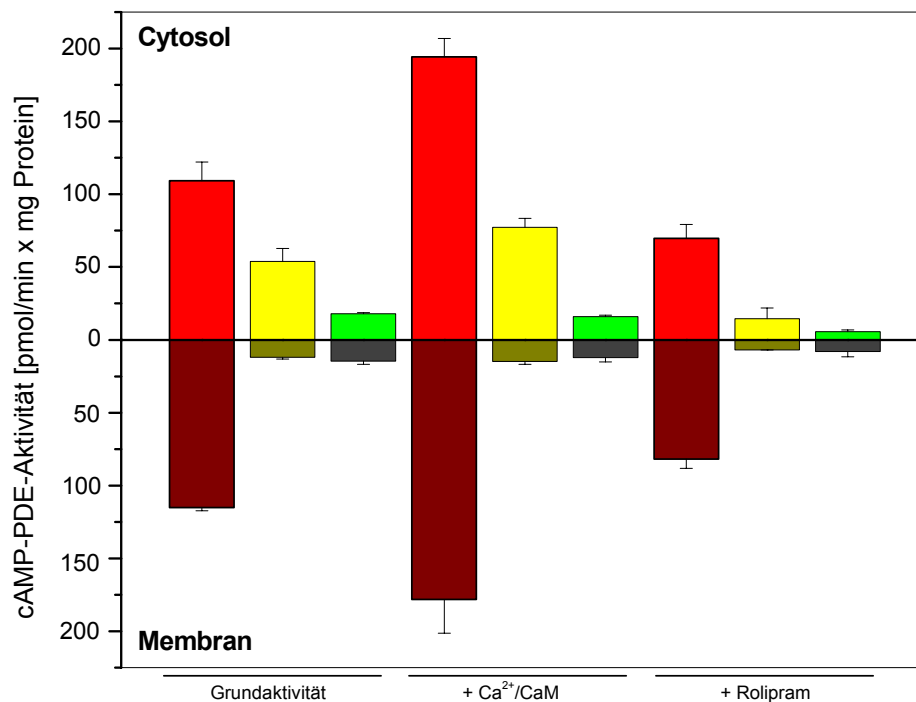
Marko et al. (1998) fanden bei Untersuchungen an primären Keratinocyten, zwei Papillomazelllinien und der hoch-malignen Spindelzellkarzinomzelllinie CarB zwischen den verschiedenen Zelllinien gleichsinnige Unterschiede in Verdopplungszeit, cAMP-Spiegel und PDE-Aktivität. So stieg die PDE-Aktivität, insbesondere die der PDE4-Isoform, mit zunehmender Malignität der getesteten Zelllinien an; entsprechend verringerten sich die cAMP-Spiegel. Auch die Verdopplungszeit nahm mit höherem Malignitätsgrad der Zellen ab und war in den hoch-malignen CarB-Zellen am geringsten.

Um die PDE-Isoenzymexpression in nicht-malignen und malignen ZNS-Zellen zu vergleichen, wurden subkultivierte Ratten-Astrocyten und C6-Rattenglioblastomzellen gewählt (beide Zellsysteme stammen aus Wistar-Ratten). Das „Ausweichen“ auf Rattenzellen war nötig, da in Deutschland primäre humanen Astrocyten als Vergleich zu den humanen Glioblastomzelllinien nicht erhältlich sind. Zur Zeit ist allerdings noch kein Tiermodell etabliert, welches die Situation in hochmalignen humanen Gehirntumoren (anaplastisches Astrocytom, multiformes Glioblastom) exakt simuliert (Barth, 1998). Gerade der Einsatz der Rattenglioblastomzelllinie C6 ist limitiert, da diese Zelllinie in „outbred“ Wistar-Ratten etabliert wurde. Es gibt deshalb keinen syngenen Rattenstamm, in welchem die Zellen zu einem Tumor weitergezüchtet werden können, da C6-Zellen in allogenen Wirtstieren immunogen wirken können (Barth, 1998).

Im Vergleich zu den malignen C6-Zellen ist die cAMP- und cGMP-spezifische PDE-Aktivität in subkultivierten Ratten-Astrocyten deutlich höher. Zusätzlich weisen Ratten-Astrocyten eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-stimulierbare PDE1-Aktivität auf. In der Zelllinie C6 hingegen ist der PDE4-Anteil höher. Beide Zelltypen weisen denselben Gehalt an den cyclischen Nucleotiden cAMP und cGMP auf. Die Beobachtung, daß im ZNS die PDE-Gesamtaktivität mit der Malignisierung der Zellen sinkt und die cAMP-Spiegel unverändert bleiben, steht im Gegensatz zu den von Marko et al. (1998) gezeigten Ergebnissen an Keratinocyten. Lee und Hait (1985) fanden im Rattenhirn eine cAMP-spezifische PDE-Aktivität von 70 nmol/min  $\times$  mg Protein, welche deutlich über der cAMP-spezifischen PDE-Aktivität von 1 nmol/min  $\times$  mg Protein in C6-Zellen lag. Eine reziproke Regulation von PDE1- und PDE4-Isoenzymen, wie sie für das

Modellsystem aus Ratten-Astrocyten und C6-Zellen vermutet werden kann, wurde bereits von Ang und Antoni (2002) für die neuroendocrine Zelllinie AtT20 beschrieben.

Um nun zu überprüfen, ob die große Differenz in den PDE-Grundaktivitäten und die unterschiedliche PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung auf die verschiedenen Kulturbedingungen oder die maligne Transformation der Zellen zurückzuführen ist, wurden zunächst die Kulturbedingungen der C6-Zelllinie soweit wie möglich an die der Ratten-Astrocyten angepaßt (Kern, 2002; siehe 5.3). Zur Angleichung der Kulturbedingungen der C6-Zellen wurde deshalb das gängige DMEM-Kulturmedium mit 4.5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-Pyruvat versetzt (DMEM+). In der Literatur ist beschrieben, daß die Adaption von C6-Zellen an serumfreies Medium nicht gelingt (Wolfe et al., 1980). Um eine Kultivierung der C6-Zellen noch zu ermöglichen, wurde dem Medium eine Restkonzentration von 0.5 % FKS zugesetzt. Mit den so adaptierten C6 Zellen wurde dann ein cAMP-PDE-Assay durchgeführt (Kern, 2002). Dabei zeigte sich, daß ein Angleichen der Kulturbedingungen den Unterschied in der cytosolischen PDE-Aktivität zwischen Ratten-Astrocyten und C6-Zellen eher noch weiter verstärkt (Abb. 52). So sinkt in der Cytosol-Fraktion die cAMP-spezifische PDE-Aktivität der adaptierten C6-Zellen auf  $\frac{1}{3}$  der Aktivität von C6-Zellen im gängigen Kulturmedium. Darüber hinaus zeigt sich in den adaptierten C6-Zellen ein Verlust der Stimulierbarkeit durch  $Ca^{2+}$ /CaM. Im Gegensatz dazu bleibt der Anteil an Rolipram-hemmbarer PDE4-Aktivität mit 67 % unverändert. Unterschiede in den PDE-Aktivitäten der Membran-Fraktion sind kaum erkennbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die cAMP-hydrolysierende Aktivität sehr niedrig ist und eventuell schon an der Nachweisgrenze des PDE-Assays liegt. (Kern, 2002)



**Abb. 52:** cAMP-spezifische PDE-Aktivität in Ratten-Astrocyten, C6-Zellen (10 % FKS/DMEM) und in 0.5% FKS/DMEM+ adaptierten C6-Zellen. Die Daten der adaptierten C6-Zellen wurden von M. Kern im Rahmen ihrer Diplomarbeit ermittelt (Kern, 2002).

Ratten-Astrocyten	C6-Zellen	C6-Zellen (adaptiert)
<span style="color: red;">■</span> Cytosol	<span style="color: yellow;">■</span> Cytosol	<span style="color: green;">■</span> Cytosol
<span style="color: darkred;">■</span> Membran	<span style="color: olive;">■</span> Membran	<span style="color: darkgrey;">■</span> Membran

Aufgrund der veränderten PDE-Aktivitäten wurde weiterhin versucht, mögliche Verschiebungen in der PDE1- und PDE4-Expression in Ratten-Astrocyten und den unterschiedlich kultivierten C6-Zellen mittels semi-quantitativer Western Blot-Analyse herauszufinden (Kern, 2002). Aufgrund mangelnder Sensitivität der Antikörper führten diese Versuche zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur PDE-Aktivität und -Expression wurde die Verdopplungszeit der verschiedenen kultivierten C6-Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, daß die Verdopplungszeit der C6-Zellen durch das an die Astrocyten-Kultur adaptierte Medium beeinflusst wird. Die ermittelte Verdopplungszeit für die Zelllinie C6 im ursprünglichen Kulturmedium entspricht in etwa dem Literaturwert von 22.5 Stunden (Vogelbaum et al., 1998). Durch Veränderung der Zusammensetzung des Kulturmediums ist die Verdopplungszeit um ca. den Faktor zwei verlängert. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich bei Versuchen, in welchen die



Glioblastomzelllinie C62B an serum-freie Bedingungen angepaßt wurde (Coyle, 1995). Dabei sank die Verdopplungsrate in den adaptierten Zellen ebenfalls um 50 %. Darüber hinaus war auch eine Veränderung im Phänotyp der Zellen erkennbar, welche durch spezifische Färbemethoden nachgewiesen werden konnte. (Coyle, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß die Morphologie und die Proliferationszeit von Astroglia in Primärkulturen und Zelllinien vom Serumstatus im Kulturmedium beeinflußt wird (Coyle, 1995). Die an das Ratten-Astrocyten-Medium adaptierte Tumorzelllinie C6 proliferiert weniger stark als die nicht-malignen Ratten-Astrocyten (Beobachtung). Die Verdopplungszeit von subkultivierten Ratten-Astrocyten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da die hier verwendete Versuchsdurchführung für diese Zellen nicht anwendbar war. Unter anderem könnten Astrocyten aufgrund der PDL-Beschichtung der Kulturflaschen nicht mehr vollständig vom Boden abgelöst werden, was für eine zuverlässige Auswertung essentiell ist. In einem funktionstüchtigen Modell sollte die Tumorzelllinie jedoch, entsprechend zur *in vivo*-Situation, schneller proliferieren als das nicht-maligne Pendant. Auch das für die primären Astrocyten verwendete Proliferationsmedium (Medium A) zeigte keine wachstumssteigernden Effekte auf die C6-Zellen, wie die Verdopplungszeiten in unterschiedlichem Kulturmedium zeigen. Die Ratten-Astrocyten im vorliegenden Modell werden aus sehr jungen Tieren (p0-p3, p: postnatales Alter) präpariert. Zum Zeitpunkt der Geburt sind diese Zellen noch sehr teilungsaktiv (Hertz et al., 1998) und spiegeln somit nicht die Adultsituation wider, die für ein aussagekräftiges Modell gelten sollte. Es ist zwar möglich, Astrocyten-Kulturen aus adulten Tieren zu präparieren, allerdings treten dann die gleichen Limitierungen wie bei der Präparation aus neugeborenen Tieren auf, da diese Kulturen nur aus unreifen Astrocyten-Stammzellen generiert werden können (Norton und Farooq, 1989).

Ein weiteres Problem des „Ratten-Zellmodells“, welches auch zur Untersuchung möglicher Therapieformen wie z.B. Hemmung des Tumorwachstums durch bestimmte Substanzen dienen sollte, ist die Beobachtung, daß die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren die nicht-malignen Zellen und die Tumorzellen gleichermaßen in ihrem Wachstum hemmen.

Aufgrund der diskutierten Problematik ist abschließend zu sagen, daß das hier präsentierte Ratten-Zellmodell keinen selektiven Vorteil bei der vergleichenden Untersuchung der Zellwachstumshemmung zwischen malignen und nicht-malignen Zellen erkennen läßt. Der ursprüngliche Ansatz funktioniert also nicht. Ob sich das Modellsystem darüber hinaus zu Untersuchungen von Unterschieden zwischen nicht-malignen und malignen Astrocyten nutzen läßt, bleibt offen. Es ließ sich nicht endgültig klären, ob der Unterschied im PDE1- und

---

PDE4-Expressionsmuster auf die maligne Transformation der Zellen alleine zurückzuführen ist.

## **6.4 Weitere Charakterisierung der humanen Glioblastomzelllinie SNB75**

Über die humane Glioblastomzelllinie SNB75 sind nur wenige Informationen in der Literatur verfügbar. Aus diesem Grund wurden der Karyotyp und die Verdopplungszeit der Zelllinie im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

Nach Auszählen angefärbter Metaphasen-Chromosomen zeigte die Mehrheit der Zellen eine durchschnittliche Chromosomenzahl von 58 Chromosomen. Besonders häufig traten die Aberrationen + 3, + 6, -13, -15, + 19, + 20, + 2 × 21, + 3 × 21 auf. Neben einer Veränderung in der Gonosomen-Anzahl kamen auch sogenannte „Marker“-Chromosomen vor. Dabei handelt es sich um Chromosomen, die nicht zugeordnet werden können, da sie z.B. Deletionen und Translokationen aufweisen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Karyogramme spiegeln allerdings nur eine Momentaufnahme der Zelle wider, da sich der Karyotyp im Laufe der Kulturdauer der Zelllinie verändern kann (Prof. Zankl, persönliche Mitteilung). Zur genaueren Karyotypisierung ist es notwendig, in mehreren Zellpassagen über mehrere Monate hinweg den Karyotyp zu bestimmen.

Die für die Zelllinie SNB75 ermittelte Verdopplungszeit im „Standard“-Kulturmedium (RPMI, 10 % FKS, 1 % P/S) beträgt  $37.50 \pm 7.0$  Stunden. Kultiviert man die Zellen in einem Medium, welches für normale humane Astrocyten („astrocyte growth medium“, AGM) bestimmt ist, ändert sich die Verdopplungszeit mit  $32.25 \pm 4.5$  Stunden nur geringfügig. Das läßt den Schluß zu, daß die unterschiedliche Medium-Zusammensetzung keinen Einfluß auf die Verdopplungszeit der Zelllinie SNB75 hat.

Weiterhin wurde von M. Kern die cAMP-spezifische PDE-Aktivität in AGM-adaptierten SNB75-Zellen bestimmt (Kern, 2002). Bei diesen Versuchen zeigt sich eine deutliche Reduktion der cytosolischen cAMP-PDE-Grundaktivität ( $36 \text{ pmol/min} \times \text{mg Protein}$ ) gegenüber den in RPMI-kultivierten SNB75-Zellen ( $136 \text{ pmol/min} \times \text{mg Protein}$ ). Außerdem nimmt die Stimulierbarkeit der PDE-Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  von 248 % auf 153 % ab. Im Gegensatz dazu steigt der Rolipram-hemmbarer Anteil der PDE-Aktivität von 18 % auf 72 % in den AGM-adaptierten SNB75-Zellen an. Um zu untersuchen, ob das Kulturmedium eine Verschiebung im Expressionsmuster der humanen PDE1- und PDE4-Isoenzyme hervorruft, müß-

---

ten weitere Versuche auf Transkriptionsebene (RT-PCR) und Proteinebene (Western-Blot) durchgeführt werden.

## 6.5 Klonierung und Expression einer rekombinanten PDE1C

Um die Eigenschaften der PDE1C genauer zu untersuchen, wurde die cDNA der PDE1C aus der humanen ZNS-Tumorbiopsieprobe TB1365 in den Expressionsvektor pFLAG-CMV-5a kloniert. Das neue Konstrukt erhielt den Namen pFLAG/1C. Die rekombinante PDE1C wurde in COS-7 Zellen transient überexprimiert. Diese Zellen sind für die Expression rekombinanter PDE1C gut geeignet, da ihre intrinsische PDE1-Aktivität sehr niedrig ist (Yan et al., 1995; Yan et al., 1996). Da die cAMP-spezifische PDE-Aktivität (mit und ohne Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) von pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen deutlich über der PDE-Aktivität der „mock“-transfizierten Zellen lag, kann davon ausgegangen werden, daß die Überexpression der rekombinanten PDE1C in COS-7-Zellen erfolgreich war. Die rekombinante PDE1C wurde von S. Anbari mittels Western-Blot-Analyse weiter charakterisiert (Anbari, 2001). Dazu wurde das rekombinante PDE1C-Protein mit seinem FLAG-Tag (an das Protein angehängtes Octapeptid: N-AspTyrLysAspAspAspAspLys-C) am carboxyterminalen Ende mittels Affinitätschromatographie angereichert. Dabei wurde die rekombinante PDE1C über das FLAG-Tag an die Säulenmatrix des Anti-FLAG-M2-Affinitätsgel (enthalten im „Carboxy-terminal FLAG Mammalian Transient Expression Kit“ von Sigma) gebunden. Nach einer weiteren Aufkonzentrierung durch Aceton-Fällung wurde die Probe in einem SDS-Gel (10 %) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot erfolgte die Detektion der PDE1C-Bande. Als Erstantikörper diente der monoklonale Antikörper Anti-FLAG<sup>®</sup>-M2 („Carboxy-terminal FLAG Mammalian Transient Expression Kit“, Sigma), welcher gegen das FLAG-Epitop des rekombinanten Proteins gerichtet ist. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, anti-mouse) erfolgte die Detektion der immunreaktiven Bande durch eine Chemolumineszenz-Reaktion. Für die rekombinante PDE1C aus pFLAG/1C ergab sich eine Größe von 89 kDa (Anbari, 2001), welche dem Literaturwert von etwa 80 kDa für PDE1C entspricht (Sonnenburg et al., 1998). Eine Detektion mit einem spezifischen Anti-PDE1C-Antikörper (freundliche Gabe von Prof. Dr. Beavo und Dr. Rybalkin, Department of Pharmacology, University of Washington, USA) gelang jedoch nicht (Anbari, 2001). Weitere Versuche haben gezeigt, daß der Anti-FLAG-Antikörper, der ein anderes Epitop als der Anti-1C-Antikörper detektiert, wesentlich sensitiver zu sein scheint bzw. niedrigere Proteinmengen detektiert als der Anti-PDE1C-Antikörper

---

(Knerr, 2001). Vermutlich waren die von S. Anbari eingesetzten Proteinmengen zu gering, als daß sie mit dem Anti-1C-Antikörper detektiert werden konnten (Anbari, 2001).

Weiterhin wurde die Wirkung verschiedener Modulatoren auf die rekombinante PDE1C untersucht. Mit den pFLAG/1C-transfizierten COS-7-Zellen wurde dazu eine PDE-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Durch Einsatz des PDE1-Stimulators  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  wird die cAMP-PDE-Grundaktivität der rekombinanten PDE1C um etwa das 1.5-fache gesteigert. DC-TA-46 hemmt die cAMP-Hydrolyse um 35 % (Cytosol-Fraktion) bzw. 49 % (Membran-Fraktion). Auch S. Knerr (2001) konnte bei Versuchen mit der rekombinanten PDE1C aus der Zelllinie SNB75 eine partielle Hemmung der cytosolischen cAMP-spezifischen PDE-Aktivität von 43 % bei Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  DC-TA-46 zeigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das Pteridin-Derivat DC-TA-46 ein gewisses Potential als PDE1-Hemmstoff aufweist. Im Gegensatz dazu wies der PDE4-spezifische Inhibitor Rolipram nur eine sehr geringe Hemmwirkung (4 %) auf die rekombinante PDE1C aus SNB75 auf (Knerr, 2001). In der murinen Melanomzelllinie B16 wurde für DC-TA-46 ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4.3  $\mu\text{M}$  für die PDE1C bestimmt (die Isoformen PDE1A und PDE1B sind bei der gewählten cAMP-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  weniger aktiv; Zhao et al., 1997). Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die PDE4-Hemmung liegt bei 0.03  $\mu\text{M}$ . (Drees et al., 1993) Eine Co-Inkubation von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und DC-TA-46 führt zu einer geringeren Steigerung der PDE-Aktivität (+ 50 %) verglichen mit dem Einsatz von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  alleine (+ 130 %). Eine denkbare Erklärung hierfür könnte sein, daß DC-TA-46 und CaM gleiche oder benachbarte Bindungsstellen im PDE1-Molekül besetzen und sich dadurch gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre, daß einer der beiden Modulatoren eine Konformationsänderung der PDE1 bewirkt und so der zweite Modulator in seiner Wirkungsweise beeinflußt wird. Um diese Annahmen zu überprüfen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der cGMP-Hydrolyse der rekombinanten PDE1C durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  zeigten, daß die cGMP-spezifische PDE-Aktivität nicht mehr weiter gesteigert wurde. Die Gründe für diese Beobachtung sind noch nicht geklärt. Wie bereits unter Punkt 6.1 angemerkt, könnten die verwendete CaM-Charge und das Alter der CaM-Lösung kritisch sein. Die Sequenz der PDE1C aus der Biopsieprobe TB1365 war mit der in der Genbank publizierten Sequenz (Medline Zugangsnummer: U40371) identisch. Sie wies keine Mutationen auf, die das Enzym in seiner Aktivität beeinflussen könnten (G. Pahlke, persönliche Mitteilung). Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß bei dem für die Umklonierung der PDE1C aus dem Expressionsvektor pCR3.1 in den Vektor pFLAG-CMV-5a nötigen PCR-Schritt eine Mutation in der PDE1C Sequenz erfolgte. Eine eventuelle Mutation könnte sich unter Um-

---

ständen auf wichtige Eigenschaften des rekombinanten Enzyms – wie z.B. auch die CaM-Stimulierbarkeit – auswirken. Um eine Mutation auszuschließen, müßte die PDE1C aus dem Konstrukt pFLAG/1C sequenziert werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

## **6.6 Abschließende Betrachtung: Ist die PDE1C ein mögliches Target bei der Therapie von ZNS-Tumoren?**

Für primäre murine Keratinocyten und drei Keratinocyten-Zelllinien, welche unterschiedliche Stadien der malignen Transformation repräsentieren, konnte gezeigt werden, daß die cAMP-spezifische PDE-Aktivität mit zunehmender Malignisierung der Zellen steigt. Die gemessene PDE-Aktivität konnte vor allem der PDE4 zugeordnet werden. (Marko et al., 1998). Im Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand wurden 60 humane Tumorzelllinien des NCI (National Cancer Institute)-Zelllinienpanels bezüglich ihrer cAMP-spezifischen PDE-Aktivität sowie ihrer PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung untersucht. Dabei zeigte sich in fünf von sechs getesteten Glioblastomzelllinien eine hohe CaM-stimulierbare PDE-Aktivität bei gleichzeitig niedriger PDE4-Aktivität. Durch semi-quantitative PCR-Analyse wurde nachgewiesen, daß in den ZNS-Tumorzelllinien hauptsächlich die PDE1C-Isoform exprimiert wird. Verglichen dazu waren die Signale der Transkripte für die PDE-Isoformen PDE4A, 4B und 4D deutlich schwächer. Da die PDE1C und die PDE4-Isoenzyme vergleichbare  $K_m$ -Werte für die cAMP-Hydrolyse aufweisen, lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, daß die PDE1C in den ZNS-Tumorzellen möglicherweise eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der cAMP-Homöostase übernimmt, vergleichbar der PDE4 in epithelialen Tumoren. Eine Hemmung der PDE1C könnte somit ein vielversprechender Ansatz zur antineoplastischen Therapie von ZNS-Tumoren sein.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben jedoch – sowohl am Menschen, als auch an der Ratte – gezeigt, daß in ZNS-Tumoren die cAMP-hydrolytische Aktivität niedriger als im Normalgewebe ist (Canal et al., 1974; Lee und Hait, 1985). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß in multiformen Glioblastomen die PDE1-Aktivität signifikant niedriger ist als im gesunden cerebralen Cortex. Dazu wurden einerseits Proben von grauer und weißer Substanz des temporalen Cortex (Kontrolle) und andererseits Proben von Glioblastomen untersucht. Die CaM-abhängige PDE1-Aktivität betrug  $96 \pm 10.4 \mu\text{mol/g}$  Gewebe in der Kontrolle und  $10 \pm 4.9 \mu\text{mol/g}$  Gewebe im Tumor. (Lal et al., 1996)

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe stützen diese Beobachtung. So führte G. Pahlke Untersuchungen zur PDE-Aktivität in humanen ZNS-Tumor-Biopsieproben unterschiedlicher Mali-

---

gnitätsgrade im Vergleich zu Proben aus grauer und weißer Substanz (Kontrolle) durch. Auch hier zeigte sich, daß die cAMP-spezifische PDE-Aktivität in den Kontrollen aus Nicht-Tumorgewebe deutlich höher lag als die cAMP-spezifische PDE-Aktivität der Tumore (G. Pahlke, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Biopsien der grauen und weißen Substanz wurden Epilepsie-Patienten entnommen, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß sich auch die PDE-Aktivität der Kontrollen von der Aktivität in gesundem Hirngewebe unterscheidet. Zur umfassenden Interpretation der in dieser Arbeit gezeigten Daten zur PDE- und cNMP-Situation in humanen Glioblastomzelllinien wären vergleichende Versuche an normalen humanen Astrocyten sehr hilfreich. Im Gegensatz zu Biopsieproben ist bei Untersuchungen an humanen Astrocyten gewährleistet, daß nur eine Zellpopulation erfaßt wird. Diese Untersuchungen konnten jedoch aus bereits genannten Gründen nicht erfolgen.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen des „Ratten-Zellmodells“ (siehe 5.3) zeigen eine Erniedrigung der cAMP-PDE-Grundaktivität und eine Abnahme des CaM-sensitiven PDE1C-Anteils in der C6-Glioblastomzelllinie im Vergleich zu subkultivierten Ratten-Astrocyten. Im Gegensatz dazu steigt der PDE4-Anteil in der malignen Zelllinie C6 an. Eventuell geht bei der malignen Transformation eine „down-Regulation“ der PDE1C-Aktivität mit einer „up-Regulation“ der PDE4-Isoenzyme einher. Eine reziproke Regulation von PDE1- und PDE4-Isoenzymen wurde bereits von Ang und Antoni (2002) für die neuroendocrine Zelllinie AtT20 beschrieben. Diese Regulation könnte eine wichtige Rolle bei physiologischen Regulationsvorgängen in der Zelle spielen.

Die gemessenen PDE-Grundaktivitäten in gesunden Ratten-Astrocyten im Vergleich zu malignen ZNS-Zellen stehen im Gegensatz zu den Daten für andere Tumorsysteme wie den bereits beschriebenen epithelialen Tumoren.

Die RT-PCR-Daten zur Untersuchung der PDE1- und 4-Expression zeigen in Ratten-Astrocyten detektierbare Banden für alle drei PDE1-Subtypen, während in C6-Zellen nur ein Signal für das Transkript der PDE1C-mRNA gefunden wurde. Werden die Bandenstärke der für alle PDE4-Isoformen erhaltenen DNA-Fragmente in Relation zu einer gleich stark ausgeprägten  $\beta$ -Actin-Bande gesetzt, zeigen Ratten-Astrocyten die stärkste Bandenintensität für die PDE4B-Isoform; in C6-Zellen ist das Signal für PDE4D am deutlichsten. Ein „shift“ im Expressionsmuster von PDE1 zu PDE4 in ZNS-Tumorzellen konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter abgesichert werden.

Ein Hindernis bei Untersuchungen zur Bedeutung der PDE1 besteht darin, daß ein potenter und spezifischer PDE1-Inhibitor fehlt. Alle zur Zeit erhältlichen Inhibitoren zeigen wenig

Wirkung und können darüber hinaus nicht zwischen den einzelnen Isoformen diskriminieren (Epstein, 1998).

Eine hilfreiche Methode zur Klärung der Rolle von PDE1C im ZNS wäre in Zukunft der Einsatz der sogenannten „anti-sense“-Technik. Dabei wird von „anti-sense“ Oligodeoxynucleotiden Gebrauch gemacht, welche spezifisch an ihre komplementäre Zielsequenz an der mRNA binden. Dies führt zu einer Inhibition der Expression des betreffenden Proteins. Ein solcher Versuch wurde bereits erfolgreich für die PDE1B in der B-Lymphoblastoid-Zelllinie RPMI 8392 durchgeführt. (Epstein, 1998)

Nach dem jetzigen Ergebnisstand scheint die PDE1C kein vielversprechendes Target zur Therapie von ZNS-Tumoren zu sein. Im Gegensatz dazu könnte die PDE4 – ebenso wie für epitheliale Tumore gezeigt – einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt zur Behandlung von ZNS-Tumoren darstellen. Weitere Untersuchungen sind hierzu notwendig.

### **Ausblick**

Im folgenden soll noch kurz auf weitere Therapieansätze bei ZNS-Tumoren – neben einer eventuellen Hemmung der PDE4 – eingegangen werden.

- Chen et al. (1998) konnten zeigen, daß in der humanen Glioblastomzelllinie A-172 die Stimulierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs, z.B. durch Forskolin, IBMX oder cAMP-Analoga zu einer Abnahme der Zellproliferation, gesteigerter Zelldifferenzierung und nachfolgender Apoptose führt. Dabei induziert cAMP einen Zellzyklusarrest nur in sich aktiv teilenden Zellen. Dies ist als Vorteil bei der Behandlung von ZNS-Tumoren anzusehen, da sich im gesunden Hirngewebe nur wenige Zellen aktiv teilen.
- Der Einsatz des Tetrasaccharides TS4 führt in C6-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Wachstumshemmung. Die anti-mitotische Aktivität von TS4 und das Fehlen einer Cytotoxizität gegenüber gesunden Zellen *in vitro* könnte einen Einsatz von TS4 in der Hemmung pathologischer Zellteilungen möglich machen. Unter anderem interagiert TS4 vermutlich mit Glykan-Bindungsproteinen der Zelloberfläche. Dies könnte einen Zell-Zell-Kontakt „simulieren“ und so eine Wachstumshemmung auslösen. Der molekulare Mechanismus der TS4-Inhibition ist jedoch noch nicht bekannt. (Nieto-Sampedro et al., 1996)
- Weiterhin gibt es Untersuchungen zum Einsatz eines autologen *ex vivo* Gentransfers für andere Erkrankungen des ZNS. Zum autologen *ex vivo* Gentransfer werden humane adulte Astrocyten des cerebralen Cortex von Patienten im Rahmen einer Resektion entnommen. Von diesen Zellen werden Primärkulturen angelegt, welche dann unter serum-freien Bedingungen mit einem adenoviralen Vektor infiziert werden. (Ridet et al., 1999) In diesem

---

Fall codiert der adenovirale Vektor das Gen für die humane Tyrosin-Hydroxylase (hTH) unter der negativen Kontrolle des Tetracyclin (tet-off)-Regulationssystems (Gossen und Bujard, 1992). TH, welches Tyrosin zu L-Dopa umsetzt, ist das limitierende Enzym für die Catecholamin-Synthese (Ridet et al., 1999). Die infizierten Astrocyten produzieren in großer Menge aktives hTH und nachfolgend L-Dopa, was bei der Therapie von Morbus Parkinson in Tiermodellen ein therapeutisches Potential aufweist (Wolff et al., 1989, Horellou et al., 1990). Ein entsprechend modifiziertes Gentransfer-System könnte möglicherweise in der Zukunft auch bei der Therapie von ZNS-Tumoren hilfreich sein.

- Humane Gliome und Gliome der Ratte exprimieren große Mengen an IGF-I („insulin-like growth factor I“; Trojan et al., 1993), welcher in Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine Rolle spielt (Shooter, 1991). Mit einem episomalen Vektor, welcher eine anti-sense-IGF-I-Cassette unter der Kontrolle des Metallothionein-I-Promotors der Maus und einen Epstein-Barr-Virus „origin of replication“ besitzt, (Trojan et al., 1992; Stuart et al., 1984; Hambor et al., 1988) werden C6-Zellen transfiziert. Ratten, welche mit diesen transfizierten C6-Zellen infiziert wurden, blieben bis zu 13 Monate nach Injektion der tumorigenen Parentalzelllinie C6 tumorfrei. Als Kontrolle diente die Co-Injektion von parentalen C6-Zellen und transfizierten C6-Zellen, in deren Vektor die IGF-I-Cassette fehlt. Die so behandelten Tiere bildeten Tumore aus. Ratten, denen ein durch C6-Zellen ausgelöstes Glioblastom chirurgisch entfernt wurde, zeigten nach Behandlung mit den anti-sense-transfizierten C6-Zellen ebenfalls kein Rezidiv. Aus diesem Ergebnis folgerten Trojan et al., daß die durch anti-sense vermittelte Hemmung des IGF-I die transfizierten Gliomazellen in ihrer Immunogenität verändert hat und daß der Verlust an Tumorigenität der Parentalzelllinie in behandelten Ratten eine immunvermittelte Basis hat (Trojan et al., 1993). Leider hat diese Versuchsreihe einen Fehler, der sie für den Einsatz am Patienten ungeeignet macht: Der C6-Original-Tumor wurde in einem „outbred“-Wistar-Stamm etabliert, für welchen keine syngene Rattenlinie existiert. Aus diesem Grund kann die Tumorzelllinie C6 in allogenen Rattenstämmen wie den hier verwendeten BDX-Ratten immunogen sein, was die Versuche von Trojan et al. auch zeigen. Humane Astrocytome und multiforme Glioblastome werden jedoch als nicht- oder nur schwach immunogen angesehen. (Barth, 1998)
- Zu einer optimierten Resektion vieler Tumore führt der präoperative Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Dieses Verfahren, welches im folgenden erläutert werden soll, wird u.a. bereits erfolgreich bei Gehirntumoroperationen eingesetzt. 5-ALA ist eine körpereigene Vorstufe des Hämoglobins am Anfang des Häm biosynthesewegs und unterliegt einer negativen „feedback“-Kontrolle des Endproduktes Häm. Wird



exogene 5-ALA zugeführt (orale Gabe, drei Stunden präoperativ, 20 mg/kg Körpergewicht bei Gehirntumoren; Stummer et al., 2000), kann dieser Rückkopplungsmechanismus übergangen werden; es kommt zu einer Akkumulation des Hämvorläufers Protoporphyrin IX (PpIX; Friesen et al., 2002) Da es zwischen gesunden und malignen Zellen signifikante Aktivitätsunterschiede in den Schlüsselenzymen des Hämbiosynthesewegs gibt (Peng et al., 1997), reichern bevorzugt maligne Zellen das stark fluoreszierende PpIX an (Stummer und Reulen, 2001). Während der Tumoroperation wird die Fluoreszenz der PpIX-haltigen Tumorzellen durch Xenonlicht mit  $\lambda = 375\text{-}440$  nm angeregt. Durch Spezialfilter im modifizierten Operationsmikroskop wird die Fluoreszenz des Tumorgewebes sichtbar gemacht. Dabei nimmt der PpIX-haltige Tumor eine intensiv rote Farbe an, während das nicht-maligne Gewebe blau erscheint (Stummer und Reulen, 2001). *In vivo*-Untersuchungen an C6 Gliomazellen zeigten im Tumorgewebe mit einer Ratio von 6:1 eine signifikant höhere Fluoreszenz als im umgebenden gesunden Gewebe (Stummer et al., 1998). Anhand einer Studie konnte gezeigt werden, daß die Überlebensrate von Gehirntumor-Patienten, welche einer 5-ALA-induzierten, fluoreszenzgestützten Tumorsektion unterzogen wurden, im Vergleich zu herkömmlich behandelten Personen um 6 Monaten verlängert war (Stummer und Baumgartner, 2000). Obwohl durch Einsatz von 5-ALA bei Hirntumoroperationen die Grenzen des Tumors sowie infiltrierendes Tumorgewebe erkannt werden können, ist das Entfernen des malignen Gewebes ohne neurologische Nebeneffekte allerdings oft nicht möglich (Friesen et al., 2002)

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der PDE1C-Isoform in ZNS-Zellen zu untersuchen. Es sollte vor allem die Bedeutung der PDE1C als mögliches Target für die anti-neoplastische Therapie von ZNS-Tumoren näher beleuchtet werden. Alle Untersuchungen wurden an Zellkultur-Systemen durchgeführt.

Die humanen Glioblastomzelllinien SNB75, SF295, SF539 und SF268 wurden bezüglich ihrer PDE1- und PDE4-Isoenzymausstattung näher charakterisiert. Es zeigte sich, daß die Zelllinien SNB75 und SF295 in ihrem PDE-Expressionsmuster sehr unterschiedlich sind: In der Zelllinie SNB75 liegt die cAMP-hydrolytische Aktivität deutlich über jener in SF295-Zellen. Darüber hinaus weisen die SNB75-Zellen einen hohen Anteil  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-stimulierbarer PDE1-Aktivität bei niedriger PDE4-Aktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Zelllinie SF295, welche keine  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-stimulierbare PDE-Aktivität besitzt, einen hohen prozentualen Anteil an Rolipram-hemmbarer PDE4-Aktivität. Darüber hinaus verhalten sich die beiden Zelllinien auch bezüglich ihrer Gehalte an den „second messengern“ cAMP und cGMP komplementär. In den SNB75-Zellen ist der cAMP-Spiegel etwa um  $\frac{2}{3}$  niedriger als in den SF295-Zellen; der cGMP-Spiegel ist etwa doppelt so hoch wie der cAMP-Gehalt. In SF295-Zellen hingegen liegt der Gehalt an cGMP um etwa die Hälfte niedriger als der cAMP-Spiegel und ist somit vergleichbar mit dem cGMP-Gehalt der SNB75-Zellen. Auch die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  ist in der Zelllinie SNB75 höher als in SF295-Zellen. Die Untersuchung ausgelöster  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten – mit besonderem Augenmerk auf den capacitativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (CCE) – ergab, daß in SNB75-Zellen die Kapazität der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und die Geschwindigkeit der Speicherentleerung größer sind als in SF295-Zellen. Auch der CCE ist in SNB75-Zellen größer als in der Zelllinie SF295.

An den beiden humanen Glioblastomzelllinien SNB75 und SF295 wurden mittels Cytotoxizitätstests verschiedene PDE-Hemmstoffe auf ihr wachstumshemmendes Potential untersucht. Für den PDE4-Inhibitor DC-TA-46 konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Bereich von 3-4.5  $\mu\text{M}$  für die Hemmung des Zellwachstums ermittelt werden. Der als PDE1-Hemmstoff eingesetzte CaM-Antagonist Calmidazoliumchlorid wies einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Wachstumshemmung von 2-3  $\mu\text{M}$  auf. Ein Zusammenhang zwischen PDE1 bzw. PDE4-Expression der Zelllinien und dem wachstumshemmenden Potential der eingesetzten Substanzen war nicht erkennbar.

Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinie SNB75 wurden der Karyotyp und die Verdopplungszeit der Zelllinie bestimmt. Ein Großteil der untersuchten Zellen wies durchschnittlich 58 Chromosomen auf. Besonders häufig traten, neben verschiedenen Marker-Chromosomen, die

Aberrationen + 3, + 6, -13, -15, + 19, + 20, + 2 × 21, + 3 × 21 auf. Die Verdopplungszeit für die Zelllinie beträgt unter den verwendeten Kulturbedingungen  $37.50 \pm 7.0$  Stunden.

Weiterhin wurde die cDNA der PDE1C aus der humanen Biopsieprobe TB1365 (anaplastisches Astrocytom) kloniert und das rekombinante Protein transient überexprimiert. An der rekombinanten PDE1C wurden – neben der Stimulierbarkeit des Proteins durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (+ 130 %) – die beiden PDE-Hemmstoffe DC-TA-46 und Vinpocetin getestet. Diese beiden Substanzen hemmten die Aktivität der rekombinanten PDE1C um durchschnittlich 42 % (DC-TA-46) bzw. 28 % (Vinpocetin).

Ein *in vitro*-Tiermodell zur näheren Untersuchung der PDE-Ausstattung und cAMP-Homöostase von nicht-malignen ZNS-Zellen und Glioblastomzellen sollte aus subkultivierten Ratten-Astrocyten und der Ratten-Glioblastomzelllinie C6 entwickelt werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, entgegen Daten für Keratinocyten (Marko et al., 1998), daß die PDE-Aktivität in nicht-malignen Ratten-Astrocyten deutlich höher liegt als in der Glioblastomzelllinie C6. Die Ratten-Astrocyten zeigen eine höhere  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -stimulierbare PDE1-Aktivität. In der Zelllinie C6 hingegen ist der PDE4-Anteil im Vergleich zu Ratten-Astrocyten höher. Diese Ergebnisse werden durch RT-PCR-Versuche gestützt. Die Gehalte der „second messenger“ cAMP, cGMP und  $\text{Ca}^{2+}$  sind in nicht-malignen Ratten-Astrocyten und malignen C6-Zellen vergleichbar. Allerdings weisen die C6-Zellen einen größeren CCE auf. Der Einsatz von DC-TA-46 in Cytotoxizitätstests weist sowohl in Ratten-Astrocyten als auch in C6-Tumorzellen vergleichbare Hemmwirkungen ( $\text{IC}_{50}$ -Wert  $\sim 1.5 \mu\text{M}$ ) auf. Der CaM-Antagonist Calmidazoliumchlorid wirkt in subkultivierten Ratten-Astrocyten bereits in geringsten Konzentrationen wachstumshemmend; der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Wachstumshemmung von C6-Zellen liegt bei  $2.3 \mu\text{M}$ . Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, daß das untersuchte Ratten-Zellmodell – auch aufgrund der unterschiedlichen Kulturbedingungen, welche die PDE-Expression beeinflussen – nur mit Einschränkungen einsetzbar ist.

Aufgrund der aktuellen Daten scheint die PDE1C als Target für eine anti-neoplastischen Therapie von ZNS-Tumoren kaum geeignet. Der Vergleich von nicht-malignen und malignen ZNS-Zellen deutet eher auf eine „down“-Regulation der PDE1C und eine „up“-Regulation der PDE4 hin. Dies konnte sowohl in humanen als auch in Rattenzellen gezeigt werden und müßte in weiteren Untersuchungen vertiefend untersucht werden.

## 8 Literatur

Abbracchio, MP und Burnstock, G (1994)

Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?

Pharmacol. Ther. 64, 445-475

Abbracchio, MP (1997)

ATP in brain function

In: Jacobson, K und Jarvis, MF (editors)

Purinergic approaches in experimental therapeutics

Wiley & Sons, Inc.

Amersham

TRK 432: Cyclic AMP[<sup>3</sup>H] assay system (manual)

Amersham

TRK 500: Cyclic GMP[<sup>3</sup>H] assay system (manual)

Amersham Pharmacia Biotech

QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit (manual)

Anbari, S (2001)

Isolierung und Charakterisierung einer Phosphodiesterase 1C aus der humanen Glioblastom-Zelllinie SNB75

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Ang, KL und Antoni, FA (2002)

Reciprocal regulation of calcium dependent and calcium independent cyclic AMP hydrolysis by protein phosphorylation

Journal of Neurochemistry 81, 422-433

Artner, J (2001)

Cancer and Neoplasia

<http://artner.host.sk/cancer/cancer.html>

Ärztliche Praxis

<http://www.aerztlichepraxis.de/db/shownews/1014914320/5/16/news.html>

Barnette, MS, Torphy, TJ und Christensen, SB (1995)

Compounds

WO 00139

Barth, RF (1998)

Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas

Journal of Neuro-Oncology 36, 91-102

Beavo, JA (1995)

Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms

Physiol. Rev. 75, 725-748

Benda, P, Lightbody, J, Sato, G, Levine, L und Sweet, W (1968)

Differentiated rat glial cell strain in tissue culture

Science 161, 370-371

Berridge, MJ (1985)

The molecular basis of communication within the cell

Scientific American 253: 124-125

Berridge, MJ und Irvine, RF (1989)

Inositol phosphates and cell signalling

Nature 341, 197-205

Berridge, MJ (1998)

Neuronal calcium signalling

Neuron 21(1), 13-26

Billingsley, ML, Polli, JW, Balaban, CD und Kincaid, RL (1990)

Developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase  
Develop. Brain Res. 53, 253-263

Black, PM (1991)

Brain tumors, part 1

N. Engl. J. Med. 324, 1471-1476

Bolger, GB (1994)

Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: A  
diverse family of regulatory enzymes

Cellular Signalling 6(8), 851-859

Bolger, GB, Erdogan, S, Jones, RE, Loughney, K, Scotland, G, Hoffmann, R, Wilkinson, I,  
Farrell, C und Houslay, MD (1997)

Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the  
human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene

Biochem. J. 328, 539-548

Borrelli, E, Montmayeur, JP, Foulkes, NS und Sassone-Corsi, P (1992)

Signal transduction and gene control: The cAMP pathway

Critical Reviews in Oncogenesis, 3(4): 321-338

Bradford, MM (1976)

A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing  
the principle of protein-dye binding

Analytical Biochemistry 72, 248-254

Brain Tumour Net

<http://www.brain-tumour.net>

Brostrom, CO und Wolff, DJ (1974)

Calcium-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from glial tumor cells

Archives of Biochemistry and Biophysics 165, 715-727

Brown, TA (1996)

Gentechnologie für Einsteiger

2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag

Canal, N, Frattola, L, Villani, R und Bassi, S (1974)

Adenyl cyclase and phosphodiesterase in human cerebral tumors

Journal of Neurosurgical Sciences 18(3), 164-168

Centemeri, C, Bolego, C, Abbracchio, MP, Cattabani, F, Puglisi, L, Burnstock, G und Nicosia, S (1997)

Characterization of the  $Ca^{2+}$  responses evoked by ATP and other nucleotides in mammalian brain astrocytes

British Journal of Pharmacology 121, 1700-1706

Chen, TC, Hinton, DR, Zidovetzki, R und Hofman, FM (1998)

Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas

Laboratory Investigation 78(2), 165-174

Cherry, JA und Davis, RL (1999)

Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect

Journal of Comparative Neurology 407, 287-301

Cheung, WY, Lynch, TJ und Wallace, RW (1978)

An endogenous  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase

Adv. Cyclic Nucleotide Research 9, 233-251

Chiono, M, Mahey, R, Tate, G und Cooper, DMF (1995)

Capacitative  $Ca^{2+}$  entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells

J. Biol. Chem. 270, 1149-1155

Chiras, J, Dormont, D, Fauchon, F, Debussche, C und Bories, J (1988)

Chimiothérapie intra-artérielle des gliomes malins / Intra-arterial chemotherapy of malignant gliomas

J. Neuroradiol. 15, 31-48

Conti, M, Nemoz, G, Sette, C und Vicini, E (1995)

Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases

Endocr. Rev. 16(3), 370-389

Conti, M und Jin, SLC (2000)

The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 63, 1-38

Coyle, DE (1995)

Adaptation of C6 glioma cells to serum-free conditions leads to the expression of a mixed astrocyte-oligodendrocyte phenotype and increased production of neurite-promoting activity

Journal of Neuroscience Research 41, 374-385

Deber, CM, Tom-Kun, J, Mack, E und Grinstein, S (1985)

Bromo-A23187: a nonfluorescent calcium ionophore for use with fluorescent probes

Analytical Biochemistry 146, 349-352

Debono, M, Molloy, RM, Dorman, DE, Paschal, JW, Babcock, DF, Deber, CM und Pfeiffer, DR (1981)

Synthesis and characterization of halogenated derivatives of the ionophore A23187: Enhanced calcium ion transport specificity by the 4-bromo derivative

Biochemistry 20, 6865-6872

Deitmer, JW, Verkhratsky, AJ und Lohr, C (1998)

Calcium signalling in glial cells

Cell Calcium 24(5/6), 405-416



Deitmer, JW und Schild, D (2000)

Ca<sup>2+</sup> und pH. Ionenmessungen in Zellen und Geweben

Spektrum Akademischer Verlag

Deitmer, JW (2001)

Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons

Respiration Physiology 129, 71-81

Demaurex, N, Lew, DP und Krause, KH (1992)

Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells

Journal of Biological Chemistry 267(4), 2318-2324

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Informationen zu DSMZ-Katalognummern ACC 60 und ACC 108

<http://www.dsmz.de>

Dorit, RL, Walker, WF und Barnes, RD (1991)

Zoology

Saunders College Publishing

Dousa, T (1999)

Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney

Kidney International 55, 29-62

Drees, M, Zimmermann, R und Eisenbrand, G (1993)

3', 5'-Cyclic nucleotide phosphodiesterase in tumor cells as potential target for tumor growth inhibition

Cancer Research 53, 3058-3061

Druckrey, H, Ivankovic, S und Preussmann, R (1965)

Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff

Zeitschrift für Krebsforschung 66, 389

Dudai, Y, Jan, YN, Byers, D, Quinn, W und Benzer, S (1976)

*Dunce*, a mutant of *drosophila* deficient in learning

PNAS 73, 1684-1688

Eban, E und Ruther, E (1985)

Animal trial prediction and clinical effect of new chemical substances to be used as antipsychotic agents

Pharmacopsychiatry 18, 69-70

Eisenbrand, G und Metzler, M (2002)

Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner

2. aktualisierte Auflage, Wiley-VCH

Engels, P, Fichtel, K und Lübbert, H (1994)

Expression and regulation of human and rat phosphodiesterase type IV isogenes

FEBS Lett. 350, 291-295

Engels, P., Abdel'Al, S, Hulley, P und Lübbert, H (1995)

Brain distribution of four rat homologues of the *Drosophila dunce* cAMP phosphodiesterase

Journal of Neuroscience Research 41, 169-178

Epstein, P (1998)

Antisense inhibition of phosphodiesterase expression

Methods: A Companion to Methods in Enzymology 14, 21-33

Fischer, G (1984)

Growth requirements of immature astrocytes in serum-free hormonally defined media

Journal of Neuroscience Research 12, 543-552

Friedman, DL (1976)

Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation

Physiol. Rev. 56, 652-708

Friesen, SA, Hjortland, GO, Madsen, SJ, Hirschberg, H, Engebråten, O, Nesland, JM und Peng, Q (2002)

5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (Review)

International Journal of Oncology 21, 577-582

Gluzman, Y (1981)

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants

Cell 23, 175-182

Gossen, M und Bujard, H (1992)

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters

PNAS 89, 5547-5551

Griebel, G, Misslin, R, Vogel, E und Bourguignon, JJ (1991)

Behavioral effects of rolipram and structurally related compounds in mice: behavioral sedation of cAMP phosphodiesterase inhibitors

Pharmacol. Biochem. Behav. 39, 321-323

Groeger, DE, Riley, RT, Dorner, JW und Cole, RJ (1988)

Cyclopiazonic acid inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles

Biochem. Pharmacol. 37(5), 978-981

Grynkiewicz, G, Poenie, M und Tsien, RY (1985)

A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties

J. Biol. Chem. 260: 3440-3450

Hambor, JE, Hauer, CA, Shu, HK, Groger, RK, Kaplan, DR und Tykocinski, ML (1988)  
Use of an Epstein-Barr virus episomal replicon for anti-sense RNA-mediated gene inhibition  
in a human cytotoxic T-cell clone  
PNAS 85(11), 4010-4014

Han, P, Werber, J, Surana, M, Fleischer, N und Michaeli, T (1999)  
The calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1C down-regulates glucose-  
induced insulin secretion  
Journal of Biological Chemistry 274 (32), 22337-22344

Hertz, L, Peng, L und Lai, JCK (1998)  
Functional studies in cultured astrocytes  
Methods: A Companion to Methods in Enzymology 16, 293-310

Hildebrandt, JP und Hildebrandt P (1997)  
Lysophosphatidic acid depletes intracellular calcium stores different from those mediating  
capacitative calcium entry in C6 rat glioma cells  
Glia 19, 67-73

Ho, C, Hicks, J und Salter, MW (1995)  
A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal  
cord of the rat  
Br. J. Pharmacol. 116, 2909-2918

Horellou, P, Marlier, L, Privat, A und Mallet, J (1990)  
Behavioral effect of engineered cells that synthesize L-dopa or dopamine after grafting into  
the rat neostriatum  
Eur. J. Neurosci. 2, 116-119

Hornhardt, S und Wiebel, FJ (1996)  
CCLTOP: Catalogue of cell lines in toxicology and pharmacology, GSF-Bericht 3/96  
1<sup>st</sup> edition, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Houslay, MD, Sullivan, M und Bolger, GB (1998)

The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions

Advances in Pharmacology 44, 225-342

Huston, E, Pooley, I, Julien, J, Scotland, G, McPhee, I, Sullivan, M, Bolger, G und Houslay, MD (1996)

The human cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE-46 (HSPDE4A4B) expressed in transfected COS7 cells occurs as both particulate and cytosolic species which exhibit distinct kinetics of inhibition by the anti-depressant rolipram

J. Biol. Chem. 271, 31334-31344

Irvine, RF (1990)

„Quantal“  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates – a possible mechanism

FEBS Lett. 263, 5-9

Jacob, R, Merritt, JE, Hallam, TJ und Rink, TJ (1988)

Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells

Nature 335, 40-45

Juilfs, DM, Soderling, S, Burns, F und Beavo, JA (1999)

Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs)

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 135, 67-104

Jung, S (1998)

Histamininduzierte Veränderungen der cytosolischen Calciumkonzentration in Astrocyten der Ratte

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Jung, S, Pfeiffer, F und Deitmer, JW (2000)

Histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: Evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms

Journal of Physiology, 527.3, 549-561

Kakiuchi, S und Yamazaki, R (1970)

Calcium-dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase

Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1104-1110

Kakiuchi, S, Yamazaki, R, Teshima, Y und Uenishi, K (1973)

Regulation of nucleotide cyclic 3', 5' monophosphate phosphodiesterase activity from rat brain by a modulator and  $Ca^{2+}$

PNAS 70, 3526-3530

Kakkar, R, Raju, RVS und Sharma, RK (1999)

Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1)

Cell. Mol. Life. Sci. 55, 1164-1186

Kastritsis, CH und McCarthy, KD (1993)

Oligodendroglial lineage cells express neuroligand receptors

Glia 8(2), 106-113

Kern, M (2002)

PDE1- und PDE4-Isoenzym-Expression in ZNS-Tumorzellen

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Kincaid, RL, Balaban, CD, und Billingsley, ML (1987)

Differential localization of calmodulin-dependent enzymes in rat brain: Evidence for selective expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase in specific neurons

PNAS 84, 1118-1122

Kincaid, RL, Balaban, CD, und Billingsley, ML (1992)

Regional and developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain

Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research 25, 111-122

Kithas, PA, Artman, M, Thompson, WJ und Strada, SJ (1989)

Subcellular distribution of high-affinity type IV cyclic AMP phosphodiesterase activities in rabbit ventricular myocardium: Relations to post-natal maturation

J. Mol. Cell Cardiol. 21, 507-517

Klee, CB und Vanaman, TC (1982)

Calmodulin

Adv. Prot. Chem. 35, 213-321

Kleihues, P, Soylemezoglu, F, Schäuble, B, Scheithauer, BW und Burger, PC (1995)

Histopathology, classification, and grading of gliomas

Glia 15, 211-221

Klinikum Großhadern, München

Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Neuroonkologie

<http://neurochir.klinikum.uni-muenchen.de/Spezialbereiche/NeuroonkHirntumore.html>

Knerr, S (2001)

Expression und Charakterisierung einer rekombinanten Phosphodiesterase 1C aus der humanen Glioblastomzelllinie SNB75

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Koolman, J und Röhm, KH (1998)

Taschenatlas der Biochemie

2. Auflage, Thieme-Verlag

Kuffler, SW, Nicholls, JG und Martin, AR (1984)

From neuron to brain

2<sup>nd</sup> edition, Sinauer Associates Inc. Publishers

- Lal, S, Raju, RVS, Macaulay, RJB und Sharma, RK (1996)  
Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cerebral cortex and glioblastoma multiforme  
Can. J. Neurol. Sci. 23, 245-250
- Lee, GL und Hait, WN (1985)  
Inhibition of growth of C6 astrocytoma cells by inhibitors of calmodulin  
Life Sciences 36, 347-354
- Lena, C und Changeux, JP (1997)  
Pathological mutation of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders  
Curr. Opin. Neurobiol. 7(5), 674-682
- Lin, W-W, Kiang, JG und Chuang, D-M (1992)  
Pharmacological characterization of endothelin-stimulated phosphoinositide breakdown and cytosolic free  $Ca^{2+}$  rise in rat C6 glioma cells  
J. Neurosci. 12, 1077-1085
- Lindl, T und Bauer, J (1987)  
Zell- und Gewebekultur  
Gustav Fischer Verlag
- Liu, C und Hermann, TE (1978)  
Characterization of ionomycin as a calcium ionophore  
Journal of Biological Chemistry 253(17), 5892-5894
- Livi, GP, Kmetz, P, McHale, MM, Cieslinski, LB, Sathe, GM, Taylor, DP, Davis, RL, Torphy, TJ und Balcarek, JM (1990)  
Cloning and expression of cDNA for a human low  $K_m$ , rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase  
Mol. Cell. Biol. 10(6), 2678-2686



Lucas, KA, Pitari, GM, Kazerounian, S, Ruiz-Stewart, I, Park, J, Schulz, S, Chepenik, KP und Waldman, SA (2000)

Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP

Pharmacological Reviews 52, 375-413

MacDermott, AB, Role, LW und Siegelbaum, SA (1999)

Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release

Annu. Rev. Neurosci. 22, 443-485

Marko, D, Romanakis, K, Zankl, H, Fürstenberger, G, Steinbauer, S und Eisenbrand, G (1998)

Induction of apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific PDE in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterparts

Cell Biochemistry and Biophysics 28, 75-101

Marko, D, Pahlke, G, Merz KH und Eisenbrand, G (2000)

Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterases: Potential targets for anticancer therapy

Chem. Res. Toxicol. 13(10), 944-948

Marko, D, Merz, KH, Kunz, C, Müller, A, Tarasova, N und Eisenbrand, G (2002)

Intracellular localization of 7-benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine in membrane structures impeding the inhibition of cytosolic cyclic AMP-specific phosphodiesterase

Biochemical Pharmacology 63, 669-676

Mason, WT, Hoyland, J, Davison, I, Carew, MA, Jonassen, J, Zorec, R, Lledo, PM, Shankar, G und Horton, M (1993)

Technology for real time fluorescent ratio imaging in living cells using fluorescent probes for ions

In: Sharif, NA (editor)

Molecular imaging in neuroscience. A practical approach, 171-208

Oxford University Press, Inc.

McKeever, PE, 1993

Human astrocytic neoplasms

In: Murphy, S (editor)

Astrocytes: Pharmacology and function, 399-436

Academic Press, Inc.

Medline, search: nucleotide

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Merz, KH, Marko, D, Regiert, T, Reiss, G, Walter, F und Eisenbrand, G (1998)

Synthesis of 7-benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine and novel derivatives free of positional isomers. Potent inhibitors of cAMP-specific phosphodiesterase and of malignant tumor cell growth

Journal of Medicinal Chemistry 41(24), 4733-4743

Merz, KH (1999)

Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an alkylaminosubstituierten Pteridinen und Chinoxalinen: Hemmung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen und des Wachstums von Tumorzellen  
Dissertation, Universität Kaiserslautern

Molecular Probes (2002)

Handbook, Section 20.2: Fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators excited with UV light

<http://www.probes.com/handbook/print/2002.html>

Müller, A (2000)

Struktur-Aktivitätsuntersuchungen von Hemmstoffen der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase PDE4 mit 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolodino-pteridin (DC-TA-46) als Leitsubstanz

Dissertation, Universität Kaiserslautern

NCI (1998)

NCI Publication: What you need to know about <sup>TM</sup> brain tumors

<http://cancer.gov/cancerinfo/wyntk/brain> (neue Auflage)

Nieto-Sampedro, M, Bailón, C, Fernández-Mayoralas, A, Martín-Lomas, M, Mellström, B und Naranjo, JR (1996)

Experimental brain glioma: Growth arrest and destruction by a blood-group-related tetrasaccharide

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 55(2), 169-177

Nishie, K, Cole, RJ und Dorner, JW (1985)

Toxicity and neuropharmacology of cyclopiazonic acid

Food Chem. Toxicol. 23(9), 831-839

Norred, WP, Morrissey, RE, Riley, RT, Cole, RJ und Dorner, JW (1985)

Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin [<sup>14</sup>C] cyclopiazonic acid in rats

Food Chem. Toxicol. 23(12), 1069-1076

Norton, WT und Farooq, M (1989)

Astrocytes cultured from mature brain derive from glial precursor cells

J. Neurosci. 9(3), 769-775

O'Donnell, JM (1993)

Antidepressant-like effects of rolipram and other inhibitors of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase on behavior maintained by differential reinforcement of low response rate

J. Pharmacol. Exp. Ther. 264, 1168-1178

Palfreyman, MN (1995)

Phosphodiesterase type IV inhibitors as antiinflammatory agents

Drugs of the Future 20(8), 793-804

Parekh, AB und Penner, R (1997)

Store depletion and calcium influx

Physiological Reviews 77, 901-930

Peng, Q, Warloe, T, Berg, K, Moan, J, Kongshaug, M, Giercksky, KE und Nesland, JM (1997)

5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges  
Cancer 79(12), 2282-2308

Perry, MJ und Higgs, GA (1998)

Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors  
Current Opinion in Chemical Biology 2, 472-481

Pitot, HC und Dragan, YP (1991)

Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis  
FASEB Journal 5(9), 2280-2286

Pösch, N (1971)

Assay of phosphodiesterases with radioactive labelled cyclic 3'5'-AMP as substrate  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 272-299

Pollack, IF, Randall, MS, Kristofik, MP, Kelly, RH, Selker, RG und Vertosick FT Jr. (1990)

Response of malignant glioma cell lines to epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in a serum-free medium  
J. Neurosurg. 73, 106-112

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (1998)

258. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag

Putney, JW Jr. (1986)

A model for receptor-regulated calcium entry  
Cell Calcium 7, 1-12

Putney, JW Jr., Broad, LM, Braun, FJ, Lievreumont, JP und Boyd, GS (2001)

Mechanisms of capacitative calcium entry  
J. Cell Sci. 114, 2223-2229

Puurunen, J, Lucke, C, und Schwabe, U (1978)

The effect of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on gastric secretion and gastric mucosal cyclic AMP

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304, 69-75

Qiagen (1998)

QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Purification Handbook

Qiagen (1999a)

QIAquick<sup>™</sup> Spin Handbook

Qiagen (1999b)

QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Handbook

Randall, D, Burggren, W und French, K (1997)

Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations

4<sup>th</sup> edition, W.H. Freeman and Company

Reed, PW und Lardy, HA (1972)

A23187: a divalent cation ionophore

J. Biol. Chem. 247(21), 6970-6977

Reichert, H (1990)

Neurobiologie

Thieme-Verlag

Ridet, J-L, Corti, O, Pencalet, P, Hanoun, N, Hamon, M, Philippon, J und Mallet, J (1999)

Toward autologous *ex vivo* gene therapy for the central nervous system with human adult astrocytes

Human Gene Therapy 10, 271-280

Roche (2000)

Titan One Tube RT-PCR System (manual)

Rottem, S und Barile, MF (1993)

Beware of mycoplasmas

Trends Biotechnol. 11(4), 143-151

Rutka, JT, Giblin, JR, Høifødt, HK, Dougherty, DV, Bell, CW, McCulloch, JR, Davis, RL, Wilson, CB und Rosenblum, ML (1986)

Establishment and characterization of a cell line from a human gliosarcoma

Cancer Research 46, 5893-5902

Rutka, JT, Giblin, JR, Dougherty, DY, Liu, HC, McCulloch, JR, Bell, CW, Stern, RS, Wilson, CB und Rosenblum, ML (1987)

Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas

Acta Neuropathol. (Berl) 75: 92-103

Sambrook, J, Fritsch, EF und Maniatis, T (1989)

Molecular cloning – a laboratory manual

2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schmiechen, R, Schneider, HH und Wachtel, H (1990)

Close correlation between behavioural response and binding *in vivo* for inhibitors of the rolipram-sensitive phosphodiesterase

Psychopharmacology 102, 17-20

Schneider, HH, Schmiechen, R, Brezinski, M und Seidler, J (1986)

Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain-protein structures

Eur. J. Pharmacol 127(1-2), 105-115

Scotland, G, Beard, M, Erdogan, S, Huston, E, McCallum, F, MacKenzie, SJ, Peden, AH, Pooley, L, Rena, NG, Ross, AH, Yarwood, SJ und Houslay, MD (1998)

Intracellular compartmentalization of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases

Methods: A Companion to Methods in Enzymology 14, 65-79

Seidler, NW, Jona, I, Vegh, M und Martonosi, A (1989)

Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup> ATPase of sarcoplasmic reticulum

Journal of Biological Chemistry 264(30), 17816-17823

Shakur, Y, Pryde, JG und Houslay, M (1993)

Engineered deletion of the unique N-terminal domain of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 prevents plasma membrane association and the attainment of enhanced thermostability without altering its sensitivity to inhibition by rolipram

Biochem. J. 292, 677-686

Shao, Y und McCarthy, KD (1994)

Plasticity of astrocytes

Glia 11(2), 147-155

Shooter, EM (1991)

In: Spencer, EM (editor)

Modern concepts of insulin-like growth factors, 297-307

Elsevier, New York

Sigma (1999)

FLAG mammalian transient expression system (manual)

Sigma-Aldrich

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (Handbook)

[http://www.sigmaaldrich.com/sigma/rbi-handbook/sg\\_ls\\_cs\\_rbibook\\_cycnucphos.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/sigma/rbi-handbook/sg_ls_cs_rbibook_cycnucphos.pdf),

156-158

Simmons, ML und Murphy, S (1995)

Second-messenger systems

In: Kettenmann, H und Ransom, BR (editors)

Neuroglia, 500-509

Oxford University Press

Skehan, P, Storeng, R, Scudiero, D, Monks, A, McMahon, J, Vistica, D, Warren, JT, Bokesch, H, Kenney, S und Boyd, MR (1990)

New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening

J. Natl. Cancer Inst. 82(13), 1107-1112

Sonnenburg, WK, Rybalkin, SD, Bornfeldt, KE, Kwak, KS, Rybalkina, IG und Beavo, JA (1998)

Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase

Methods: A Companion to Methods in Enzymology 14, 3-19

Stinson, SF, Alley, MC, Kopp, WC, Fiebig, HH, Mullendore, LA, Pittman, AF, Kenney, S, Keller, J und Boyd, MR (1992)

Morphological and immunocytochemical characteristics of human tumor cell lines for use in a disease-oriented anticancer drug screen

Anticancer Research 12: 1035-1054

Stryer, L (1996)

Biochemie

4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

Stuart, GW, Searle, PF, Chen, HY, Brinster, RL und Palmiter, RD (1984)

A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene

PNAS 81(23), 7318-7322

Stummer, W, Stocker, S, Novotny, A, Heimann, A, Sauer, O, Kempfski, O, Plesnila, N, Wietzorrek, J und Reulen, HJ (1998)

*In vitro* and *in vivo* porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 45, 160-169



Stummer, W und Baumgartner, R (2000)

Fluorescence-guided resection of malignant gliomas utilising 5-ALA-induced porphyrins

Photodynamics 3, 6-7

Stummer, W, Novotny, A, Stepp, H, Goetz, C, Bise, K und Reulen, HJ (2000)

Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients

J. Neurosurg 93(6), 1003-1013

Stummer, W und Reulen, HJ (2001)

Prospektiv-randomisierte Studie zur fluoreszenzgestützten Resektion maligner Gliome mit 5-Aminolävulinsäure

MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks, 183-186

© by Tumorzentrum München

Sturgess, I und Searle, GF (1990)

The acute toxic effect of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on plasma osmolality

Brit. J. Clin. Pharmacol. 29, 369-371

Sunahara, RK, Dessauer, CW und Gilman, AG (1996)

Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 461-480

Trojan, J, Blossey, BK, Johnson, TR, Rudin, SD, Tykocinski, M, Ilan, J und Ilan, J (1992)

Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I

PNAS 89(11), 4874-4878

Trojan, J, Johnson, TR, Rudin, SD, Ilan, J, Tykocinski, ML und Ilan, J (1993)

Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA

Science 259, 94-96

Tully, T und Quinn, WG (1985)

Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*

J. Comp. Physiol. 157, 263-277

Universität Birmingham, Neurochirurgie

University of Birmingham, Department of Neurosurgery

CNS Tumours

<http://medweb.bham.ac.uk./neurosurgery/cnstumour.html>

van Staveren, WCG, Markerink-van Ittersum, M, Steinbusch, HWM und de Vente, J (2001)

The effects of phosphodiesterase inhibition on cyclic GMP and cyclic AMP accumulation in the hippocampus of the rat

Brain Research 888, 275-286

Verkhratsky, A, Orkand, RK und Kettenmann, H (1998)

Glial calcium: Homeostasis and signalling function

Physiological Reviews 78, 99-141

Vogelbaum, MA, Tong, JX, Higashikubo, R, Gutmann, DH und Rich, KM (1998)

Transfection of C6 glioma cells with the bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosine arabinoside

J. Neurosurg 88(1), 99-105

Wachtel, H (1982)

Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3', 5' monophosphate phosphodiesterase inhibitors

Psychopharmacology 77, 309-316

Wachtel, H und Schneider, HH (1986)

Rolipram, a novel antidepressant drug, reverses the hypothermia and hypokinesia of monoamine-depleted mice by an action beyond postsynaptic monoamine receptors

Neuropharmacology 25, 1119-1126

Wagener, C (1999)

Molekulare Onkologie – Entstehung und Progression maligner Tumoren

2. Auflage, Thieme-Verlag

Wagner, B, Jakobs, S, Habermeyer, M, Hippe, F, Cho-Chung, YS, Eisenbrand, G und Marko, D (2002)

7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine, a potent inhibitor of cAMP-specific phosphodiesterase, enhancing nuclear protein binding to the CRE consensus sequence in human tumour cells

Biochemical Pharmacology 63, 659-668

Wang, JH, Teo, TS, Ho, HC und Stevens, FC (1975)

Bovine heart protein activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase

Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 179-194

Wang, JH und Waisman, DM (1979)

Calmodulin an its role in the second-messenger system

Curr. Top. Cell Regul. 15, 47-107

Wilson, M, Sullivan, M, Brown, N und Houslay, MD (1994)

Purification, characterization and analysis of rolipram inhibition of a human-type-IV(A) cyclic AMP-specific phosphodiesterase expressed in yeast

Biochem. J. 304, 407-415

Wolfe, RA, Sato, GH und McClure, DB (1980)

Continuous culture of rat C6 glioma in serum-free medium

Journal of Cell Biology 87, 434-441

Wolff, JF, Fisher, LJ, Xu, L, Jinnah, HA, Langlais, PJ, Iuvone, PM, O'Malley, KL, Rosenberg, MB, Shimohama, S, Friedmann, T und Gage, FH (1989)

Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson's disease

PNAS 86, 9011-9014

Wu, M-L, Kao, E-F, Liu, I-H, Wang, B-S und Lin-Shiau, S-Y (1997)  
Capacitative  $Ca^{2+}$  influx in glial cells is inhibited by glycolytic inhibitors  
*Glia* 21, 315-326

Wu, M-L, Chen, W-H, Liu, I-H, Tseng, C-D und Wang, S-M (1999)  
A novel effect of cyclic AMP on capacitative  $Ca^{2+}$  entry in cultured rat cerebellar astrocytes  
*Journal of Neurochemistry* 73(3), 1318-1328

Yan, C, Zhao, AZ, Bentley, JK, Loughney, K, Ferguson, K und Beavo, JA (1995)  
Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons  
*PNAS* 92, 9677-9681

Yan, C, Zhao, AZ, Bentley, JK und Beavo, JA (1996)  
The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner  
*Journal of Biological Chemistry* 271 (41), 25699-25706

Yu, J, Wolda, SL, Frazier, ALB, Florio, VA, Martins, TJ, Snyder, PB, Harris, EAS, McCaw, KN, Farrell, CA, Steiner, B, Bentley, JK, Beavo, JA, Ferguson, K und Gelinas, R (1997)  
Identification and characterisation of a human calmodulin-stimulated phosphodiesterase PDE1B1  
*Cell. Signal.* 9(7), 519-529

Zhang, K, Farooqui, SM und O'Donnell, JM (1999)  
Ontogeny of rolipram-sensitive, low  $K_m$ , cyclic AMP-specific phosphodiesterase in rat brain  
*Developmental Brain Research* 112, 11-19

Zhao, AZ, Yan, C, Sonnenburg, WK und Beavo, JA (1997)  
Recent advances in the study of  $Ca^{2+}$ /CaM-activated phosphodiesterases  
*Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 31, 237-251

## Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

- S. Vatter, G. Pahlke und G. Eisenbrand (2002)  
Expression of calmodulin-sensitive phosphodiesterase in a rat CNS tumour cell line and non-malignant astrocytes  
Eur J Cancer 38, Suppl. 7, Abstract No. 349, S.104  
14<sup>th</sup> EORTC-NCI-AACR 2002 Meeting on „Molecular Targets and Cancer Therapeutics“, 19.-22.11.2002 in Frankfurt am Main
  - K.-H. Merz, N. Graf v. Keyserlingk, S. Vatter, M. Habermeyer und G. Eisenbrand (2002)  
Novel pteridine-based inhibitors of cAMP phosphodiesterases: promising antineoplastic agents  
Eur J Cancer 38, Suppl. 7, Abstract No. 423, S.127  
14<sup>th</sup> EORTC-NCI-AACR 2002 Meeting on „Molecular Targets and Cancer Therapeutics“, 19.-22.11.2002 in Frankfurt am Main
  - S. Vatter, G. Pahlke und G. Eisenbrand (2003)  
Comparison of phosphodiesterase 1 expression in malignant and non-malignant CNS cells of human and rat  
wird veröffentlicht in J Cancer Res Clin Oncol, Abstract No. 137  
12<sup>th</sup> International AEK Congress of the German Cancer Society 2003, 25.-28.3.2003 in Würzburg
  - S. Vatter, G. Pahlke, G. Eisenbrand, H.P. Schneider und J.W. Deitmer (2003)  
Phosphodiesterase expression and second messenger levels in two human glioblastoma cell lines  
Proceedings of the 29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Abstract No. 707, S. 750, Georg Thieme-Verlag  
29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, 12.-15.6.2003 in Göttingen
-

## Dank

- Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die anregenden Diskussionen sowie seine wohlwollende Unterstützung während meiner Promotionszeit.
  - Bei Herrn Prof. Dr. Joachim W. Deitmer möchte ich mich für sein ständiges Interesse, seine Unterstützung und die wertvollen Anregungen bedanken. Weiterhin danke ich Prof. Deitmer für die Möglichkeit, mich in seiner Abteilung in die Geheimnisse des Ca<sup>2+</sup>-Signallings zu vertiefen.
  - Herrn Prof. Dr. Eckhard Friauf danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
  - Frau Dr. Gudrun Pahlke danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen in praktischen und theoretischen Fragen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.
  - Weiterhin möchte ich mich bei meiner Studienfreundin Dr. Silke Jung sowie Dr. Christian Lohr und Dr. Karl-Heinz Merz für das sorgfältige und zügige Korrekturlesen einzelner Kapitel dieser Arbeit und ihre wertvollen Anregungen bedanken.
  - Ein herzliches Dankeschön gilt der „Bau 56-Crew“: Michael Habermeyer, Dr. Sandra Jakobs, Dr. Monika Kemény, Melanie Kern, Dr. Doris Marko, Sabine Meditz, Dr. Gudrun Pahlke, Nicole Puppel, Zeina Tjaden (AK Eisenbrand), Anni Baumgart, Dr. Silke Conrad, Dr. Ragna Hussong, Steffi Knerr, Dr. Judith Racky, Dr. Hans Schmitz (AK Schrenk) und Martin Hossann (AK Trommer) für die tolle Zusammenarbeit und die netten Gespräche.
  - Besonders danken möchte ich Melanie, Michael, Monika und Sandra für ihre Unterstützung und das tolle Arbeitsklima im Labor, die gemeinsamen Unternehmungen - einfach für alles!
  - Meinen Forschungspraktikanten und Diplomanden Sandra Anbari, Steffi Knerr, Melanie Kern sowie Jochen Schröder danke ich für die engagierte Bearbeitung einzelner Teilaspekte dieser Arbeit.
  - Ein großes Dankeschön geht an Sandra Bergstein und Hans-Peter Schneider (AK Deitmer) für die immer einwandfrei funktionierende Übergabe der Ratten-Astrocyten und die kompetente Einarbeitung in die Ca<sup>2+</sup>-Messung sowie die stete Hilfsbereitschaft.
  - Frau Vera Fritzingler danke ich ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Karyotypisierung der SNB75-Zellen. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Heinrich Zankl, der diese Messungen ermöglichte.
-

- Für die Mitbenutzung diverser Zentrifugen, Waagen und anderer Geräte sowie die zeitweise Nutzung des Radiolabors danke ich den Arbeitskreisen Schrenk und Trommer.
  - Herrn Prof. Dr. Heinrich Fock danke ich für die Möglichkeit, bei Engpässen den Szintillationszähler seiner Abteilung zu benutzen. Dabei geht ein besonderes Dankeschön an Herrn Klaus Klug, der das Gerät immer wieder zum Laufen gebracht und mir viele nützliche Tips gegeben hat.
  - Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitskreise Eisenbrand und Deitmer für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt unseren beiden Sekretärinnen Ingrid Hemm und Heike Syring für ihre Hilfe.
  - Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern ganz herzlich für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotionszeit.
-

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Name und Anschrift:** Sandra Vatter  
Wolfsangel 17  
67663 Kaiserslautern

**Geburtsdatum:** 24.07.1972

**Geburtsort:** Kaiserslautern

**Familienstand:** ledig

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### Schulische Ausbildung:

08/79 – 07/83 Besuch der Pestalozzi-Grundschule in Kaiserslautern

08/83 – 06/92 Besuch des St.-Franziskus-Gymnasiums in Kaiserslautern  
Abitur am 23.06.92  
*Thema der Facharbeit:* “Lernverhalten (Dressur) von Rennmäusen”

### Hochschulausbildung:

10/92 – 03/98 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern  
Vordiplom am 10.10.94  
Diplom am 30.03.98  
*Thema der Diplomarbeit:* “Die Rolle der Photorespiration und der Mehler-Peroxidase-Reaktion als Energieentwertungsmechanismen in trockengestreßten *Triticum aestivum* und *Triticum kotschy*”

08/95 – 03/98 Arbeit als studentische Hilfskraft im Tierhaus der Universität Kaiserslautern mit 4 Wochenstunden

01.04.98 – 15.06.98 Forschungspraktikum in der Abteilung Genetik an der Universität Kaiserslautern

01.11.98 – 30.11.99 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie (Abteilung Molekulare Pathologie) der Universität Tübingen

01.12.99 – dato Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Lebensmittelchemie/Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern

---