

**Die veränderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der  
Resistenzentwicklung von kleinzelligen als auch nicht-  
kleinzelligen Lungenkarzinomzellen auf die Behandlung mit  
Cisplatin**

Kathrin Schrödl

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die veränderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der  
Resistenzentwicklung von kleinzelligen als auch nicht-  
kleinzelligen Lungenkarzinomzellen auf die Behandlung mit  
Cisplatin**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kathrin Schrödl  
aus  
Ingolstadt  
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Rudolf M. Huber

Mitberichterstatter:  
Prof. Dr. med. Rolf Issels  
PD Dr. med. Dominik Rüttinger, F.A.C.S.  
Prof. Dr. med. Rudolf Hatz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr.med. A. Bergner

Dekan: Prof. Dr.med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Zielsetzung und Fragestellung .....	4
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>5</b>
2.1 Material.....	5
2.1.1 Tumorzelllinien.....	5
2.1.2 Zellkultur .....	5
2.1.3 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin.....	5
2.1.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging.....	5
2.1.5 Western Blot .....	6
2.1.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	7
2.1.7 Small interfering (si) RNA Transfektion .....	7
2.1.8 Statistik .....	7
2.2 Methoden.....	7
2.2.1 Zellkultur .....	7
2.2.1.1 Verwendete Tumorzelllinien .....	7
2.2.2 Kulturbedingungen .....	8
2.2.2.1 Herstellung der Grundmedien.....	8
2.2.2.2 Kultivierung der Tumorzelllinien.....	8
2.2.3 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin.....	9
2.2.3.1 Relative Resistenzentwicklung durch wiederholte Cisplatin-Inkubation.....	9
2.2.3.2 Relative Resistenzentwicklung durch Inkubation mit BAPTA-AM.....	11
2.2.4 $\text{Ca}^{2+}$ Imaging .....	12
2.2.4.1 Fluoreszenzfärbung mit Fluo-4 AM.....	12
2.2.4.2 ATP induziertes $\text{Ca}^{2+}$ Signaling mit/ohne extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ .....	13
2.2.4.2 SERCA 1/2/3 Inhibition mit Cyclopiazonic Acid.....	13
2.2.5 Western Blot .....	14
2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	16
2.2.7 Small interfering (si) RNA Transfektion .....	17
2.2.7.1 Einfluss der siRNA Transfektion auf die Behandlung mit Cisplatin.....	19
2.2.8 Statistik .....	19
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
3.1 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin .....	20
3.1.1 Relative Resistenzentwicklung durch wiederholte Cisplatin-Inkubation .....	20
3.1.2 Relative Resistenzentwicklung durch Inkubation mit BAPTA-AM .....	22
3.2 $\text{Ca}^{2+}$ Imaging .....	24
3.2.1 ATP induziertes $\text{Ca}^{2+}$ Signaling mit/ ohne extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ .....	24
3.2.1.1 $\text{Ca}^{2+}$ Signaling bei Stimulation mit 1mM ATP .....	24
3.2.1.2 ATP induziertem $\text{Ca}^{2+}$ Signaling mit/ ohne extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ .....	25
3.2.2 SERCA 1/2/3 Inhibition mit Cyclopiazonic Acid .....	27
3.3 Western Blot .....	28
3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	30
3.5 Small interfering (si) RNA Transfektion .....	31
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>33</b>
4.1 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin .....	33
4.2 $\text{Ca}^{2+}$ Imaging .....	34
4.3 Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung.....	36
4.4 siRNA Transfektion .....	43

4.5 Zusammenhang zwischen der verminderten intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und der Apoptoseresistenz und die klinische Relevanz der Ergebnisse .....	44
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>46</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>54</b>
<b>8. Curriculum Vitae.....</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Übersicht über die für EPLC 32M1 und H1339 spezifischen Angaben zu Elektrophorese, Blotting und Antikörperverdünnung.....	16
Tabelle 2:	Versuchsgruppen der siRNA Transfektion.....	17

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1:	Die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase.....	2
Abbildung 1.2:	Calcium als Signalmolekül bei Apoptoseinduktion und Zellproliferation.....	3
Abbildung 3.1:	Erstexposition der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cisplatin.....	20
Abbildung 3.2:	Darstellung des Verleichs der Überlebensfraktionen der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den naiven Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 nach Behandlung mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cisplatin.....	21
Abbildung 3.3:	Vergleich der Überlebenskurven der naiven Zellen mit den BAPTA-AM vorbehandelten Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 nach Inkubation mit Cisplatin der Konzentration 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	23
Abbildung 3.4:	Die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase.....	24
Abbildung 3.5:	$\text{Ca}^{2+}$ Signaling bei Stimulation mit 1mM ATP uns extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ .....	25
Abbildung 3.6:	Fluoreszenzanstieg bei Stimulation der naiven sowie teilresistenten Zellklone der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 mit 1mM ATP mit bzw. ohne extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ .....	.26

Abbildung 3.7:	Ca <sup>2+</sup> Signaling in EPLC 32M1 und H1339 nach Stimulation mir 30µM CPA.....	27
Abbildung 3.8:	Versuchsergebnisse Western Blot.....	28
Abbildung 3.9:	Graphische Darstellung der Western Blot Ergebnisse.....	29
Abbildung 3.10:	Übersicht über die Versuchsergebnisse der indirekten Immun-fluoreszenzfärbung.....	30
Abbildung 3.11:	Überlebenskurven der mit siRNA vorbehandelten Zellen nach Inkubation mit 0,5µg/ml Cisplatin.....	32

## **1. Einleitung**

### **1.1 Einleitung**

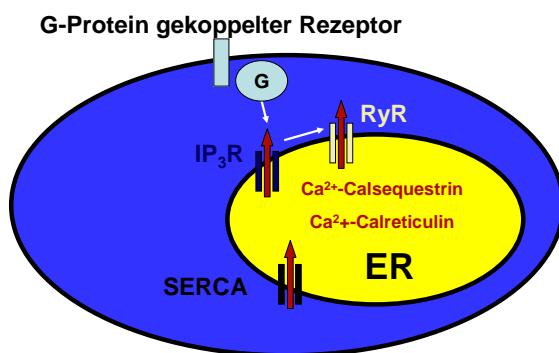
Im weltweiten Vergleich ist das Lungenkarzinom die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung (2) und steht darüber hinaus in den USA an erster Stelle der Krebstodesursachen sowohl bei Männern als auch bei Frauen (36). Grundlegender Bestandteil der multimodalen Lungenkarzinomtherapie ist die Chemotherapie. Trotz Fortschritten in der Effizienz der Tumortherapie kann zwar die Lebensqualität verbessert werden; dies gilt jedoch nicht in relevantem Ausmaß für das Langzeitüberleben (1;21;53). Die First-Line-Chemotherapie führt häufig zu hohen Remissionsraten, allerdings kommt es im weiteren Behandlungsverlauf, insbesondere im Stadium der Second-Line-Therapie, zu einer Verschlechterung der Ergebnisse infolge einer Resistenzentwicklung auf die Chemotherapie. Die in großen Tumorzentren durchgeföhrten Chemotherapieprotokolle basieren sowohl bei kleinzelligen (SCLC) als auch bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) in der Regel auf platinsalzhaltigen Kombinationstherapien (1;42;43;51). Die Wirkung von Cisplatin beruht nach allgemeiner Ansicht auf der intra- und inter-Strang DNA Basenpaarvernetzung (26;79). Dennoch zeigen mehrere Studienergebnisse keine Korrelation zwischen DNA-Adduktbildung und Cisplatin-Zytotoxizität (13;62;75). Mandic et al. gehen sogar weit über diese Ergebnisse hinaus und beschreiben einen Cisplatin induzierten Apoptoseweg ohne DNA-Schädigung in kernlosen Zytoblasten mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) als nicht-nuklearem Angriffspunkt (52). Hieraus wird ersichtlich, dass die momentane Datenlage nicht ausreichend ist, um den genauen, durch Cisplatin induzierten, Apoptosemechanismus aufzudecken. Da die Cisplatin-Resistenzentwicklung häufig den lebenslimitierenden Faktor der Patienten darstellt, wurden zahlreiche Studien zur Erforschung der Problematik durchgeführt. Über 100 beteiligte Proteine und unterschiedlichste Mechanismen, wie zum Beispiel abnehmende Tumorblutzufuhr, extrazelluläre Bedingungen, verminderte Cisplatin-Aufnahme, vermehrter Efflux, intrazelluläre Detoxifikation durch Glutathion, verminderte Cisplatin-Bindung, DNA Reparatur, verminderter Mismatch-Repair, defekte Apoptose, antiapoptotische Faktoren, veränderte Signaltransduktion oder die Anwesenheit von ruhenden non-cycling Zellen wurden analysiert und beschrieben (3;11;71). Trotz aller gewonnenen Fortschritte konnten bisher noch keine klinisch relevanten Proteine oder Mechanismen der Cisplatinresistenzentwicklung in Tumorzellen identifiziert werden. Daher stellt sich nach wie vor die Problematik der Cisplatin-Resistenzentwicklung in Lungenkarzinomzellen.

Das im Zentrum dieser Arbeit stehende Calcium ist ein ubiquitär vorkommender Signaltransducer, der nahezu alle Aspekte des zellulären Lebens beeinflusst, darunter auch

die Regulierung grundlegender Prozesse wie Gentranskription, Stoffwechsel, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (7;8;19;56). Die Universalität des Calciums als intrazellulärer Second-Messenger beruht auf seiner enormen Vielseitigkeit. Diese wiederum basiert auf einem Calcium-Signaling-Toolkit mit zahlreichen Komponenten, die einander unterschiedlich angepasst werden können (9). Die in dieser Arbeit untersuchte intrazelluläre Calcium-Homöostase hat im Wesentlichen folgende Grundlagen:

Die zytosolische Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  beträgt ca.  $0,1\mu M$  (41). Der größte Anteil intrazellulären Calciums befindet sich in den Calciumspeichern Mitochondrien, Golgi-Apparat und dem wichtigsten und größten Speicher dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Das ER ist die Hauptquelle an intrazellulär freigesetztem Calcium und hat deutlich höhere Calciumkonzentrationen von  $[Ca^{2+}]_{ER} = 1,0\mu M - 5mM$  (41). Calcium wird mittels der Sarco/Endoplasmatischen Retikulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA) ATP abhängig in das ER gepumpt. SERCA Proteine werden durch drei Gene kodiert, sodass die Hauptisoformen SERCA 1, SERCA 2a, SERCA 2b und SERCA 3 daraus hervorgehen (9;41), durch alternatives Splicing entstehen mehr als zehn verschiedene den Hauptgruppen untergeordnete Isoformen (61). Die Freisetzung von Calcium aus dem ER erfolgt über einen basalen Leckstrom über die Membran des ER, eine allerdings physiologisch relevantere Calcium-Freisetzung erfolgt über die Aktivierung der Calcium-Kanäle Inositoltriphosphat-Rezeptoren ( $IP_3R$  1/2/3) als auch Ryanodine-Rezeptoren (RYR 1/2/3). Beide Kanalproteine werden durch jeweils drei Gene kodiert, welche jeweils eine spezifische Isoform erzeugen (9;41). Die Aktivierung der  $IP_3R$  1/2/3 erfolgt über die Bindung von  $IP_3$ , hergestellt durch eine G-Protein-gekoppelter rezeptorregulierte Phospholipase C  $\beta$ , die  $IP_3$  aus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat erzeugt. Das dadurch ausströmende  $Ca^{2+}$  führt zu einem Calcium-induziertem Calcium Ausstrom über die RYR-Rezeptoren. Calcium ist innerhalb des ER an die Calcium-Bindepoteine Calsequestrin als auch Calretikulin gebunden, da das freie divalente Kation zu einer Inhibition der SERCA-Pumpe führen würde (41). In Abbildung 1.1 werden die oben beschriebenen intrazellulären Calcium-Prozesse schematisch dargestellt.

Abbildung 1.1: Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase



Die grundlegende Bedeutung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes zeigt sich zum Einen bei der Apoptoseinduktion, zum anderen auch bei der Initiierung der Zellproliferation. Der Vorgang der Apoptoseinduktion soll anhand Abbildung 1.2 erklärt werden.

**Abbildung 1.2: Calcium als Signal-Molekül bei Apoptoseinduktion und Zellproliferation (54)**

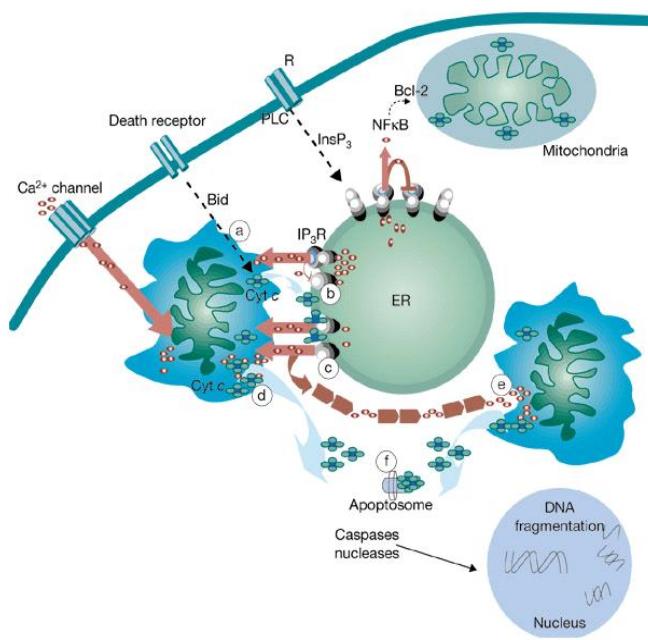


Abbildung 1.2. Entnommen aus Mattson et.al, 2003(54). Initial wird die Zelle einem Apoptosestimulus ausgesetzt. In dieser Abbildung sind zwei Apoptosestimuli dargestellt: einerseits Calciumeinstrom durch die Plasmamembrankanäle, andererseits durch die Aktivierung von auf der Zelloberfläche befindlichen Todesrezeptoren. Der Todesstimulus induziert die Öffnung einer sog. Permeability-Transition-Pore in der Membran eines angrenzenden Mitochondrions, woraus die Freisetzung von Cytochrom c resultiert. (a) Cytochrom c diffundiert zum angrenzenden ER und bindet an die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (b). Es kommt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (c) was zu einem globalen Anstieg des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  führt (d). Daraus resultiert eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in der gesamten Zelle mit einer simultanen Freisetzung von Cytochrom c aus allen Mitochondrien der Zelle (e). Cytochrom c in der Zelle aktiviert die Formation eines Apoptosomes in welchem Caspassen aktiviert werden (f). Caspassen und Nukleasen vervollständigen den Zelltod durch Spaltung von Proteinen und DNA (24;54;56). Die Freisetzung von Calcium kann einerseits ein Signal für die Durchführung der Apoptose sein, andererseits können auch für das Zellüberleben wichtige Proteine wie der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert werden.

Die Zellproliferation ist assoziiert mit einem Anstieg des zytosolischen Calciums aufgrund einer 1.) erhöhten Erregbarkeit von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 nach IP<sub>3</sub> Bindung; 2.) erhöhter Aktivität von speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sowie spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen; 3.) einer verminderten Entfernung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch Inhibition der SERCA-Pumpe bzw. der Inhibition der Plasmamembran-  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, welche Calcium aus dem Zytosol in den Extrazellulärtraum pumpt. Der Calciumanstieg aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT (Nuklear Factor of Activated T lymphocytes) – dies führt sowohl zu einem hypertrophen Wachstum, als auch zu einer Progression des Zellzyklus und vermittelt somit die Proliferation (46;47).

Bisher haben nur wenige Studien die Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der Cisplatin-Resistenzentwicklung untersucht. Liang et al. untersuchten die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zusammenhang mit der Cisplatin-Resistenz in humanen bronchialen Adenokarzinomzellen A<sub>549</sub> (45). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der resistenten Zelllinie im Vergleich mit der naiven, sensiblen Zelllinie um das dreifache vermindert war. Diese verminderte Konzentration wiederum stimuliert über weitere Signalprozesse die Aktivität des P-Glykoproteins welches Cisplatin aus den Zellen pumpt.

Ferrari et al. beschreiben, dass Zellen für eine Apoptoseinduktion durch Ceramide sensibilisiert werden können (27), was durch aus dem endoplasmatischen Retikulum entlassenes  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt. Des weiteren konnte die Involvierung von  $\text{IP}_3\text{R}$  in der ER Membran in diesem Sensibilisierungsprozess nachgewiesen werden, da  $\text{IP}_3\text{R1}$  defiziente Lymphozyten eine Resistenz auf ein großes Spektrum an apoptoseinduzierenden Agenzien zeigten. Tsunoda et al. untersuchten die Cisplatinresistenz von Blasenkarzinomzellen (74). Die Autoren postulierten einen Zusammenhang zwischen der Resistenzentwicklung und einer reduzierten  $\text{IP}_3\text{R1}$  Expression. Darüber hinaus gelang es ihnen zu zeigen, dass es in naiven Zellen nach einmaliger Cisplatinexposition ebenfalls zu einer verminderten  $\text{IP}_3\text{R1}$  Expression kam. Im Jahr 2007 veröffentlichte Splettstoesser die These, dass Cisplatin konzentrationsabhängig die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration in HeLa-S3 Zellen, nicht aber in humanen Osteosarkom-Zellen, U2-Os, ansteigen lässt (69). Der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ - Anstieg war in HeLa -S3 Zellen abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration, getriggert durch einen Einstrom über die an der Plasmamembran befindlichen  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren. Dieser Effekt konnte für U2-Os Zellen nicht gezeigt werden. Betrachtet man die Studienergebnisse in ihrer Gesamtheit, zeigen sich Anhaltspunkte dafür, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase an der Resistenzentwicklung beteiligt ist. Dennoch sind die gewonnenen Daten widersprüchlich, weshalb bislang kein Konsens hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen erreicht werden konnte.

## 1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei der Cisplatin-Resistenzentwicklung in kleinzelligen (SCLC) als auch nicht-kleinzelligen (NSCLC) Lungenkarzinomzellen. Anhand eines Zellkultur Models mit kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen sollte zunächst die Cisplatin-Resistenzentwicklung *in vitro* nachvollzogen und anschließend die Calcium-Homöostase zwischen naiven und teilresistenten Zellklonen verglichen werden.

Hieraus ergab sich folgende Fragestellung:

Gibt es Unterschiede in der intrazellulären Calcium-Homöostase in naiven bzw. teilresistenten Zellklonen beider untersuchter Zelllinien und bejahendenfalls, welche molekularen Prozesse sind dafür verantwortlich? Ist die Resistenz darüber hinaus künstlich induzierbar oder reversibel?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tumorzelllinien

EPLC 32M1	Zur Verfügung gestellt von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität, Marburg
H1339	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland

#### 2.1.2 Zellkultur

VLE RPMI 1640 Medium (1x) w 2.0 g/l NaHCO w/o L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Newborn Calf Serum Heat inactivated	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
GIBCO Foetal Bovine Serum	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
L-Glutamine 200mM (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
GIBCO Fungizone Amphotericin B 250 UG/ML	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
Trypsin-EDTA (1x) 0,05%/0,02% in D-PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
50 ml Falcon Tubes	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
BD Falcon Tissue Culture Flask, 250ml Cauted Neck and 0,2 µm Vented Blue Plug Set	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
Hettich Zentrifugen Universal 16A	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Hettich Zentrifugen EBA 12R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank Heraeus Lamin Air	Fa. Schultheiss, München, Deutschland
Herasafe steril Flow	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland

#### 2.1.3 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin

Cis-Platin	Apotheke Großhadern, München, Deutschland
BABTA-AM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

#### 2.1.4 Ca<sup>2+</sup>-Imaging

flou-4 AM cell permeant	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Pluronic F-127	Calbiochem, La Jolla, CA
DMSO , Dimethylsulfoxid	Calbiochem, La Jolla, CA
Hank's Balanced Salts Modified 9,7g/L	Sigma-Aldrich
GIBCO HEPES 1M	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
Sodium hydroxide	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt (ATP)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
EDTA 0,02% Solution Prepared in DPBS without Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cyclopiazonic acid from Penicillium cyclopium	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tissue culture dish 35x10mm	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
digitale CCD Kamera	Axiocam M.Rm, Carl Zeiss Vision, München, Deutschland
Scion-Image	Scion Corporation, Frederick, USA

## 2.1.5 Western Blot

Dulbecos PBS without Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA 0,02% Solution Prepared in DPBS without Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Proteo Extract® Native Membrane Protein Extraction Kit	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Q proteome™ Mammalian Protein Prep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Non-interfering Protein Assay Kit	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Laemmli Sample Buffer	Bio-rad Laboratories, Hercules, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel 1,5mm	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
NuPAGE® Tris-Acetate Gel 1,5mm	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
HiMark™ Pre-Stained High Molecular Weight Protein Standard	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
Novex® Tris-Acetate SDS Running Buffer	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
10x Tris-Buffered Saline (10x TBS)	Bio-rad Laboratories, Hercules, USA
10% Tween 20 Solution	Bio-rad Laboratories, Hercules, USA
Fluka BioChemika Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Calregulin (T-19) Goat polyclonal Antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
SERCA 1/2/3 (H-300) Rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
IP <sub>3</sub> R I/II/III (H-300) Rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
β-Actin Antibody (HRP) mouse monoclonal to beta Actin	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey anti-goat IgG –HRP sc – 2020	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
ECL Anti-rabbit IgG, peroxidise-linked species-specific whole antibody (from donkey)	Amersham Biosciences, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Immun-Star™ Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP conjugate	Bio-rad Laboratories, Hercules, USA
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Amersham Biosciences Hypercassette (Filmkassette)	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
AGFA Rapid Fixer For medical x-ray processing	AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
AGFA Developer For curix x-ray film processing	AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
XCell SureLock™ Mini-Cell For leak-free electrophoresis of mini-gels	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
XCell II™ Blot Module Kit	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
Criterion Blotting Sandwiches 0,45µm Nitrocellulose with Filter paper	Bio-rad Laboratories, Hercules, USA
Hettich Zentrifugen Universal 16A	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2,0ml	Original Eppendorf
Hettich Zentrifugen EBA 12R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Schüttler	Heidolph InstrumentsGmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Image J	Public domain / Freie Software

## 2.1.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Thermo Scientific Objekträger	Menzel-Gläser, Menzel GmbH &CoKG, Braunschweig, Deutschland
Tissue Culture Dish 100x20mm Style	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
Aceton	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
IP <sub>3</sub> R I/II/III (H-300) Rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
SERCA 1/2/3 (H-300) Rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Goat anti-rabbit IgG-FITC sc – 2012	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

## 2.1.7 Small interfering (si) RNA Transfektion

D-001810-01-05 5mmol On Target plus siControl Non targeting siRNA HI	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
T-2002-01 0,2ml Dharma-FECT2 Transfection Reagent	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-006113-00 5nmol siRNA ATP2A1	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-004082-00 5nmol siRNA ATP2A2	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-006114-00 5nmol siRNA ATP2A3	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-006207-00 5nmol siRNA ITPR1	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-006208-00 5nmol siRNA ITPR2	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
L-006209-00 5nmol siRNA ITPR3	Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA
BD Falcon Kulturflaschen 25cm	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA

## 2.1.8 Statistik

Sigma Stat	Jandel Scientific, Chicago, IL, USA
------------	-------------------------------------

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Verwendete Tumorzelllinien

Tumorzelllinie EPLC - 32 M1 (Epidermoid Lung Cancer):

Die Tumorzelllinie EPLC – 32 M1 wurde von einem Patienten mit mittelmäßig differenziertem Plattenepithelkarzinom der Lunge, der zuvor nicht chemotherapeutisch behandelt wurde, gewonnen und von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität, Marburg, zur Verfügung gestellt. Die epitheloidförmigen Zellen zeigen ein adhärentes Wachstum. Morphologisch sind die Zellen gekennzeichnet durch einen Kern, welcher ein regelmäßiges Chromatinmuster aufweist, sowie eine perinukleäre Granulation mit zwei oder mehr Nukleoli. Die Generationszeit der

Zelllinie liegt zwischen 16 und 20 Stunden und die Kolonieformationseffizienz bei 5,12%. Die Zellen exprimieren das c-myc Onkogen sowie die biochemischen Marker NSE, hCG und EGFR. Die Tumorzellen produzieren pro-Cathepsin L, den Prekuror der lysosomalen Cystein-Protease und Cathepsin B. Immunhistochemisch wurden Glukokortikoid-Rezeptoren nachgewiesen. Die Zelllinie wurde mit GFP (Green Fluorescence Protein) transfiziert. (Die oben genannten zellspezifischen Informationen wurden von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität, Marburg zur Verfügung gestellt.). GFP ist ein aus der Qualle Aequorea Victoria stammendes Protein, dass durch Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (73).

Tumorzelllinie H1339 (Small Cell Lung Cancer):

Die Tumorzelllinie H1339 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ GmbH bezogen. Die Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss einer 49-jährigen Patientin 1986 vor der Behandlung des metastasierten kleinzelligen Lungenkarzinoms gewonnen. Die Patientin reagierte im weiteren Verlauf nur sehr beschränkt auf die chemotherapeutische Behandlung. Die epitheloidförmigen Zellen wachsen adhärent in Monolayern. Die Generationszeit der Zelllinie liegt bei 50 bis 90 Stunden. Immunhistochemisch ist die Zelllinie negativ auf Cytokeratin, Cytokeratin-7, Cytokeratin-8, Cytokeratin-17, Cytokeratin-18, Desmin, Endothel, GFAF und Neurofilament. Die Zelllinie ist Vimentin positiv. Die Zelllinie ist nicht GFP transfiziert. (Herstellerinformationen DSMZ)

## **2.2.2 Kulturbedingungen**

### **2.2.2.1 Herstellung der Grundmedien**

Die Herstellung der Kulturmedien erfolgte steril unter einem Arbeitsplatzabzug. Das Kulturmedium der Tumorzelllinie EPLC 32M1 setzte sich zusammen aus 90% RPMI 1640, 10% NCS, 1% L-Glutamine, 0,48% Fungizone, 0,24% Penicillin/Streptomycin. Das Kulturmedium der Tumorzelllinie H1339 basierte auf 80% RPMI 1640 supplementiert mit 20% FBS, 1% L-Glutamine, 0,48% Fungizone, 0,24% Penicillin/Streptomycin.

### **2.2.2.2 Kultivierung der Tumorzelllinien**

Die bei -20°C gefrorenen Tumorzellen wurden unter steriles Arbeitsplatzabzug aufgetaut und mit jeweils 10 ml NCS versetzt und sorgfältig durchmischt. Im Anschluss erfolgte eine achtminütige Zentrifugation (800U) der Zellsuspension bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets mit 16ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend

wurden die Zellsuspensionen unter sterilen Arbeitsbedingungen in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gefüllt. Es folgte eine Kultivierung der Tumorzellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach ca. 24h konnte eine Adhärenz an die Kulturflaschen bei beiden Tumorzelllinien beobachtet werden. Um eine adäquate Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, erfolgten regelmäßige, alle 2 Tage stattfindende, Nährmedienwechsel. Sobald der Zellrasen ca. 2/3 der Kulturflaschenfläche bedeckte, wurden die Zellen gesplittet. Nach Abnahme des alten Nährmediums wurde die Kulturflasche mit 3ml Trypsin-EDTA Lösung (0,05% /0,02% in D-PBS) versetzt und zur Reaktionsbeschleunigung für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml NCS gestoppt. Das NCS/Zellgemisch wurde in 50ml Falcon Tubes gefüllt und ca. 8 Minuten bei 1200 U zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde mit 10ml des zellspezifischen Kulturmediums gelöst.

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauerzählkammer verwendet. Die Zählkammer wurde mit 10µl Zellsuspension gefüllt. Anschließend erfolgte unter dem Lichtmikroskop die Auszählung der äußeren Quadranten 4x16 Felder. Die Zellzahl/ml wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl der äußeren Quadranten} / 4 \times 10000 = \text{Zellzahl / ml}$$

Zur Weiterkultivierung wurden ca. 500000 Zellen pro Kulturflasche neu ausgesät.

## 2.2.3 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin

### 2.2.3.1 Relative Resistenzentwicklung durch wiederholte Cisplatin-Inkubation

Dieser Versuch wurde für die Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 analog durchgeführt.

Zur Simulation einer Chemotherapie mit fünf Zyklen Cisplatin erfolgte anschließender Versuchsaufbau.

#### 1. Zyklus:

Am Tag (-1) wurden pro Zelllinie 16 Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) mit jeweils 300000 Tumorzellen angelegt. Die Zellen wurden anschließend 24h im Brutschrank inkubiert. Am Tag (0) wurden vier Gruppen aus jeweils vier Kulturflaschen gebildet:

1. Gruppe: 0-Kontrolle
2. Gruppe: 0,5µg/ml Cisplatin
3. Gruppe: 1,0µg/ml Cisplatin
4. Gruppe: 2,0µg/ml Cisplatin

Nach Abnahme des alten Nährmediums wurden die Zellen entsprechend ihrer Gruppen, d.h. Gruppe 1 als 0-Kontrolle mit 10ml reinem Nährmedium behandelt, Gruppe 2 mit 10ml einer 0,5 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung, Gruppe 3 mit 10ml einer 1,0 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung und Gruppe 4 mit 10ml einer 2,0 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung für 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die gewählten Konzentrationen, ebenso wie die Inkubationsdauer und Temperatur erfolgten analog der humanen *in vivo* Pharmakokinetik (23). Bei Patienten wurden nach Cisplatin-Chemotherapie Cisplatin-Plasmakonzentrationen von hauptsächlich 0,5 – 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin über ca. 3h nach Chemotherapie beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden von allen Gruppen die Nährmedien abgenommen und pro Kulturflasche 16ml neues Nährmedium aufgetragen.

Nach 24-stündiger Bebrütung erfolgte am Tag 1 nach Cisplatin-Exposition die Bestimmung der absoluten Zellzahl aus jeweils einer Kulturflasche der Gruppen 1-4 (die Zellzahlbestimmung wurde wie oben beschrieben durchgeführt). Nach weiterer 24-stündiger Bebrütung wurde dieser Vorgang an Tag 2 nach Cisplatin-Exposition wiederholt. Ebenso an Tag 3 und 4.

## 2.Zyklus

Nach einer Zellerholungszeit von 7 Tagen wurden im erneuten Zyklus am Tag (-1) pro Zelllinie 16 Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) mit jeweils 300000 Tumorzellen angelegt. Bei den Zellen der Gruppe 1 handelt es sich um naive nicht vorbehandelte Tumorzellen, bei den Zellen der Gruppe 2-4 um Zellen aus dem vorangegangenen Zyklus, die bereits einmalig mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin vorbehandelt waren. Alle Zellen wurden anschließend 24h im Brutschrank inkubiert. Am Tag (0) wurden 4 Gruppen aus jeweils 4 Kulturflaschen gebildet:

1. Gruppe: 0-Kontrolle
2. Gruppe: 0,5 $\mu$ g/ml + 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin
3. Gruppe: 0,5 $\mu$ g/ml + 1,0 $\mu$ g/ml Cisplatin
4. Gruppe: 0,5 $\mu$ g/ml + 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin

Nach Abnahme des alten Nährmediums wurden die Zellen entsprechend ihrer Gruppe, d.h. Gruppe 1 als 0-Kontrolle mit 10ml reinem Nährmedium behandelt, Gruppe 2 mit 10ml einer 0,5 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung, Gruppe 3 mit 10ml einer 1,0 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung und Gruppe 4 mit 10ml einer 2,0 $\mu$ g/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung für 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden von allen Gruppen die Nährmedien abgenommen und pro Kulturflasche 16ml neues Nährmedium aufgetragen.

Der weitere Verlauf erfolgt wie in Zyklus 1.

### 3. Zyklus:

Nach einer Zellerholungszeit von 7 Tagen wurden im erneuten Zyklus am Tag (-1) pro Zelllinie 16 Kulturflaschen ( $75\text{cm}^2$ ) mit jeweils 300000 Tumorzellen angelegt. Bei den Zellen der Gruppe 1 handelte es sich um naive nicht vorbehandelte Tumorzellen, bei den Zellen der Gruppe 2-4 um Zellen aus dem vorangegangenen Zyklus, die bereits zweimalig mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin vorbehandelt waren.

Der weitere Verlauf erfolgte analog zu dem 2. Zyklus.

### 4.Zyklus:

Nach einer Zellerholungszeit von 7 Tagen wurden im erneuten Zyklus am Tag (-1) pro Zelllinie 16 Kulturflaschen ( $75\text{cm}^2$ ) mit jeweils 300000 Tumorzellen angelegt. Bei den Zellen der Gruppe 1 handelt es sich um naive nicht vorbehandelte Tumorzellen, bei den Zellen der Gruppe 2-4 um Zellen aus dem vorangegangenen Zyklus, die bereits dreimalig mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin vorbehandelt waren.

Der weitere Verlauf erfolgte analog zu dem 3. Zyklus.

### 5. Zyklus:

Nach einer Zellerholungszeit von 7 Tagen wurden im erneuten Zyklus am Tag (-1) pro Zelllinie 16 Kulturflaschen ( $75\text{cm}^2$ ) mit jeweils 300000 Tumorzellen angelegt. Bei den Zellen der Gruppe 1 handelte es sich um naive unvorbehandelte Tumorzellen, bei den Zellen der Gruppe 2-4 um Zellen aus dem vorangegangenen Zyklus, die bereits viermalig mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin vorbehandelt waren.

Der weitere Verlauf erfolgte analog zu dem 4. Zyklus.

### **2.2.3.2 Relative Resistenzentwicklung durch Inkubation mit BAPTA-AM**

Dieser Versuch wurde für die Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 analog durchgeführt. Zur Vorbereitung der Versuchsdurchführung wurden am Tag (-1) von jeder Zelllinie jeweils 20 Kulturflaschen ( $75\text{cm}^2$ ) mit je 300000 Tumorzellen in 16ml Nährmedium gefüllt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden am Tag 0 jeweils 5 Gruppen à 4 Kulturflaschen gebildet:

1. Gruppe: 0-Kontrolle
2. Gruppe: 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin
3. Gruppe: 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin
4. Gruppe: 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cisplatin

## 5. Gruppe: BAPTA-AM Kontrolle

Das alte Nährmedium wurde verworfen und die Gruppen wie folgt behandelt: Gruppe 1 wurde als 0-Kontrolle 10ml Dulbecos PBS zugegeben, den Gruppen 2-5 wurden 10 ml 50µM BAPTA-AM Lösung (gelöst in calciumfreiem Dulbecos PBS) zugegeben. Bei BAPTA-AM handelt es sich um einen intrazellulären Calcium-Chelator. Anschließend wurden alle Kulturflaschen für 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Lösungen verworfen, den Kulturflaschen jeweils 10ml Nährmedium hinzugefügt, und es folgte eine 30 minütige Deesterifizierung des BAPTA-AM in Nährmedium bei 37°C. Nach dieser Vorbehandlung der einzelnen Gruppen erfolgte eine einmalige Cisplatinbehandlung, d.h. Gruppe 1 als 0-Kontrolle wurde mit 10ml reinem Nährmedium behandelt, Gruppe 2 wurde mit 10ml einer 0,5µg/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung, Gruppe 3 wurde mit 10ml einer 1,0µg/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung und Gruppe 4 wurde mit 10ml einer 2,0µg/ml cisplatinhaltigen Nährmediumslösung für 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und Gruppe 5 wurde mit 10ml reinem Nährmedium behandelt. Die Bestimmung der Überlebenszahlen in den darauf folgenden Tagen erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben.

## 2.2.4 Ca<sup>2+</sup> Imaging

### 2.2.4.1 Fluoreszenzfärbung mit Fluo-4 AM

Die Färbe technik erfolgte bei den Tumorzelllinien EPLC 32M1 und H1339 analog.

Zur Versuchsvorbereitung wurden am Vortag jeweils 50000 Tumorzellen in Petrischalen (35x10mm) gesplittet und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 100 µg des zytoplasmatischen Calciumindikators fluo-4 AM in 9,2 ml supplemented Hanks Balanced Salt Solution (sHBSS) mit 0,2% Pluronic und 0,8% DMSO gelöst. sHBSS wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt aus Hanks Balanced Salts Modified 9,7g/L und 25ml 1M HEPES Lösung gelöst in 975ml Reinstwasser – pH Einstellung mit NaOH (Natriumhydroxid) auf 7,4. Durch Versetzen der sHBSS Lösung mit Pluronic konnte die Löslichkeit des lipophilen Farbstoffes verbessert, sowie das Eindringen des Farbstoffes in Zellkompartimente reduziert werden.

Anschließend wurde in die mit Tumorzellen besiedelten Petrischalen, jeweils 1ml Färbelösung pipettiert. Zum Farbstoffloading der Zellen folgte eine Inkubation im Dunkeln für 30min bei Raumtemperatur (RT). Bei höheren Temperaturen zeigte sich ein unerwünschter verstärkter Übertritt des Calciumindikators in die Zellorganellen (siehe auch Herstellerhinweise). Nach dem Farbstoffloading der Zellen wurde eine weitere 30min

dauernde Inkubation (RT, Dunkelheit) der Zellen in 990 $\mu$ l sHBSS zur vollständigen Deesterifizierung des Fluoreszenzfarbstoffes durchgeführt, um einen Farbstoffaustritt aus den Zellen zu verhindern.

#### **2.2.4.2 ATP induziertes Ca<sup>2+</sup> Signaling mit/ohne extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>**

Zur Quantifikation von Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurden die Tumorzellen der Linien EPLC 32M1 als auch H1339 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM wie zuvor beschrieben gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes unter 488nm Exitationswellenlänge und 520-534nm Emissionswellenlänge untersucht. Es wurden von jeder untersuchten Petrischale 120 Bildaufnahmen (1 Aufnahme/Sekunde) mit Hilfe einer digitalen CCD Kamera aufgenommen. Zur Versuchsdurchführung des ATP induzierten Calcium-Signalings mit extrazellulärem Calcium (enthalten in sHBSS) wurden die naiven sowie die teilresistenten Tumorzellen beider Linien zehn Sekunden nach Aufnahmebeginn, mit 100 $\mu$ l 10mM ATP-Lösung (ATP gelöst in sHBSS) stimuliert. Somit kam es zu einer effektiven Stimulation der Zellen mit 1mM ATP-Lösung.

Zur Versuchsdurchführung des ATP induzierten Calcium-Signalings ohne extrazelluläres Calcium bei naiven Tumorzellen beider Linien, wurde die sHBSS Lösung von den Petrischalen abgenommen und durch mehrfache Spülung mit calciumfreier 0,02% EDTA/PBS Lösung Reste extrazellulären Calciums entfernt. Die Petrischalen wurden anschließend mit 990 $\mu$ l 0,02% EDTA/PBS Lösung befüllt und mit 100  $\mu$ l 10mM ATP Lösung (ATP gelöst in 0,02% EDTA/PBS) stimuliert, mit einer effektiven ATP Stimulationskonzentration von 1mM ATP.

Für jedes aufgenommene Bild wurden bei der Auswertung sog. Regions of Interests (ROIs) in einzelnen Zellen definiert und die Fluoreszenz über ausgewählte Bereiche integriert. Die Fluoreszenz-Endwerte wurden als Fluoreszenzverhältnis ( $F/F_0$ ), genormt auf die Ausgangsfluoreszenz  $F_0$ , dargestellt und somit die relative Fluoreszenzänderung bestimmt. Die Auswertung wurde mit Hilfe eigens geschriebener Macros und der Bild-Analyse Software „Scion-Image“ durchgeführt.

#### **2.2.4.2 SERCA 1/2/3 Inhibition mit Cyclopiazonic Acid**

Ziel dieser Versuchsreihe war die Inhibition der SERCA 1/2/3 durch die Substanz Cyclopiazonic acid. Bei der Substanz CPA handelt es sich um ein Mykotoxin einiger Penicillium cyclopium und Aspergillus flavus Arten (34). Die maximale Inhibition wurde bei CPA Konzentrationen zwischen 10-30 $\mu$ M beobachtet (22).

Zur Quantifikation von Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  wurden die Tumorzellen der Linien EPLC 32M1 als auch H1339 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM wie unter 2.3.1 beschrieben gefärbt.

Durch Waschen der Petrischalen mit 0,02% EDTA/PBS Lösung wurde das extrazelluläre Calcium entfernt und die Schalen mit 990 µl 0,02% EDTA/PBS Lösung befüllt. Anschließend wurden eine Cyclopiazonic Acid Stimulationslösung hergestellt: 300µM CPA Lösung in 0,02%/EDTA/PBS mit 1% DMSO. Mit einer Stimulationsmenge von 100µl führte dies zu einer effektiven Konzentration von 30 µM CPA. Durch Inhibition der SERCA 1/2/3 kam es zu einem Fluoreszenzanstieg, dieser wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben, aufgezeichnet und ausgewertet.

## 2.2.5 Western Blot

Die auf 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gewachsenen EPLC 32 M1 als auch die H1339 Zellen wurden nach Abnahme des Nährmediums zweifach mit eiskaltem Dulbecos PBS gewaschen und anschließend mit 10ml 0,02% EDTA Lösung in DPBS pro Kulturflasche bei 4°C für 25min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem Zellschaber abgeschabt, in vorgekühlte 50ml Blue Caps (BD Flacon Tubes) gefüllt und bei 800U für 8min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und es erfolgte eine Resuspension in 1,5ml eiskaltem PBS. Nach Zentrifugation in einem 2ml Eppendorf Tube (10min, 450 RCF) wurde das gewonnene Zellpellet entsprechend des Herstellerprotokolls zur Gewinnung von Membranproteinextrakten mit Proteo Extract® Native Membrane Protein Extraction Kit, bzw. zur Gewinnung von Gesamtprotein mit Mammalian Protein Preparation Kit für intrazelluläre Proteine behandelt. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch für die Western Blot Versuche gelagert. Die Proteinextraktkonzentrationen wurden mit Hilfe des non-interfering Protein Assay Kit entsprechend des Herstellerprotokolls untersucht. Zum Erhalt von äquivalenten Proteinkonzentrationen erfolgte eine Verdünnung mit Hilfe von Extraktionspuffern des jeweiligen Extraktionskits. Zur Denaturierung wurden die äquimolaren Proteinextrakte mit Laemmli-Sample-Buffer bei einer Endkonzentration von 32,5mM Tris, 2,5% β-Mercaptoethanol, 1% SDS und 12,5% Glycerol bei 85°C für 10min behandelt.

Der Western Blot wurde mit Hilfe des XCell SureLock™ Mini-Cell und dem XCell II™ Blot Module Kit System durchgeführt. Abhängig von der Größe des Zielproteins erfolgte die Auftrennung der Proteinextrakte mit Hilfe SDS-PAGE auf 4-12% Bis-Tris mini-Gel für Calretikulin und SERCA 1/2/3 und auf Tris-Acetat mini-Gel für IP<sub>3</sub>R 1/2/3 und RyR. Als Marker für die niedermolekularen Proteine wurde SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard und für die hochmolekularen Proteine HiMark™ Pre-Stained High Molecular Weight Protein

Standard verwendet. Für das 4-12% Bis-Tris mini-Gel wurde NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer und für das Tris-Acetat mini-Gel Novex® Tris-Acetate SDS Running Buffer nach Herstellerangaben verdünnt und mit Antioxidans (1:1000) versetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Hilfe des XCell II™ Blot Module Kit System auf eine Membran geblottet. Der Transferpuffer wurde aus NuPAGE® Transfer Buffer (20x), 15% Methanol, 1% Antioxidans und destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wurde die Membran 60min bei RT auf dem Schüttler mit Blocking-Lösung (0,1% Tween-20 zur Hintergrundreduktion, 10% TBS, 5% Milchpulver, dest. Wasser) inkubiert. Nach Abnahme der Blocking-Lösung erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blocking-Lösung) über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde die primäre Antikörperlösung entfernt und die Membran 3x in TBS-T Lösung gewaschen (0,1% Tween-20, 10% TBS, destilliertes Wasser). Nach 60min Inkubation bei RT auf dem Schüttler mit sekundärer Antikörperlösung (verdünnt in Blocking-Lösung) wurde die Membran abermals dreimal mit TBS-T Lösung gewaschen. Bei niedrigmolekularen Proteinen konnte anschließend die Membran in β-Actin Antikörperlösung (1:5000 verdünnt in Blocking-Lösung) zur Durchführung der Loading-Control für 60min bei RT inkubiert werden. Bei hochmolekularen Proteinen war dies nicht direkt möglich, da β-Actin mit einem Molekulargewicht von 42kDa bei der Elektrophorese des Tris-Acetat-Geles nur noch im Sammelgel zu finden ist. Hier wurde die Loading-Control mittels eines separaten Western Blots auf 4-12% Bis-Tris-Gel durchgeführt. Nach Inkubation mit β-Actin-Antikörperlösung wurde die Membran wiederum dreimal in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die TBS-T-Lösung entfernt und die Chemiluminiszenzlösung nach Herstellerprotokoll angefertigt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation der Membran bei RT mit Chemiluminiszenzlösung zur Darstellung der Antikörperkomplexe. Daraufhin wurde das Reagenz abgenommen und die Membran in die Filmkassette gelegt. Es folgte die Filmentwicklung in der Dunkelkammer. Die Filmauswertung erfolgte mit der Bildanalysesoftware „Image J“ (National Institutes of Health)

**Tabelle 1: Übersicht über die für EPLC 32M1 und H1339 spezifischen Angaben zu Elektrophorese, Blotting und Antikörperverdünnung**

	<b>Elektrophorese</b> Spannung/ Gellaufzeit/ Temperatur	<b>Blotting</b> Spannung/ Blottingdauer/ Temperatur	<b>Prim. AK</b>	<b>Sek. AK</b>
<b>EPLC 32M1</b>				
<b>Calretikulin</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1: 1000 goat anti-CRT, Santa Cruz Bio- technology	1:10000 donkey anti-goat, Santa Cruz Bio- technology
<b>SERCA1/2/3</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1:50 rabbit anti- SERCA1/2/3, Santa Cruz Bio- technology	1 :10000 donkey anti-rabbit, Amersham Biosciences
<b>IP<sub>3</sub>R 1/2/3</b>	150V/120min/ RT	22V/180min/ 4°C	1:250 rabbit anti- IP <sub>3</sub> R 1/2/3, Santa Cruz Bio- technology	1 :10000 goat anti-rabbit, Biorad
<b>β-Actin</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1:5000 mouse anti-β- actin (HRP), Abcam	_____
<b>H1339</b>				
<b>Calretikulin</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1: 1000 goat anti-CRT, Santa Cruz Bio- technology	1:10000 donkey anti-goat, Santa Cruz Bio- technology
<b>SERCA1/2/3</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1:50 rabbit anti- SERCA1/2/3, Santa Cruz Bio- technology	1:10000 goat anti-rabbit, Biorad
<b>IP<sub>3</sub>R 1/2/3</b>	150V/120min/ RT	22V/180min/ 4°C	1:250 rabbit anti- IP <sub>3</sub> R 1/2/3, Santa Cruz Bio- technology	1 :5000 goat anti-rabbit, Biorad
<b>β-Actin</b>	150V/90min/RT	30V/80min/RT	1:5000 mouse anti-β- actin (HRP), Abcam	_____

## 2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden Petrischalen mit Nährmedium gefüllt und in diese Glasobjektträger eingebracht. Anschließend wurden EPLC 32M1 und H1339 Zellsuspensionen auf die Objektträger pipettiert. Nach ca. 24 stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zeigten die Zellen ein adhärentes Wachstum auf den Objektträgern. Nach ca. 48 Stunden wurden die, mit Zellrasen bewachsenen, Objektträger aus den Petrischalen genommen, für fünf Minuten in 100% Aceton fixiert und anschließend in 10% NCS-haltiger sHBSS-Lösung gewaschen. Die Antikörper wurden 1:100 in 10% NCS in sHBSS Lösung verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den monoklonalen Antikörpern (EPLC 32M1: rabbit anti- IP<sub>3</sub>R 1/2/3,

Santa Cruz; H1339: rabbit anti-SERCA1/2/3, Santa Cruz) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in 10% NCS-haltiger sHBSS-Lösung gewaschen und mit einem FITC-konjugiertem sekundärem anti-rabbit Antikörper inkubiert. Die Objektträger wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Mit Hilfe der digitalen CCD Kamera wurden sodann Aufnahmen des Fluoreszenzbildes gemacht. Zur Analyse der Fluoreszenzintensität wurden einzelne ganze Zellen – um Fluoreszenzüberlagerungen dicht beieinander liegender Zellen zu vermeiden – als ROI definiert und mit Hilfe der Bildanalyse Software „Scion“ ausgewertet.

## 2.2.7 Small interfering (si) RNA Transfektion

Zur Unterdrückung der Proteinexpression von IP<sub>3</sub>Rezeptoren I/II/III in resistenten EPLC 32M1 Zellen und von SERCA 1/2/3 in naiven H1339 wurden die Zellen in modifizierter Anwendung des Herstellerprotokolls der Firma Dharmacon mit siRNA behandelt.

Zur Versuchsvorbereitung wurden sowohl die naiven als auch die resistenten Tumorzellen entsprechend der in Tabelle 2 dargestellten Gruppen, in 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen zu je 200 000 Zellen gesplittet – pro Gruppe wurden zwei Kulturflaschen angelegt.

**Tabelle 2: Versuchsgruppen der siRNA Transfektion**

EPLC 32M1	H1339
naive	resistant
resistant	naive
resistant + siRNA IP <sub>3</sub> R I/II/III	naive + siRNA SERCA 1/2/3
resistant + ntRNA	naive + ntRNA

Es folgte eine Inkubation der Zellen für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### EPLC 32M1:

Zur Transfektionsvorbereitung wurden zunächst eine 20µM ntRNA-Stammlösung aus 5nmol ntRNA und 250µl sHBSS, eine 20µM siRNA IP<sub>3</sub>R I -Stammlösung aus 5nmol siRNA IP<sub>3</sub>R I und 250µl sHBSS, eine 20µM siRNA IP<sub>3</sub>R II -Stammlösung aus 5nmol siRNA IP<sub>3</sub>R II und 250µl sHBSS, sowie eine 20µM siRNA IP<sub>3</sub>R III -Stammlösung aus 5nmol siRNA IP<sub>3</sub>R III und 250µl sHBSS hergestellt.

Zur Herstellung der ntRNA-Transfektionslösung, wurden 100 µl ntRNA-Stammlösung in 1ml Serum – und Antibiotikafreiem RPMI gelöst (2µM ntRNA-Lösung) und 5min bei RT inkubiert. Des weiteren wurden 40µl DharmaFECT 2 (Lipidreagenz zur Zellmembranpassage der ntRNA) in 1ml RPMI gelöst und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die ntRNA-Lösung und die DharmaFECT 2-Lösung miteinander vermischt und 20min bei RT inkubiert.

Daraufhin wurde die entstandene Lösung mit RPMI-Nährmedium (mit Serum und Antibiotika) auf eine ntRNA Endkonzentration von 100nM verdünnt.

Zur Herstellung der siRNA-Transfektionslösungen wurden aus den Stammlösungen der siRNA- IP<sub>3</sub>R I, siRNA- IP<sub>3</sub>R II, siRNA- IP<sub>3</sub>R III, wie oben bei ntRNA beschrieben, eine am Schluss zu je 100nM siRNA- IP<sub>3</sub>R I, 100nM siRNA- IP<sub>3</sub>R II sowie 100nM siRNA- IP<sub>3</sub>R III enthaltene Endlösung hergestellt.

Nach Empfehlungen des Herstellers Dharmacon wurde eine Konzentration von 100nM ntRNA bzw. siRNA verwendet.

Anschließend wurde von den, am Vortag vorbereiteten Gruppen, das Nährmedium abgenommen und die naive sowie die resistente Gruppe pro Kulturflasche mit 3,5ml reinem Nährmedium behandelt; die Gruppe resistant + siRNA IP<sub>3</sub>R I/II/III wurde pro Kulturflasche mit 3,5ml der siRNA-Lösung behandelt, die Gruppe resistant + ntRNA mit jeweils 3,5ml ntRNA-Lösung pro Kulturflasche.

#### H1339:

Die Konzentrationen der siRNA-SERCA1/2/3 sowie der ntRNA Lösungen mussten bei dieser Tumorzelllinie zur Sicherstellung der Lebens- und Wachstumsfähigkeit der Tumorzellen von 100nM auf 5nM reduziert werden. Zur Konzentrationsanpassung erfolgte ein Monitoring der Zellüberlebensfähigkeit mittels Zellzahlbestimmung- abgestorbene Zellen verloren ihre Adhärenz und wurden bei Abnahme des alten Nährmediums entfernt, sodass bei einer Zellzahlbestimmung wie unter 2.2.2.1 dargestellt, eine Bestimmung der überlebenden Zellen erfolgte.

Zur Transfektionsvorbereitung wurden auch hier entsprechend der Zelllinie EPLC 32M1 zunächst ntRNA als auch siRNA-SERCA1, siRNA-SERCA2, siRNA-SERCA3 Stammlösungen hergestellt. Die erhaltenen Stammlösungen wurden, wie für die EPLC 32M1 beschrieben, in RPMI gelöst und mit DharmaFECT2 gemischt. Die Endkonzentration der ntRNA-Stammlösung wurde jedoch auf eine 5nM ntRNA-Nährmedium Lösung verdünnt. Die siRNA-Transfektionslösung wurde auf eine Endkonzentration von je 5nM siRNA-SERCA1, siRNA-SERCA2 und siRNA-SERCA3 verdünnt.

Daraufhin wurde von den am Vortag vorbereiteten Gruppen das Nährmedium abgenommen und die naive, ebenso wie die resistente Gruppe pro Kulturflasche mit 3,5ml reinem Nährmedium behandelt; die Gruppe naive + siRNA SERCA1/2/3 wurde pro Kulturflasche mit 3,5ml der siRNA-Lösung behandelt, die Gruppe naive + ntRNA mit jeweils 3,5ml ntRNA-Lösung pro Kulturflasche.

Anschließend wurden die Gruppen beider Zelllinien 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Herstellerangaben konnte nach 48h von einer maximalen Suppression der Genexpression ausgegangen werden, so dass zu diesem Zeitpunkt zur Überprüfung der Transfektion ein Western Blot (EPLC 32M1: IP<sub>3</sub>R I/II/III ; H1339: SERCA 1/2/3) durchgeführt wurde. Vier Tage nach der Transfektion wurde abermals ein Western Blot durchgeführt, um die Stabilität der Transfektion über vier Tage zu zeigen.

### **2.2.7.1 Einfluss der siRNA Transfektion auf die Behandlung mit Cisplatin**

Nachdem eine stabile Transfektion über vier Tage bei beiden Zelllinien möglich war, wurden abermals die in Tabelle 2 dargestellten Gruppen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen zu je 200 000 Zellen angelegt; pro Gruppe wurden fünf Kulturflaschen angelegt.

Es folgte eine Transfektion der beiden Zelllinien wie zuvor beschrieben. 48h nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium bzw. das Nährmedium von den Zellkulturen entfernt. Es folgte eine dreistündige Inkubation in 0,5µg/ml Cisplatinhaltigem Nährmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. In den darauffolgenden 4 Tagen wurden, wie unter Absatz 2.2.3.1 dargestellt, die Überlebenskurven der Zellen erstellt.

### **2.2.8 Statistik**

Der one-way oder two-way ANOVA oder „ANOVA repeated measurements“ (kombiniert mit mehrfach paarweisen Vergleichen) wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes „Sigma Stat“ ausgeführt. Bei der durchgeführten Varianzanalyse wurde ein P Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin

##### 3.1.1 Relative Resistenzentwicklung durch wiederholte Cisplatin-Inkubation

In den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind die Erstexposition der Zellen mit Cisplatin sowie die Ergebnisse der relativen Resistenzentwicklung graphisch dargestellt.

**Abbildung 3.1:**  
Erstexposition der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 mit 0,5 $\mu$ g/ml , 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin

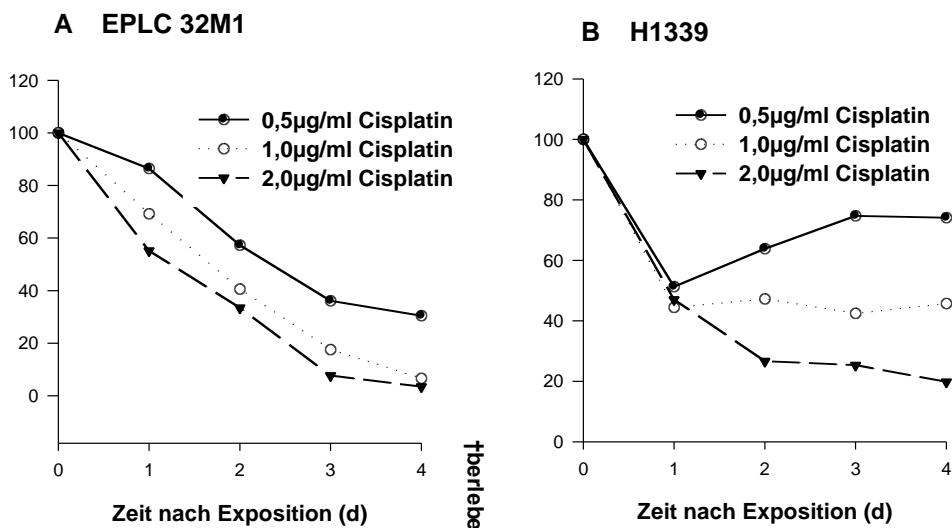


Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der Erstexposition der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 mit den Cisplatin-Konzentrationen 0,5 $\mu$ g/ml, 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml. Auf der x-Achse ist die Zeit nach Cisplatin-Exposition in Tagen (d) aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent der 0-Kontrolle aufgetragen. Bei beiden Zelllinien ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der Überlebensraten zu beobachten.

Abbildung 3.2:

Darstellung des Vergleichs der Überlebensfraktionen der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den naiven Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 nach Behandlung mit 0,5 $\mu$ g/ml, 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin

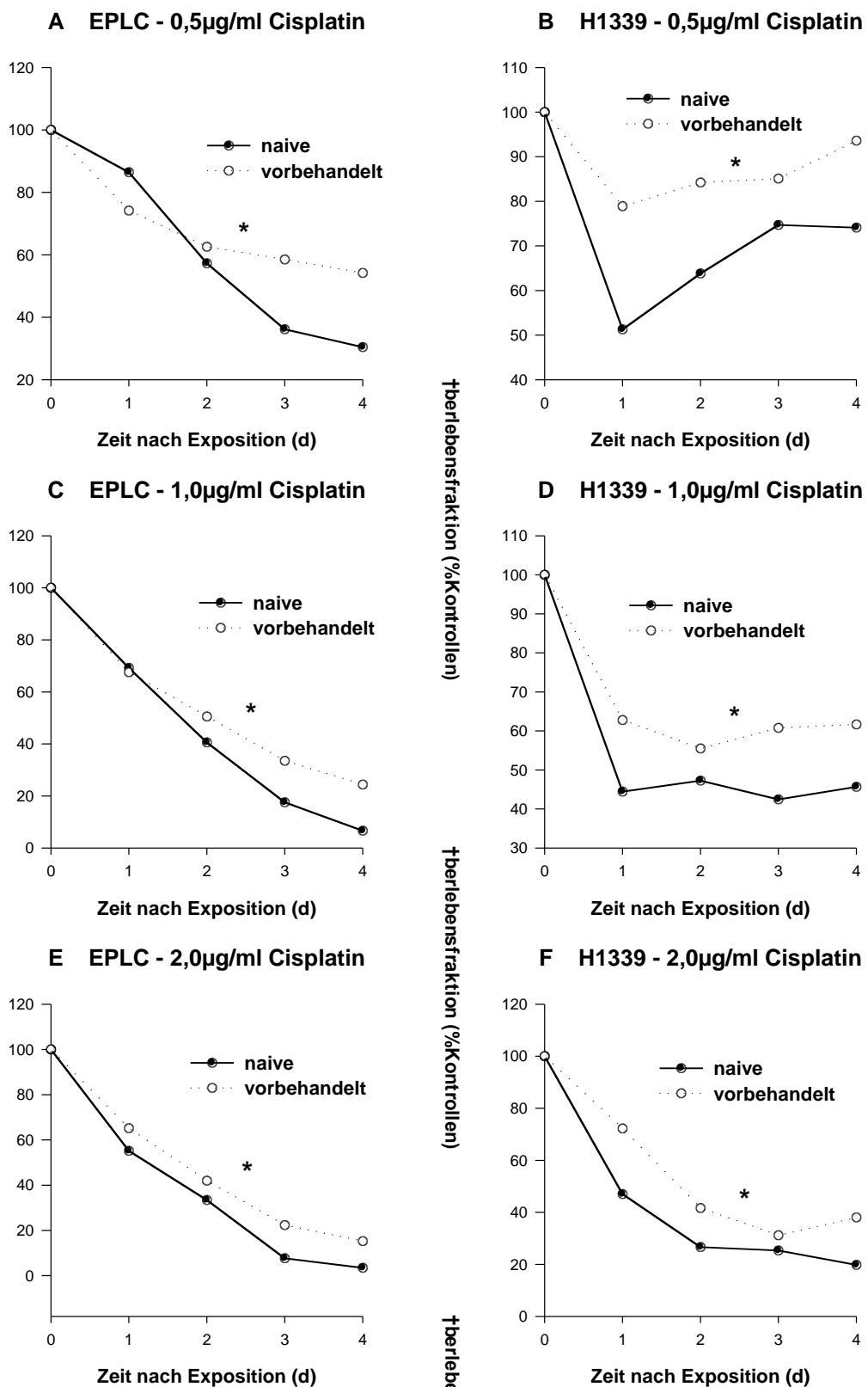


Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse des Vergleichs der Überlebensfraktionen der naiven, erstmalig mit Cisplatin behandelten Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339, mit bereits vierfach mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin vorbehandelten Zellen beider Zelllinien. Auf der x-Achse ist die Zeit nach Cisplatin-Exposition in Tagen (d) aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent der 0-Kontrolle aufgetragen. In den Abbildungen 3.2A und 3.2B ist der Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen der naiven mit den vorbehandelten Zellen nach Inkubation mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin dargestellt. In den Abbildungen 3.2C und 3.2D ist der Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen der naiven mit den vorbehandelten Zellen nach Inkubation mit 1,0 $\mu$ g/ml Cisplatin dargestellt. In den Abbildungen 3.2E und 3.2F ist der Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen der naiven mit den vorbehandelten Zellen nach Inkubation mit 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin dargestellt.

Sowohl die Plattenepithelkarzinomzelllinie EPLC 32 M1 als auch die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie H1339 weist bei allen Cisplatinkonzentrationen eine signifikant (\*P < 0,01, two-way ANOVA) größere Überlebensfraktion der vorbehandelten Zellen im Vergleich mit den naiven Zellen auf.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Resistenzentwicklung der vierfach mit Cisplatin-vorbehandelten Zellen schließen. Daher werden die vorbehandelten Zellen im weiteren Verlauf als teilresistente Zellklone bezeichnet.

Die Cisplatin-Sensitivität wurde über fünf Passagen hinweg beurteilt. Dabei konnte keine Veränderung der Cisplatin-Resistenz in den teilresistenten Zellklonen beobachtet werden.

### **3.1.2 Relative Resistenzentwicklung durch Inkubation mit BAPTA-AM**

In Abbildung 3.3 werden die Ergebnisse der Überlebenskurven der mit BAPTA-AM, einem intrazellulärem Calcium-Chelator, vorbehandelten Zellen mit den, unter Absatz 3.1.1 in Abbildung 3.1 dargestellten, Überlebenskurven der Erstexposition der naiven Zellen beider Zelllinien verglichen.

Abbildung 3.3:

Vergleich der Überlebenskurven der naiven Zellen mit den BAPTA-AM vorbehandelten Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 nach Inkubation mit Cisplatin der Konzentration 0,5 $\mu$ g/ml, 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml

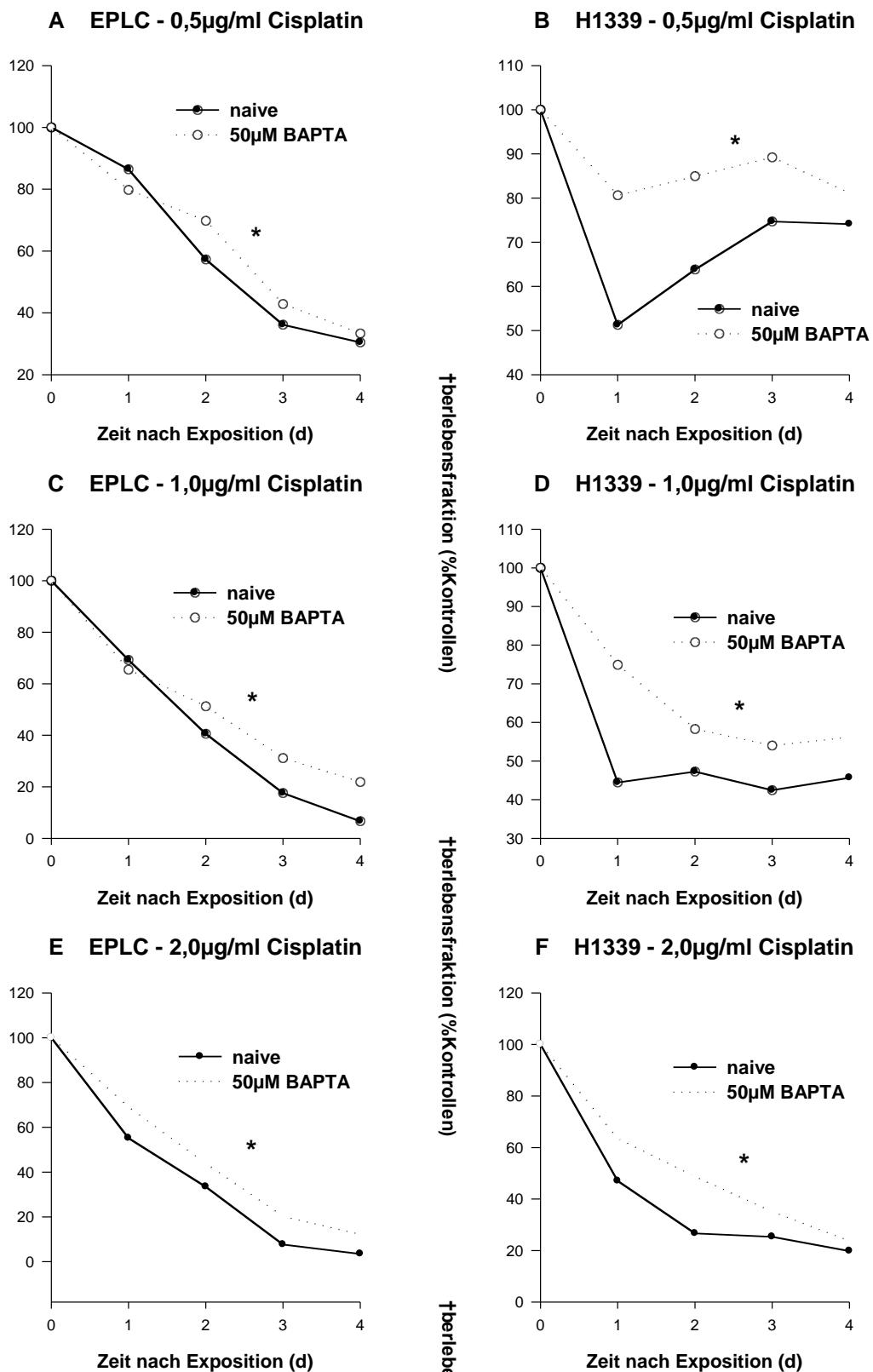


Abbildung 3.3 präsentiert den Vergleich der Überlebenskurven der naiven Zellen bei Erstexposition mit 0,5 $\mu$ g/ml, 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin mit den Überlebenskurven der mit 50 $\mu$ M BAPTA-AM vorbehandelten Zellen nach Exposition mit 0,5 $\mu$ g/ml, 1,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml Cisplatin. Auf der y-Achse ist die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent der 0-Kontrolle, auf der x-Achse ist die Zeitdauer in Tagen (d) nach Cisplatinbehandlung aufgetragen. In Abbildung 3.3A und 3.3B sind die Überlebensraten nach Exposition mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin dargestellt. Abbildung 3.3C und 3.3D zeigt die Ergebnisse der Exposition mit 1,0 $\mu$ g/ml Cisplatin. Abbildung 3.3E und 3.3F zeigt die Resultate bei Inkubation mit 2,0mg/ml Cisplatin.

Sowohl die Plattenepithelkarzinomzelllinie EPLC 32 M1 als auch die kleinzelige Lungenkarzinomzelllinie H1339 weisen bei allen Cisplatinkonzentrationen eine signifikant (\*P < 0,01, two-way ANOVA) größere Überlebensfraktion der mit 50 $\mu$ M BAPTA-AM vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den naiven Zellen auf.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine relative Resistenzentwicklung durch Pufferung des intrazellulären Calciums bei beiden untersuchten Zelllinien.

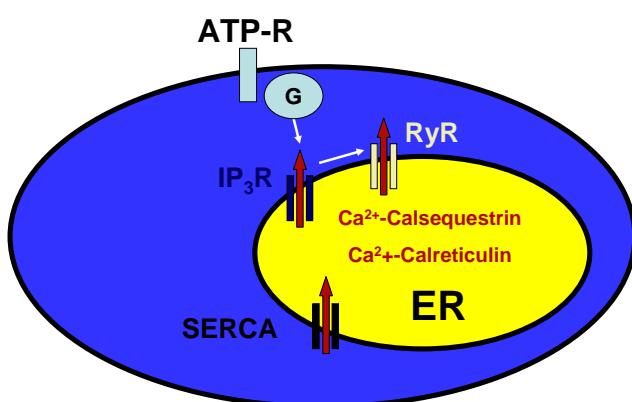
## 3.2 Ca<sup>2+</sup> Imaging

### 3.2.1 ATP induziertes Ca<sup>2+</sup> Signaling mit/ ohne extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>

#### 3.2.1.1 Ca<sup>2+</sup> Signaling bei Stimulation mit 1mM ATP

Das Gleichgewicht der intrazellulären Calcium-Homöostase wird aufrecht erhalten durch sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, welche Calcium in das ER pumpen, sowie Inositol-1,4,5-phosphat (IP<sub>3</sub>R) und Ryanodine (RyR) Rezeptoren, welche Calcium aus dem ER freisetzen. Innerhalb des ER ist Calcium an die Calciumpuffer Calretikulin und Calsequestrin gebunden. (vgl. Abbildung 3.4).

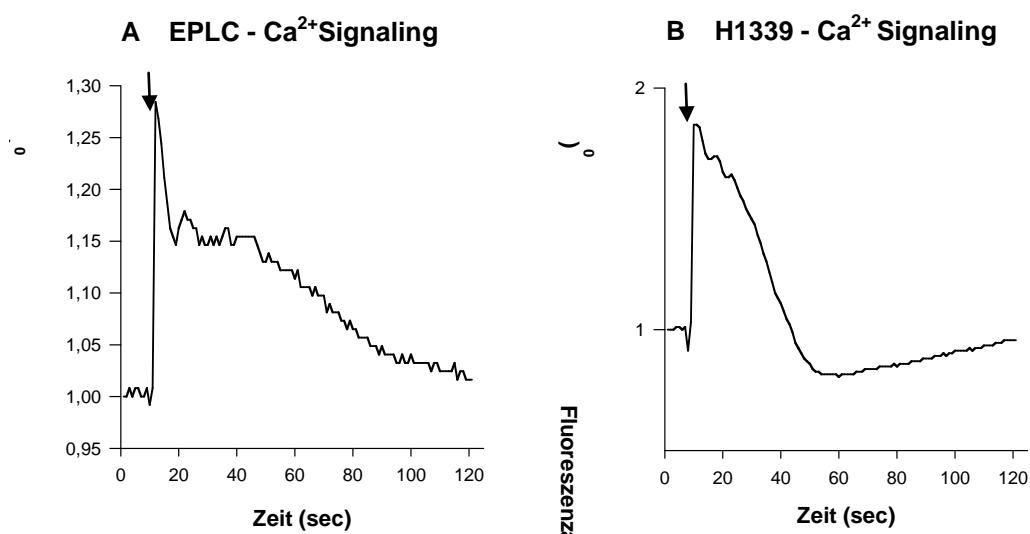
**Abbildung 3.4:**  
Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase



Die Stimulation der Zellen mit 1mM ATP führt zur Aktivierung des ATP-Rezeptors. Über eine G-Protein gekoppelte Kaskade kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat. Dieses bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor und führt zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Das ausströmende Ca<sup>2+</sup> führt zu einem Calcium induziertem Calciumausstrom aus dem ER über die RyR.

Zur graphischen Veranschaulichung des zu beobachtenden Ca<sup>2+</sup> Signalings bei Stimulation der mit Fluo-4 AM vorgefärbten, naiven Zellen des bronchialen Plattenepithelkarzinoms sowie des kleinzelligen Lungenkarzinoms mit 1mM ATP und vorhandenem extrazellulärem Calcium, dient beispielhaft Abbildung 3.5.

**Abbildung 3.5:**  
**Ca<sup>2+</sup> Signaling bei Stimulation mit 1mM ATP und extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>**



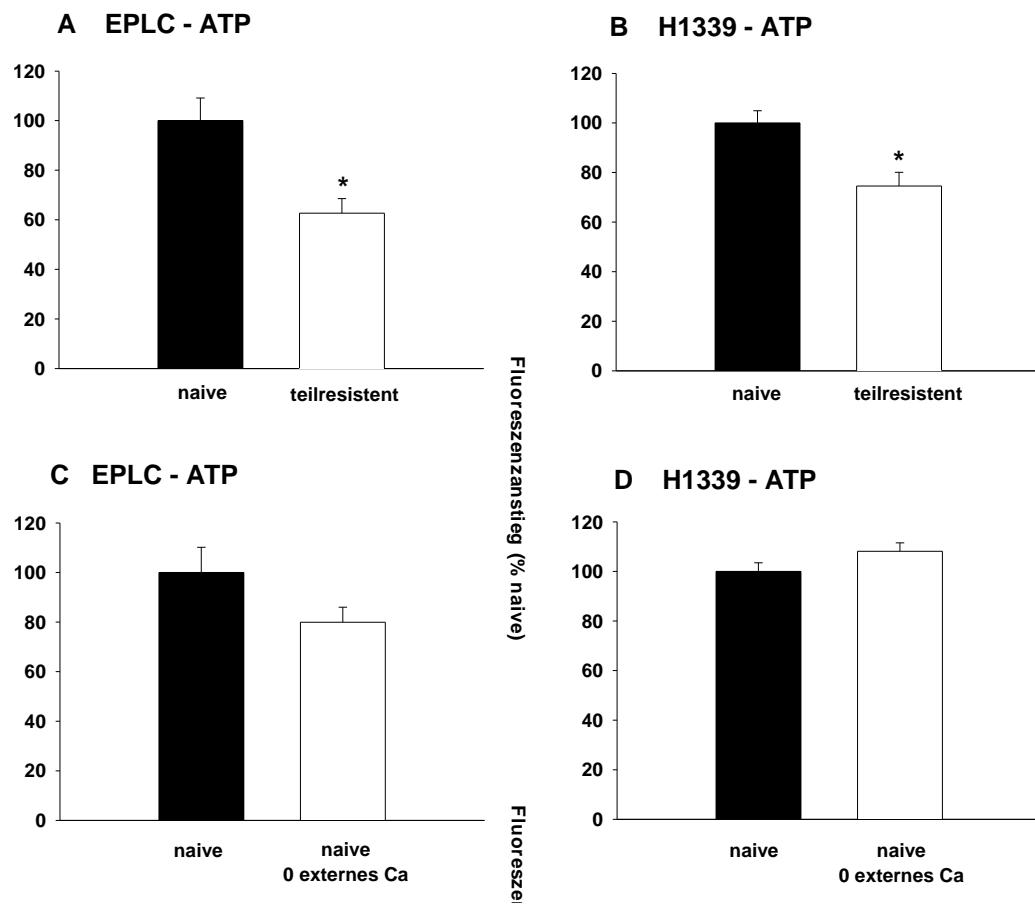
In Abbildung 3.5 ist auf der x-Achse die Zeit in Sekunden (sec) aufgetragen. Die digitale Kamera zeichnete 1 Bild/sec auf. Auf der y-Achse ist der Fluoreszenzanstieg als Quotient der aktuellen Fluoreszenz F zur Ausgangsfluoreszenz F<sub>0</sub> dargestellt. In Abbildung 3.5A als auch 3.5B ist innerhalb der ersten 10 sec ein Basisfluoreszenzwert um 1,0 mit geringen Oszillationen zu beobachten. Nach 10 sec ist ein geringer Einbruch des Fluoreszenzwertes bei Zugabe von 1mM ATP (Pfeil) zu sehen. Dies ist auf die Verdunkelung durch die Pipettenspitze zurückzuführen. Hiernach kommt es bei beiden Zelllinien zu einem raschen Fluoreszenzanstieg und im weiteren Verlauf zu einem Abfall der Fluoreszenz auf den Ausgangsfluoreszenzwert.

### 3.2.1.2 ATP induziertem Ca<sup>2+</sup> Signaling mit/ ohne extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>

In nachstehender Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse des ATP induziertem Ca<sup>2+</sup> Signalings mit und ohne extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> dargestellt.

Abbildung 3.6:

Fluoreszenzanstieg bei Stimulation der naiven sowie teilresistenten Zellklone der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 mit 1mM ATP mit bzw. ohne extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$



Die x-Achse in Abbildung 3.6A und 3.6B zeigt zwei Balken, die jeweils die Fluoreszenzergebnisse der naiven sowie der teilresistenten Zellklone der jeweiligen Zelllinie bei Stimulation mit 1mM ATP darstellen. Die x-Achse in Abbildung 3.6C und 3.6D repräsentiert jeweils die Balken naiver Zellen der beiden Zelllinien – der linke Balken zeigt die Ergebnisse naiver Zellen mit extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bei Stimulation mit 1mM ATP, der rechte Balken veranschaulicht die Ergebnisse der naiven Zellen ohne extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bei Stimulation mit 1mM ATP. Auf der y-Achse der Abbildungen 3.6A und 3.6B ist der Fluoreszenzanstieg (d.h. der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg) in Prozent der naiven Zellen angegeben und zusätzlich der Standardfehler auf 100% der naiven Zellen aufgetragen. Die y-Achse der Abbildungen 3.6C und 3.6D zeigt den Fluoreszenzanstieg in Prozent der naiven Zellen mit extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Ferner ist der Standardfehler auf 100% der naiven Zellen mit extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aufgetragen.

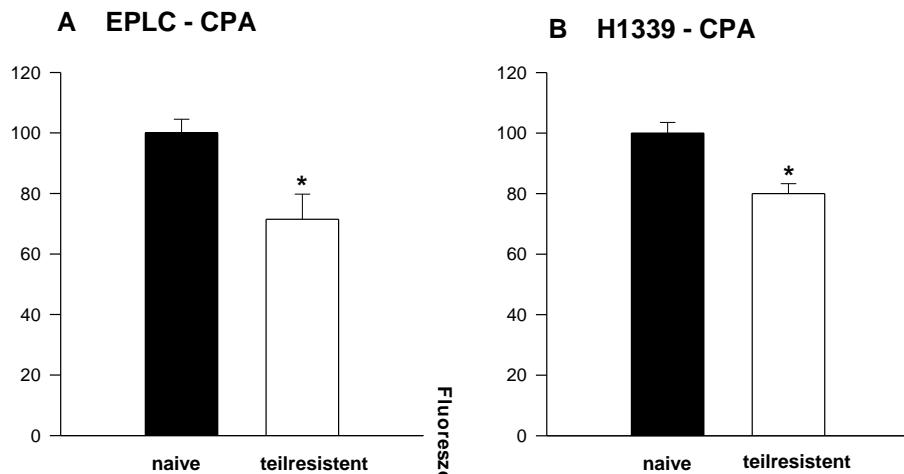
Der Vergleich des Fluoreszenzanstieges der naiven sowie der teilresistenten Zellklone der Zelllinie EPLC 32M1 auf Stimulation mit 1mM ATP und extrazellulärem Calcium ergibt einen signifikant ( $n=32-38$ ,  $*P < 0,001$ , t-Test) erhöhten Fluoreszenzanstieg der naiven Zellen. Betrachtet man die Stimulationsresultate der naiven EPLC 32M1 Zellen mit 1mM ATP mit bzw. ohne extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , so zeigen sich keine signifikanten ( $n= 121-158$ ,  $*P > 0,05$ , t-

Test) Unterschiede. Bei gegensätzlicher Beurteilung der Ergebnisse der H1339 Zellen zeigt sich bei Stimulation mit 1mM ATP und extrazellulärem Calcium ein signifikant ( $n=55-57$ ,  $*P < 0,001$ , t-Test) erhöhter Fluoreszenzanstieg der naiven Zellen im Vergleich zu den teilresistenten Zellklonen. Die Stimulationsresultate der naiven Zellen mit 1mM ATP mit bzw. ohne extrazellulärem Calcium zeigen keine signifikanten ( $n=121-158$ ,  $*P > 0,05$ , t-Test) Unterschiede.

### 3.2.2 SERCA 1/2/3 Inhibition mit Cyclopiazonic Acid

Zur weiteren Untersuchung des  $[Ca^{2+}]_{ER}$  – Gehaltes erfolgte die Inhibition der SERCA 1/2/3 Pumpen mittels Cyclopiazonic Acid. Dies führte zu einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum durch einen  $Ca^{2+}$ -leak. Der bei diesen Versuchen gemessene Fluoreszenzanstieg stellt somit ein indirektes Maß des  $[Ca^{2+}]_{ER}$  – Gehaltes dar (vgl. Abbildung 7).

**Abbildung 3.7:**  
 $Ca^{2+}$  Signaling in EPLC 32M1 und H1339 nach Stimulation mit  $30\mu M$  CPA



Auf der x-Achse der Grafiken A und B sind jeweils im linken Balken die Ergebnisse der naiven Zellen, im rechten Balken die Ergebnisse der teilresistenten Zellklone der jeweiligen Zelllinien dargestellt. Auf der y-Achse ist der Fluoreszenzanstieg in Prozent der naiven Zellen sowie der Standardfehler auf 100% der naiven Zellen aufgetragen.

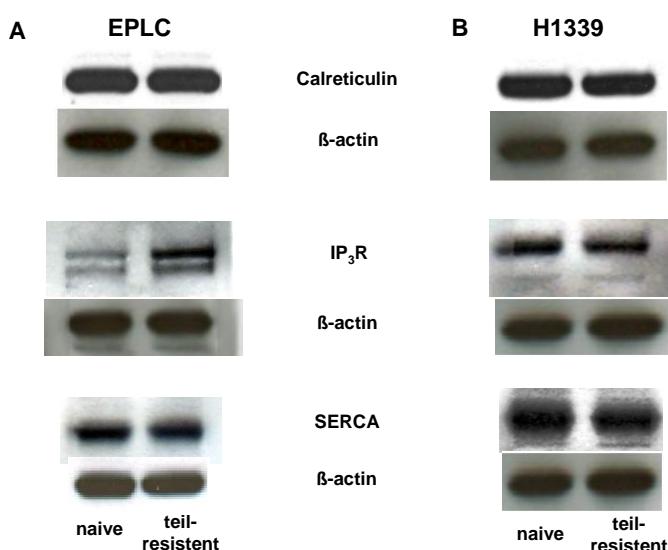
Zusammenfassend kann man im Rahmen der EPLC 32M1 und der H1339 Resultate feststellen, dass die teilresistenten Zellklone im Vergleich zu den naiven Zellen einen signifikant (EPLC:  $n=4-54$ ,  $*P < 0,001$ , t-Test; H1339:  $n=88-106$ ,  $*P < 0,001$ , t-Test) verminderten Fluoreszenzanstieg, d.h. einen verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$  – Gehalt, aufweisen.

### 3.3 Western Blot

Zur Untersuchung der Expression der maßgeblich an der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligten Proteine erfolgte eine Western Blot Analyse folgender Proteine: Intraretikuläre Calciumpuffer Calretikulin und Calsequestrin 1/2, sowie der Calciumkanalproteine Inositoltriphosphat-Rezeptor 1/2/3, SERCA 1/2/3 als auch der Ryanodine-Rezeptor 1/2/3. Analysiert werden konnten die Proteine Calretikulin, IP<sub>3</sub>R 1/2/3 und SERCA 1/2/3. Die Proteine Calsequstrin 1/2 und Ryanodine-Rezeptor 1/2/3 lagen unterhalb der Nachweisgrenze mittels Western Blot und konnten deshalb nicht dargestellt werden. Als Loading-Control diente  $\beta$ -Actin bei allen durchgeführten Versuchen.

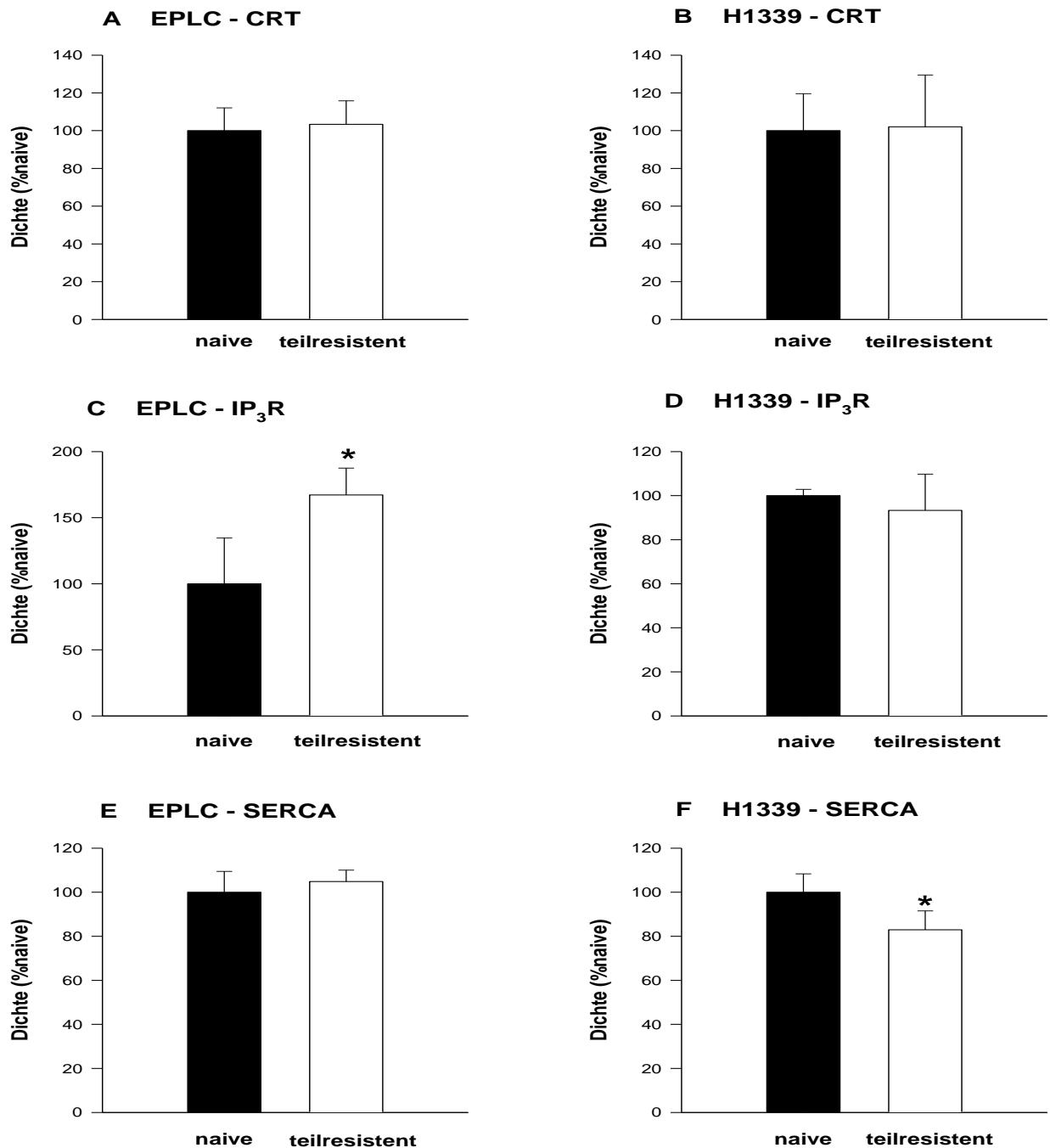
In nachfolgender Abbildung 3.8 sind zunächst die untersuchten Proteinbanden beispielhaft dargestellt.

**Abbildung 3.8:**  
**Versuchsergebnisse Western Blot**



Die Auswertung der Western Blot Analysen ist in nachfolgender Abbildung 3.9 dargestellt.

**Abbildung 3.9:**  
Graphische Darstellung der Western Blot Ergebnisse



Auf der x-Achse in Abbildung 3.9 repräsentieren die schwarzen Balken die Ergebnisse der naiven Zellen, die weißen Balken die der teilresistenten Zellen der jeweiligen Zelllinie. Auf der y-Achse ist die Dichteintensität der Schwärzung des Western Blot Films als Maß für die Proteinexpression in Prozent der naiven Zellen angegeben und zusätzlich der Standardfehler in Prozent der naiven Zellen angetragen.

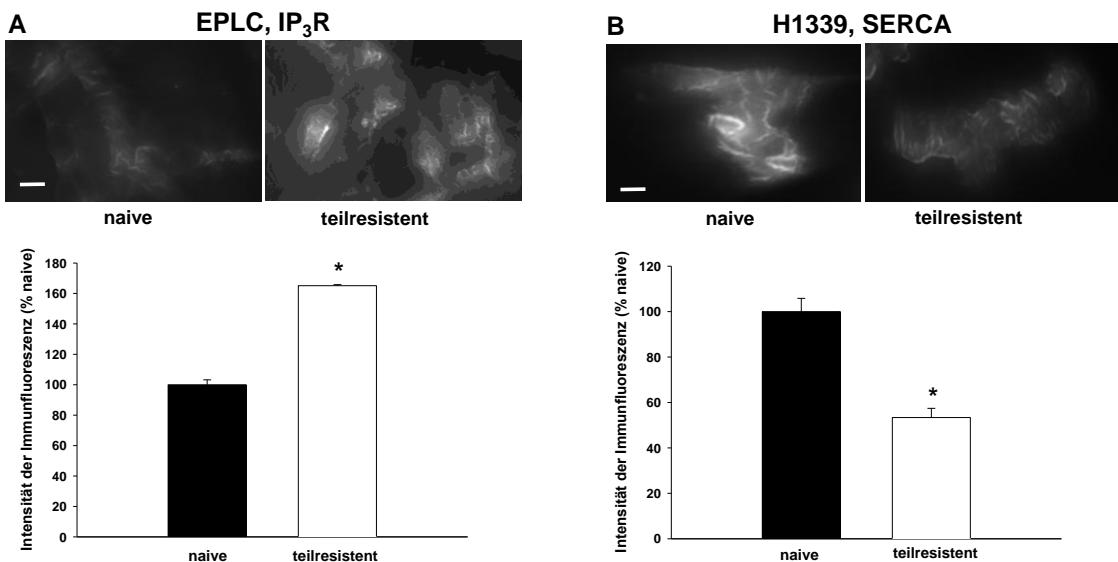
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen der Resultate der EPLC 32M1 Zellen keine signifikanten ( $n_{CRT}=3$ ,  $n_{SERCA1/2/3}=6$ ,  $*P > 0,05$ ; paired t-Test) Unterschiede in der Expression von Calretikulin (CRT) und SERCA 1/2/3 zwischen naiven und

teilresistenten Zellklonen bestehen. Allerdings kann eine signifikant ( $n=5$ ,  $*P < 0,05$ , paired t-Test) höhere Proteinexpression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 in teilresistenten, im Vergleich zu naiven Zellklonen nachgewiesen werden. Betrachtet man die Ergebnisse der H1339 Zellen, so zeigen sich keine signifikanten ( $n_{CRT}=3$ ,  $n_{IP3R}=3$ ,  $*P > 0,05$ , paired t-Test) Unterschiede zwischen naiven und teilresistenten Zellklonen bei der Proteinexpression von CRT und IP<sub>3</sub>R 1/2/3. Die Proteinexpression von SERCA 1/2/3 ist in naiven Zellklonen (H1339) signifikant ( $n= 4$ ,  $*P < 0,05$ , paired t-Test) höher als in teilresistenten Zellklonen.

### 3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Um die mittels Western Blot gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die IP<sub>3</sub>R 1/2/3 der EPLC 32M1 sowie die SERCA 1/2/3 der H1339 Zellen mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbung der naiven und teilresistenten Zellen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 sind in Abbildung 3.10 graphisch ebenso wie beispielhaft bildlich dargestellt.

**Abbildung 3.10:**  
Übersicht über die Versuchsergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbung



In Abbildung 3.10A sind zunächst die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der IP<sub>3</sub>R 1/2/3 sowohl in naiven als auch in teilresistenten Zellklonen bildlich gezeigt; der Querbalken hat das Maß von 10µM. Die deutlich zu sehenden hellen Strukturen veranschaulichen gut die Anordnung der IP<sub>3</sub>R 1/2/3 entlang des ER. Abbildung 3.10B zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der SERCA 1/2/3 in naiven sowie teilresistenten H1339-Zellen; der Querbalken hat das Maß von 2µM. Auch hier zeigt sich anhand des gewundenen Fluoreszenzmusters die Anordnung der SERCA 1/2/3 entlang des ER. Die dazugehörigen Grafiken zeigen auf der x-Achse die Ergebnisse sowohl der naiven als auch der

teilresistenten Zellklone. Auf der y-Achse ist die Leuchtintensität der Immunfluoreszenz in Prozent der naiven Zellen angegeben und zusätzlich der Standardfehler auf 100% der naiven Zellen angegeben.

Insgesamt lässt sich im Bereich der EPLC 32M1 Zellen eine signifikant ( $n=36$  Zellen,  $*P<0,001$ , t-Test) höhere Fluoreszenzintensität, d.h. IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expression, der teilresistenten Zellklone im Vergleich zu den naiven Zellen feststellen. Betrachtet man die Zelllinie H1339, so zeigt sich eine signifikant ( $n=16$  Zellen,  $*P<0,001$ , t-Test) verminderte SERCA 1/2/3 Expression in teilresistenten Zellen verglichen mit naiven Zellen.

### **3.5 Small interfering (si) RNA Transfektion**

Mit Hilfe einer small interfering (si) RNA Transfektion erfolgte eine Unterdrückung der Expression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 in resistenten EPLC 32M1 Zellen mit der Fragestellung, ob die Resistenz reversibel ist. Die Suppression der SERCA 1/2/3 Pumpen in naiven H1339 Zellen sollte klären, ob eine Resistenz induzierbar ist.

Zunächst wurde der Erfolg der durchgeföhrten Transfektionen nach 48 Stunden bei Abschluss der Transfektion, sowie nach sechs Tagen zur Sicherstellung der Stabilität der Transfektion mittels Western Blot Analyse überprüft.

In nachfolgender Abbildung 3.11 ist das Ergebnis des Western Blots nach 48h sowie die Überlebenskurven der transfizierten Zellen nach Inkubation mit 0,5µg/ml Cisplatin dargestellt. Als loading-control der Western Blots diente β-Actin.

**Abbildung 3.11:**  
Überlebenskurven der mit siRNA vorbehandelten Zellen nach Inkubation mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin

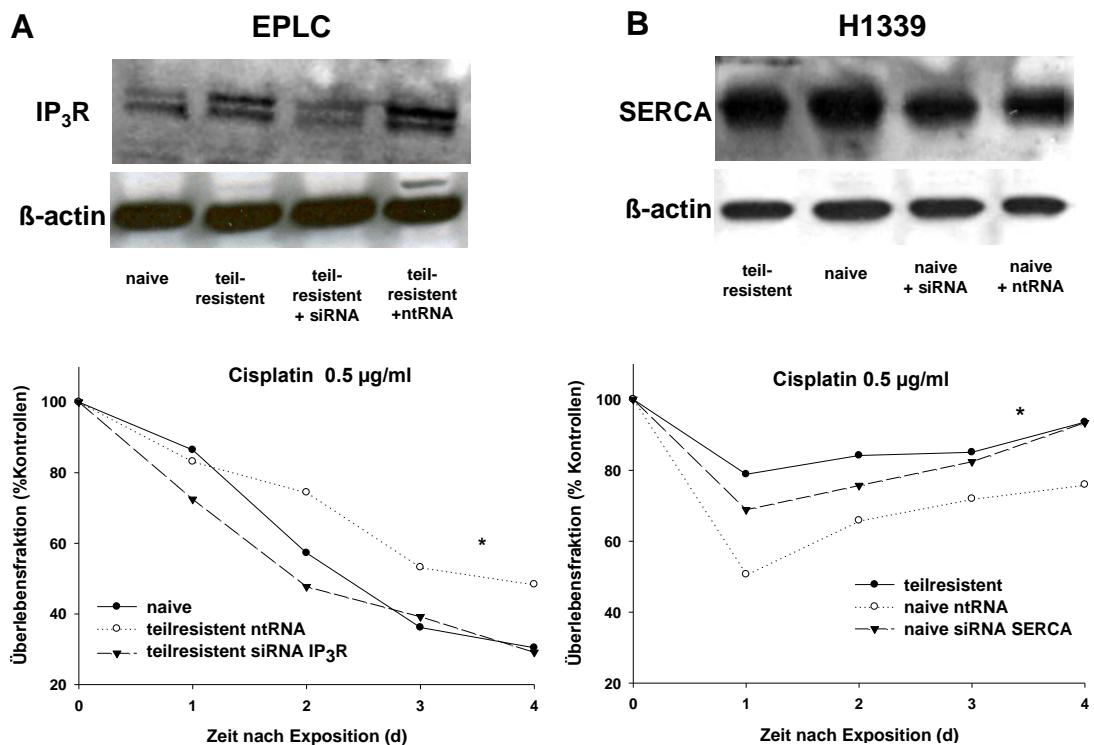


Abbildung 3.11A und 3.11B zeigen zunächst die erfolgreiche siRNA Transfektion: die IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expression in teilresistenten EPLC Zellklonen, die mit siRNA behandelt wurden, konnte auf ca. 64% der teilresistenten und mit ntRNA behandelten Zellklone reduziert werden. Die SERCA 1/2/3 Expression in naiven, mit siRNA behandelten, H1339 Zellen konnte auf 75% der naiven, mit ntRNA behandelten, Zellen reduziert werden.

Betrachtet man die Überlebenskurven nach Inkubation mit 0,5 $\mu$ g/ml Cisplatin in Abbildung 3.11A und 3.11B, so ist zunächst festzuhalten, dass auf der x-Achse die Zeit nach Cisplatin-Exposition in Tagen (d) und auf der y-Achse die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent der 0-Kontrolle, d.h. der nicht mit Cisplatin vorbehandelten Zellen, aufgetragen ist.

Abbildung 3.11A zeigt, dass die Reduktion der IP<sub>3</sub>R 1/2/3 in teilresistenten EPLC 32M1 Zellen zu einer Verminderung der Überlebensrate verglichen mit den teilresistenten, ntRNA behandelten Zellen führt und sich der Überlebenskurve der naiven EPLC 32M1 Zellen angleicht. Die Überlebensraten der teilresistenten siRNA Zellen ist signifikant verringert im Vergleich zu den teilresistenten ntRNA EPLC 32M1 Zellen (\*P<0,01, two way ANOVA). Abbildung 3.11B zeigt, dass die Reduktion der SERCA 1/2/3 ATPasen in naiven H1339 Zellen zu einer erhöhten Überlebensfraktion nach Cisplatinexposition führt, verglichen mit den naiven Zellen, welche mit ntRNA behandelt wurden. Darüber hinaus nähert sich die Überlebensfraktion der naiven siRNA H1339 Zellen den Überlebenskurven der teilresistenten H1339 Zellklone an. Die Überlebensraten der naiven, SERCA 1/2/3 supprimierten H1339

Zellen ist signifikant höher als die Überlebensraten der naiven ntRNA H1339 Zellen (\*P<0,01, two way ANOVA).

## 4. Diskussion

### 4.1 Relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin

In der histologischen Klassifikation der malignen epithelialen Lungentumore sind vor allem zwei große Gruppen zu unterscheiden: das nicht-kleinzelige Lungenkarzinom (NSCLC) sowie das kleinzelige Lungenkarzinom (SCLC). Ungefähr 85% aller Lungentumore sind der NSCLC-Klassifikation zuzuordnen, wovon wiederum 25-30% den Plattenepithelkarzinom-Tumoren, 40% den Adenokarzinomen und ca. 10-15% den großzelligen Tumoren zugeordnet werden können. 15% aller Lungentumore sind kleinzelige Lungenkarzinome (American Cancer Society). In dieser Arbeit wurden mit der Auswahl der EPLC 32M1 Zellen, als einer der häufigsten Subtypen des nicht-kleinzeligen Lungenkarzinoms, sowie mit der Auswahl der kleinzeligen H1339 Zelllinie jeweils ein Vertreter der großen histologischen Gruppen gewählt.

Cisplatin ist in der medikamentösen Therapie sowohl kleinzelliger als auch nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome eines der effektivsten und eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Darstellung der Resistenzentwicklung der Lungenkarzinomzellen, war es das Ziel die „*in vivo*“ Situation bestmöglich nachzuahmen. Hierzu wurden die Cisplatin-Konzentrationen von 0,5µg/ml, 1,0µg/ml und 2,0µg/ml, als auch die Inkubationsdauer von 3h analog einer von de Jongh et al.(23) durchgeführten Studie gewählt. In dieser Studie wurde die *in vivo* Cisplatin-Pharmakokinetik von 268 erwachsenen Patienten analysiert. De Jongh et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Plasmakonzentration des freien ungebundenen Cisplatin seinen Spitzenvwert ca. 3h nach intravenöser Applikation mit ungefähr 1µg/ml erreicht und anschließend ein schneller Abfall der Plasmaspiegel folgt. Da in den Studienergebnissen jedoch eine gewisse Streubreite der Cisplatin-Plasmakonzentrationen von ca. 0,5µg/ml bis zu 2,0µg/ml zu beobachten war, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Resistenzentwicklung auf diese Cisplatin-Plasmakonzentrationen getestet. Darüber hinaus werden im klinischen Alltag in der Regel vier Zyklen Chemotherapie verabreicht, mit der Option weiterer zwei Zyklen. Aus diesem Grund wurden die Lungenkarzinomzellen dieser Arbeit vierfach mit Cisplatin der oben genannten Konzentrationen behandelt.

Im Rahmen der Cisplatin-Resistenzversuche konnte eine signifikante relative Resistenzentwicklung der vierfach mit Cisplatin vorbehandelten Zellen gezeigt sowie teilresistente Zellklone beider Linien gewonnen werden. Um einen Verlust der gewonnenen

Cisplatin-Resistenz zu verhindern und eine konstante Resistenz für alle weiteren Versuche sicherzustellen, wurden die teilresistenten Zellklone für maximal vier Passagen kultiviert und anschließend verworfen.

Calcium ist ein an nahezu allen intrazellulären Prozessen, darunter an Proliferation, Apoptose und somit möglicherweise bei der Resistenzentwicklung, beteiligtes Ion (8;9;15). Nachdem es gelungen ist die Resistenzentwicklung *in vitro* nachzuahmen, schloss sich die Frage an, ob Calcium an dieser Resistenzentwicklung beteiligt ist. Durch Pufferung des intrazellulären Calciums mit Hilfe des Calcium-Chelators BAPTA-AM konnte ebenfalls eine relative Resistenzentwicklung nachgeahmt werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass Calcium an der Resistenzentwicklung sowohl kleinzelliger als auch nicht-kleinzelliger Lungenkarzinomzellen beteiligt ist. Auch andere Arbeitsgruppen wie z.B. Tsunoda et al. konnten den Zusammenhang einer verminderten intrazellulären Calcium-Konzentration und einer Cisplatinresistenzentwicklung aufzeigen: in Blasenkarzinomzelllinien konnte nach Inkubation mit BAPTA-AM ebenfalls eine verminderte Cisplatin-Sensitivität nachgewiesen werden (74). Ferner berichteten Liang et al. über eine um zwei Drittel verminderte intrazelluläre freie Calcium-Konzentration in cisplatinresistenten humanen Adonokarzinomzellen A549 der Lunge im Vergleich zu den naiven Zellklonen (45).

## 4.2 $\text{Ca}^{2+}$ Imaging

Im Rahmen der eigens durchgeföhrten Untersuchungen, in denen eine relative Resistenzentwicklung durch Pufferung des intrazellulären Calciums gezeigt werden konnte, konnte ein Zusammenhang zwischen Calcium und Resistenzentwicklung aufgezeigt werden. Doch daraus ergab sich auch die Fragestellung durch welche Regulationsmechanismen Calcium, als so vielseitiges eingesetztes Signalmoleköl, gesteuert werden kann. Ein sehr komplexes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling Toolkit ermöglicht innerhalb einer Zelle ein sehr unterschiedliches räumlich - zeitliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Muster bzw. eine unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik (8;9). Beispieldhaft hierfür zu nennen sind anhaltende oder lang andauernde  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, welche die Proliferation über den Calcineurin/NFAT Signalweg anregen (46;48) oder im Kontrast dazu, kurze, hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Anstiege, welche zu einer mitochondrialen Calciumüberladung und damit einhergehenden Apoptoseinduktion führen (25;54;56). Dieses Gleichgewicht muss sensiblen Regulationsmechanismen unterliegen um unkontrollierter Proliferation oder reduzierter Apoptose Einhalt zu gebieten.

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen zur Calcium-Homöostase in NSCLC und SCLC Zellen wurden Calcium-Signaling Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu mit dem Calcium-Indikator Fluo-4 AM gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des weit verbreiteten Calcium-Indikators Fluo-3 AM. Fluo-4 AM ist ein

Einzelwellenlängenfarbstoff, der einfach mit einem Argonlaser (488nm) für konfokale Mikroskopie angeregt werden kann. Seine relativ niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $K_d \sim 345\text{nM}$ ) führt zu geringen Problemen bezüglich der Pufferung ruhender intrazellulärer Calcium Level. In Ruhe und der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form ist die Fluo-4-Eigenfluoreszenz minimal, nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung steigt die Fluoreszenz um das 100-fache. Fluo-4 ist also ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff, um dynamische photometrische Messungen durchzuführen (30;59).

Bei diesen Versuchen konnte zunächst gezeigt werden, dass durch Stimulation der mit Fluo-4 gefärbten Zellen mit 1mM ATP eine Entleerung des ER, welches als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert, erfolgt. Leider ist eine verlässliche, direkte Messung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  durch Fluoreszenzindikatoren nicht praktikabel. Daher wurde der durch ATP-Stimulation resultierende Fluoreszenzanstieg als semiquantitative Abschätzung des ER-Calcium Gehaltes gewertet.  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Anstiege entstehen entweder durch Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Zur grundlegenden Unterscheidung, ob bei der Stimulation mit 1mM ATP der extrazelluläre Calcium-Gehalt und somit auch der Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum, eine bedeutende Rolle spielt, wurden bei naiven Zellen beider Linien Stimulationsversuche mit bzw. ohne extrazellulärem Calcium durchgeführt (vgl. Abb. 3.6). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Stimulation gezeigt werden, woraus geschlossen werden konnte, dass der Einstrom von extrazellulärem Calcium bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calcium-Homöostase in H1339 als auch EPLC 32M1 Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Somit konnte im weiteren Verlauf der weiteren Untersuchungen der Fokus auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase gelegt werden. Die Stimulation naiver als auch teilresistenter Zellklone mit 1mM ATP zeigte bei beiden Zelllinien einen signifikant verminderten Fluoreszenzanstieg der teilresistenten Zellklone im Vergleich zu den naiven Zellen. Der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  -Gehalt ist somit in teilresistenten Zellklonen im Vergleich zu naiven Zellklonen signifikant vermindert. Zur weiteren Verifizierung des gewonnenen Ergebnisses wurden Inhibitionsversuche der SERCA 1/2/3 Pumpen mittels Cyclopiazonic Acid durchgeführt. Cyclopiazonic Acid ist ein Mycotoxin, das durch einige Penicillin Cyclopium und Aspergillus Flavus Stämme produziert wird (34). Cyclopiazonic Acid verhindert die SERCA Affinität für ATP und führt somit zur Inhibition (41). Alle SERCA Isoformen haben die gleiche Sensitivität für Cyclopiazonic Acid, womit eine gleiche Inhibition gewährleistet war (41). Die Inhibition der SERCA 1/2/3 Pumpen führt zu einem sukzessiven Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Membran des ER. Hierbei konnte bei den EPLC 32M1 als auch H1339 Zellen ein signifikant verminderter Fluoreszenzanstieg in teilresistenten Zellklonen im Vergleich zu naiven Zellklonen festgestellt werden. Das zunächst gewonnene Ergebnis konnte somit bestätigt werden.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten einen verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt sowohl in naiven Lungenkarzinomzellen der kleinzelligen Zelllinie H1339, als auch in Adenokarzinomzellen der Zelllinie HCC, im Vergleich zu dem  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt in normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE). Dieser Unterschied konnte allerdings nicht für die Zelllinie EPLC 32M1 bzw. für die großzellige Lungenkarzinomzelllinie (LCLC) dargestellt werden (6). Die in den Untersuchungen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eines verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehaltes in teilresistenten Karzinomzellen im Vergleich zu naiven Karzinomzellen stellt also eine Weiterentwicklung der Apoptoseresistenz im Vergleich zum normalen humanen Bronchialepithel dar. Padar et al. konnten anhand der humanen Adenokarzinomzelllinie A549 der Lunge einen verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt in Taxol-resistenten Klonen sowie einen verminderten  $Ca^{2+}$ -Einstrom über speicherabhängige Calciumkanäle (store-operated calcium channels) in Taxol-resistenten Zellen nachweisen. Auch Vanoverberghe et al. konnten einen reduzierten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt mit Apoptoseresistenz assoziieren. Hierbei handelte es sich um apoptoseresistente, neuroendokrine Prostatakarzinomzellen, die einen verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt durch verminderte Expression von SERCA 2b und Calretikulin sowie durch reduzierten speicherabhängigen Calcium Einstrom aufwiesen (76). Chen et al. beschreiben einen reduzierten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt in Doxorubicin-resistenten Mammakarzinomzellen (16). Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass durch zytotoxische Agenzien wie zum Beispiel Doxorubicin reaktive freie Sauerstoffradikale entstehen, welche die in ER, Mitochondrien und Plasmamembran enthaltenen Sauerstofftransportmechanismen beschädigen. Diese Schädigung führt zu einer Störung der intrazellulären Calcium-Homöostase mit einem einhergehenden Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und einer daraus resultierenden Apoptoseinduktion. Allerdings werden in dieser Studie die dem veränderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt zugrunde liegenden Mechanismen nicht untersucht. Fasst man die gewonnenen eigenen Untersuchungsergebnisse sowie die aktuelle Fachliteratur zusammen, so scheint ein verminderter  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt mit einer Resistenz auf Chemotherapeutika korreliert zu sein.

### 4.3 Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung

Zur Analyse der molekularen Grundlagen, die den reduzierten ER-Calcium-Gehalt in teilresistenten Zellklonen der Zelllinien EPLC 32M1 und H1339 bestimmt, erfolgte mittels Western Blot die semiquantitative Bestimmung der wichtigsten, an der intrazellulären Calcium-Homöostase beteiligten Proteine, nämlich SERCA 1/2/3 , IP<sub>3</sub>R 1/2/3, RYR 1/2/3, Calsequestrin 1/2 und Calretikulin. Die Proteine Calsequestrin 1/2 als auch RYR1/2/3 lagen in beiden Zelllinien unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus kann geschlossen werden, dass Calsequestrin 1/2 und RYR1/2/3 in H1339 oder EPLC 32M1 Zellen nur in geringem Ausmaß

exprimiert sind und mittels Western Blot Analyse nicht detektiert werden können. Hieraus kann abgeleitet werden, dass Calsequestrin 1/2 und RYR1/2/3 in der intrazellulären Calcium-Homöostase der Lungenkarzinomzellen lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Betrachtet man die Ergebnisse der Western Blot Analyse von naiven sowie teilresistenten EPLC 32M1 Zellen, so zeigt sich, dass CRT und SERCA 1/2/3 keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression aufweisen; allerdings sind IP<sub>3</sub>R 1/2/3 in teilresistenten Zellklonen signifikant stärker exprimiert als in naiven Zellklonen. In H1339 Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 und CRT. Jedoch sind in teilresistenten Zellklonen die SERCA 1/2/3 Pumpen signifikant vermindert exprimiert.

Die in der Western Blot Analyse ermittelten Ergebnisse wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 in naiven und teilresistenten EPLC 32M1 Zellklonen und SERCA 1/2/3 in naiven und teilresistenten H1339 Zellklonen überprüft. Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht neben einer Quantifizierung der Proteinmenge den Überblick über die Verteilung der markierten Proteine innerhalb der Zelle sowie deren genaue subzelluläre Lokalisation.

In teilresistenten EPLC 32M1 Zellen konnte im Vergleich zu naiven Zellklonen eine signifikant vermehrte IP<sub>3</sub>R 1/2/3 - Expression nachgewiesen werden. Außerdem konnte in naiven ebenso wie in teilresistenten Zellklonen eine intrazelluläre Lokalisation der IP<sub>3</sub>R 1/2/3 gezeigt werden; betrachtet man zusätzlich das Verteilungsmuster der Rezeptoren (vgl. Abb. 3.10) so zeigt sich ein streifiges Muster, welches ein typisches Merkmal des ER bildet. Daher kann man davon ausgehen, dass die IP<sub>3</sub>R 1/2/3 an der äußeren Membran des ER lokalisiert sind. In naiven H1339 Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von SERCA 1/2/3 verglichen mit den teilresistenten Zellklonen. Ferner konnte hier eine intrazelluläre, streifenförmige Distribution der SERCA 1/2/3 Pumpen gezeigt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die SERCA 1/2/3 Pumpen an der Membran des ER lokalisiert sind.

Fasst man die Ergebnisse der Western Blot Analyse und der Immunfluoreszenzfärbung zusammen, so lassen sich folgende zwei Zwischenhypthesen als Grundlage für die verminderte Calcium-Homöostase in teilresistenten Zellklonen beider Zelllinien formulieren:

- 1) In teilresistenten EPLC 32M1 Zellen führt eine signifikant erhöhte Expression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 an der Membran des ER zu einem Leckstrom über die Membran des ER. Dies bedingt den signifikant verminderten intraretikulären Calcium-Speicher.
- 2) Teilresistente H1339 Zellen zeigen eine signifikant verminderte SERCA 1/2/3 Expression an der Membran des ER, was zu einem verminderten Ca<sup>2+</sup>-Transport in das ER und somit zu einem verminderten ER- Ca<sup>2+</sup>-Gehalt führt.

Die IP<sub>3</sub>-Rezeptor Isoformen haben außerhalb des Zentralen Nervensystems ein sehr unterschiedliches und teilweise überlappendes Expressionsmuster. In einer und der selben Zelle können somit unterschiedliche Isoformen parallel auftreten und darüber hinaus kann sich das Expressionsmuster auch im Rahmen der Differenzierung einer Zelle verändern (29). Basierend auf diesen Grundlagen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die IP<sub>3</sub>R 1/2/3 als Gesamtheit untersucht. Im Wesentlichen geht man davon aus, dass die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren 1/2/3 intrazellulär an der Membran des ER lokalisiert sind (28;29;57;64). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein Calcium-Kanal der sich aus einem Tetramer aus vier Untereinheiten zusammensetzt und durch Bindung von IP<sub>3</sub> geöffnet wird (29). Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von Splettstoesser et al., die einen Cisplatin induzierten Apoptosemechanismus in HeLa-S3 Zellen durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über an der Plasmamembran gelegene IP<sub>3</sub> Rezeptoren in Abhängigkeit von der extrazellulären schreiben Ca<sup>2+</sup>- Konzentration beschreiben (69). Dennoch konnte in den vorliegenden Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung eine intrazelluläre, in der ER-Membran gelegene, Lokalisation der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren in EPLC 32M1 Zellen gezeigt werden. Sakakura et al. konnten eine Überexpression von IP<sub>3</sub>R Typ 3 in einer bereits in das Peritoneum metastasierten Magenkarzinomzelllinie zeigen. IP<sub>3</sub>R Typ 3 war in dem ursprünglichen, nicht metastasierten Tumor, sowie in den gesunden Magenepithelzellen nur schwach exprimiert. Die Autoren schlussfolgerten, dass die IP<sub>3</sub>R Typ 3 Expression mit dem Übergang in einen metastasierenden Phänotyp des Magenkarzinoms korreliert (65). Diese Ergebnisse zeigen Parallelen zu der Resistenzentwicklung in EPLC 32M1 Lungenkarzinomzellen auf, die mit einer erhöhten IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expression auch in ein aggressiveres Stadium übergeht. Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass IP<sub>3</sub>R abhängige Signalwege eine zentrale Rolle in der Apoptose spielen, da die exzessive Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER über die IP<sub>3</sub>R 1/2/3, wie bereits einleitend beschrieben, für die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Überladung und folgende Apoptoseinduktion verantwortlich ist (25;32;37). Ferner gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Caspase-3 den IP<sub>3</sub>R spaltet, wobei ein 95kD „channel-only“ Fragment entsteht (37). Man nimmt an, dass das IP<sub>3</sub>R Fragment einen konstitutiven undichten Ca<sup>2+</sup>-Kanal bildet, der wiederum für einen anhaltenden Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> verantwortlich ist (37), wobei diese Hypothese noch nicht endgültig nachgewiesen ist (37;72). Des weiteren führt, wie einleitend beschrieben, die durch Apoptosestimuli bedingte Freisetzung von Cytochrom c zu einer Bindung an IP<sub>3</sub>- Rezeptoren, was zu einem Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER führt. Das ausströmende Ca<sup>2+</sup> wird von den Mitochondrien aufgenommen und induziert die Freisetzung von großen Mengen Cytochrom c mit nachfolgender Apoptoseinduktion im Sinne eines sich selbst verstärkenden Prozesses(10;54). Chen et al. stellten in ihren Untersuchungen fest, dass das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 mit IP<sub>3</sub>- Rezeptoren Komplexe bildet, welche zu einem verminderten Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER führen. Dies führt also zu einer

Abschwächung der durch IP<sub>3</sub>- Rezeptoren verursachten Zellsignale (17). In anfänglichen Studien zur Untersuchung der Interaktion zwischen IP<sub>3</sub>- Rezeptoren und Apoptose zeigte sich, dass IP<sub>3</sub>R Typ 3 in apoptotischen T-Lymphozyten hochreguliert war. Unterdrückung der IP<sub>3</sub>R Typ 3 Expression durch siRNA schützte umgekehrt vor Apoptose (39). In späteren Analysen der Fas-abhängigen Apoptoseinduktion in Jurkat T-Lymphozyten konnte dargestellt werden, dass eine Inhibition der Calcium-Freisetzung über IP<sub>3</sub>R zu einer verminderten Apoptoseinduktion führte (70). Tsunoda et al. kamen zu dem Ergebnis, dass IP<sub>3</sub>R Typ 1 in Blasenkarzinomzellen nach Cisplatin-Exposition sowie in Cisplatin-resistenten Zellen herunterreguliert ist (74). SiRNA IP<sub>3</sub>R Typ 1 Transfektion in parentale Blasenkarzinomzellen führte umgekehrt zu einer Resistenzinduktion (74). Fasst man die gegenwärtigen Studienergebnisse zusammen, so geht daraus hervor, dass eine gesteigerte IP<sub>3</sub>- Rezeptor Expression mit einer gesteigerten Apoptoseinduktion und eine verminderte IP<sub>3</sub>- Rezeptor Expression mit einer verminderten Apoptoseinduktion korrelieren. Diese Resultate stehen im großen Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten, in denen eine signifikant gesteigerte IP<sub>3</sub>- Rezeptor Expression mit einer Resistenzentwicklung in EPLC 32M1 Zellen korreliert. In dieser Arbeit korreliert eine Überexpression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 mit einer Resistenzentwicklung und schützt somit vor Apoptose. In Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit vorliegenden IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expressionsmustern, stehen *in vivo* Daten aus NSCLC-Patienten (33). Heighway et al. fanden in der DNA –Analyse des resezierten Tumormaterials im Vergleich zu dem umliegenden gesunden Gewebe eine verstärkte Genamplifikation des IP<sub>3</sub>R Typ 2. Diese ist coamplifiziert mit KRAS2, einem Gen das bei Läsionen an 12p11.1 – p12.1 sehr stark in die Entwicklung von humanen Neoplasien involviert ist (33). Dies konnte insbesondere im Hinblick auf das Adenokarzinom der Lunge gezeigt werden (33). In Übereinstimmung zu den hier vorliegenden Daten steht die Arbeit von Bergner et al., der anhand *in vitro* Daten feststellte, dass sowohl in kleinzelligen Lungenkarzinomzellen H1339, als auch in nicht-kleinzelligen Adenokarzinomzellen HCC IP<sub>3</sub>R 1/2/3 im Vergleich zu normalen, gesunden Bronchialepithelzellen NHBE signifikant erhöht sind (6). Die vermehrte Expression von IP<sub>3</sub>R 1/2/3 korrelierte mit einer reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Homöostase des ER in diesen Zellen. Insgesamt bleibt die zentrale Frage zu beantworten, inwiefern die Überexpression von IP<sub>3</sub>R die ER Ca<sup>2+</sup>-Homöostase reduziert und somit vor Apoptose zu schützen vermag. Die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase des ER wird im Wesentlichen aufrechterhalten durch die ATP-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme über die SERCA-Pumpe und die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER über IP<sub>3</sub>R und RYR. Funktionsfähige IP<sub>3</sub>R Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungskanäle bestehen aus vier heterotetrameren Komponenten. Jede Untereinheit der IP<sub>3</sub>R kann in drei verschiedene Untereinheiten unterteilt werden: die N-terminale IP<sub>3</sub>-Bindungsdomäne, die C-terminale Domäne bestehend aus einer Kanal-formenden Sequenz mit einem kurzem C-terminalen Ausläufer sowie eine dazwischen

liegende Verbindungsdomäne mit Rezeptoren für unterschiedliche Modulatoren (60). Szlufcik et al. stellten die Hypothese auf, dass der IP<sub>3</sub>R neben seiner regulären IP<sub>3</sub>-induzierten Öffnung auch einen Calcium-leak-Channel darstellt (72). In der zu Grunde liegenden Arbeit wird beschrieben, dass Kanaldomänen des IP<sub>3</sub>R in unmittelbarer Nähe der großen zytoplasmatischen, regulatorischen Region liegt. Durch physikalische oder funktionelle Trennung der zytoplasmatischen, regulatorischen Region von der Kanaldomäne kann die Formation einer „leaky“ oder schlecht funktionierenden Kanaldomäne resultieren. Beispiele für eine Modifikation der zytoplasmatischen Region sind zum Beispiel Proteolyse oder Mutation(72). Eine vermehrte Expression von IP<sub>3</sub>R auf der ER-Membran teilresistenter EPLC 32M1 Zellen führt also zu einem vermehrten Leckstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER und bedingt den reduzierten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> und damit einhergehend den Schutz vor Apoptose. Es ist anzunehmen, dass zur Aufrechterhaltung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> das ausströmende Ca<sup>2+</sup> durch Plasmamembran- Ca<sup>2+</sup>- ATPasen in den Extrazellulärraum gepumpt wird. Basierend auf der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Literaturrecherche, ist dies die erste Berichterstattung über eine Apoptoseprotektion durch vermehrte IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expression. Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass die IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Expression in die Cisplatin-Resistenzentwicklung von NSCLC Zellen involviert ist.

Die Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation in intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicher und der damit entstehende Ca<sup>2+</sup>-Gradient zwischen ER und Zytoplasma erfolgt durch die Ca<sup>2+</sup>-Transport ATPasen der SERCA Familie (77). SERCA-Pumpen werden durch drei verschiedene Gene kodiert, so dass die Hauptisoformen SERCA 1/2/3 entstehen. Durch alternatives Splicing erweitert sich das Spektrum auf mehr als zehn Unterisoformen (61). SERCA 1 ist hauptsächlich in schnell-kontrahierender Skelettmuskulatur exprimiert, SERCA 2 in kardialer Muskulatur und langsam-kontrahierenden Skelettmuskelfasern, allerdings auch in allen anderen nicht-muskulären Geweben. SERCA 3 ist vor allem in nicht-muskulären Geweben exprimiert insbesondere in hämatopoetischen Zelllinien, Thrombozyten, Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen (61). Die SERCA-Expression ist allerdings nicht nur gewebespezifisch, sondern unterliegt zum Beispiel in heranreifenden Muskelzellen, einer entwicklungsbedingten Regulation eines Isoformenswitchings (61), so dass im Rahmen dieser Arbeit ein relativ unspezifischer SERCA 1/2/3 - Antikörper verwendet wurde, der in der Lage war, alle Isoformen zu detektieren, um in entdifferenzierten Tumorzellen alle möglicherweise vorhandenen SERCA Isoformen zu erfassen. Eine verminderte SERCA Expression führt in dieser Arbeit in teilresistenten SCLC Zellklonen zu einer verminderten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> Konzentration durch einen geringeren Rückpumpmechanismus von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>Cyt</sub> in das ER. Auch in anderen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der SERCA-Expression und dem [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> –Gehalt aufgezeigt werden. Bei der Herzinsuffizienz konnten Yano et al. in kardialen Myozyten eine signifikant verminderte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> -Konzentration zeigen,

welche mit einer verminderten Expression von SERCA Pumpen assoziiert war (78). Darüber hinaus konnten klinische Studien der Phase I-III mit dem intravenösen SERCA 2A Stimulator Istaroxime einen neuen Therapieansatz für die Herzinsuffizienz mittels SERCA-Stimulation aufzeigen. Durch Stimulation der SERCA 2A Pumpe und der gleichzeitigen Steigerung der  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Konzentration konnte ein positiver inotroper Effekt bei Patienten mit Herzinsuffizienz erzielt werden (31). In Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe korrelierte eine bronchiale Hyperreagibilität im Tiermodell des Asthma bronchiale mit einer erhöhten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Konzentration (5). In einem Interleukin stimuliertem Asthma bronchiale Modell wurde der erhöhte  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt durch eine vermehrte SERCA Expression bedingt (38).

Die SERCA Expression wurde in früheren Studien bereits in Bezug auf Hypertrophie, Proliferation, Karzinogenese und Metastasierung untersucht, dennoch ist dies die erste Analyse in Bezug auf die Involvierung von SERCA Pumpen in die Resistenzentwicklung auf Chemotherapeutika der Krebstherapie.

Die Rolle der SERCA Pumpen in der Karzinogenese wurde von Prasad et al. untersucht (63). Den Autoren gelang es zu zeigen, dass haploinsuffiziente ATP2A2 knock-out Mäuse (ATP2A2 Gene kodieren für SERCA 2) für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Vormagen prädisponiert sind. In einer Arbeit von Bergner et al. konnte veranschaulicht werden, dass die SERCA2 Expression in H1339 Zellen im Vergleich zu normalen gesunden Bronchialepithelzellen signifikant vermindert ist (6). Darüber hinaus untersuchten Spira et al. die Effekte des Zigarettenrauches auf das humane Bronchialepitheltranskriptom (4;68). Die Autoren verglichen Raucher und Nichtraucher und kamen zu dem Ergebnis, dass in Rauchern die SERCA Expression signifikant erhöht ist. Ferner ist tendenziell die Expression von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und RYR hochreguliert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Veränderungen des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signalings und im speziellen die daran beteiligten Regulaturproteine der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher an der frühen Lungenkrebskarzinogenese beteiligt sind.

Hinsichtlich des aktuellen Forschungsstandes gibt es mehrere Studien, die die SERCA Expression in normalem und Tumorgewebe vergleichend untersucht haben. Lipskaia et al. stellten in Gewebeproben von Patienten sowie in Laborzelllinien oraler Plattenepithelkarzinomzellen eine verminderte SERCA2 Expression fest (46;55). Auch in Schilddrüsenkarzinomzellen konnte eine signifikant verminderte SERCA 2b mRNA Expression im Vergleich zum Normalgewebe bestimmt werden (58). Darüber hinaus konnte in Colonkarzinomzellen eine Abnahme der SERCA 3 Expression in Korrelation mit einer Abnahme der Zelldifferenzierung dargestellt werden (12). Sowohl in Colon- und Lungenkarzinomzellen somatischen, als auch Keimbahnursprungs konnte des weiteren gezeigt werden, dass eine Mutation des SERCA 2 Genes zu einer malignen Entartung prädisponiert (40). Chung et al. beschreiben neben einer signifikant erhöhten SERCA

Expression in Kolonkarzinomzellen, eine signifikant verminderte Überlebensrate in Patienten mit hoher SERCA 2 Expression, da dies auch mit einer Serosainfiltration und Lymphknotenmetastasierung korrelierte (18). Diese Erkenntnisse liefern Anhaltspunkte dafür, dass eine Veränderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings nicht nur in die frühen Phasen der Karzinogenese, sondern möglicherweise auch in die Transformation in einen aggressiveren Phänotyp involviert ist.

Aus Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen SERCA Expression, ER  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und Proliferation ging hervor, dass in Prostatakarzinomzellen eine erhöhte Wachstumsrate mit einem höherem  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  und einer erhöhten SERCA 2b Expression korrelierte (44). Des Weiteren zeigten die Autoren auf, dass eine verminderte Wachstumsrate mit einem verminderten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  und einer reduzierten SERCA 2b Expression in Verbindung stand. Eine künstliche Reduktion des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin führte ebenso zu einer verringerten Wachstumsrate (44). Die gleiche Arbeitsgruppe analysierte wenige Jahre später den Einfluss von Insulin-Growth-Factor (IGF) und Tumornecrosis-Factor alpha (TNFalpha) auf das Wachstumsverhalten von Prostatakarzinomen (35). IGF als Wachstumsfaktor führte zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  über eine vermehrte Expression von SERCA 2b und TNFalpha als Proliferationshemmer bzw. Apoptoseinduktor führte zu einem Abfall von  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  über eine verringerte SERCA 2b Expression. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass eine Stimulation mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin in hohen Konzentrationen zu einem starken  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{CYT}}$  Anstieg mit einer einhergehenden Apoptoseinduktion führte. Eine längere Inkubation mit geringen Thapsigargin-Konzentrationen führten hingegen zu einer Proliferationsinduktion durch einen moderaten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{CYT}}$  Anstieg (35). Diese Ergebnisse veranschaulichen nochmals die Multifunktionalität des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings im Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. Eine neuroendokrine Differenzierung von Prostatakarzinomzellen bedeutet häufig den Übergang in ein aggressiveres Tumorwachstum. Vanoverberghe et al. beschreiben eine, mit der neuroendokrinen Differenzierung einhergehende, Steigerung der Apoptoseresistenz auf Thapsigargin und Tumornekrosefaktor Alpha aufgrund einer Verminderung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ . Der verminderte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehalt wurde durch eine verminderte SERCA 2b und Calretikulin Expression verursacht (76). Prolaktin ist in vielen Geweben in Differenzierungs- und Wachstumsprozesse involviert, unter anderem in die des Prostatadrüsengewebes. Aus den Untersuchungen von Crepin et al. ging hervor, dass Prolaktin in immortalisierten Prostatazellen die Zellproliferation durch eine Steigerung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehalt über eine SERCA 2b Überexpression stimuliert (20). In einem sehr aktuellen Review Artikel beschreibt Lipskaia, dass Wachstum und Proliferation in nahezu allen Zellen durch die Aktivierung des Nukleären Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T-lymphocytes) reguliert wird, welcher durch einen lang anhaltenden Anstieg des zytosolischen Calciums stimuliert

wird (14;49). Bisher ist bekannt, dass in pathologischen Situationen oder unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsstimuli, eine Verminderung der SERCA Expression bzw. Aktivität zu einer Aktivierung von einem lagerabhängigen Calciumeinstrom über store-operated Calciumkanäle in die Zellen führt (46). Der resultierende  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  Anstieg führt anschließend zu einer Zellproliferation.

Betrachtet man die aktuelle Datenlage, so wird ersichtlich, dass die Rollen der SERCA Pumpen und des  $[Ca^{2+}]_{ER}$  Gehaltes in der Karzinogenese nicht klar zu definieren sind. Einerseits ist eine vermehrte Expression von SERCA-Pumpen über einen erhöhten  $[Ca^{2+}]_{ER}$ -Gehalt mit einer Proliferation in Prostatakarzinomzellen und einer Lymphknotenmetastasierung in Kolonkarzinomzellen assoziiert, andererseits korreliert eine verminderte SERCA-Expression durch einen verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehalt und einer reduzierten Apoptose mit der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen sowie der malignen Entartung von Lungen – und Kolonzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verminderte SERCA 1/2/3 Expression in teilresistenten H1339 Zellen durch verminderten  $Ca^{2+}$ -Rückpumpmechanismus mit einem verminderten  $[Ca^{2+}]_{ER}$  einhergeht. Ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zwischen naiven und teilresistenten H1339 Zellen konnte nicht beobachtet werden. Der reduzierte  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehalt korrelierte mit einer verminderten Apoptose in teilresistenten kleinzelligen Lungenkarzinomzellen. In dieser Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass die Resistenzentwicklung von kleinzelligen Lungenkarzinomzellen auf die chemotherapeutische Behandlung mit Cisplatin mit einer verminderten SERCA 1/2/3 Expression korreliert.

#### 4.4 siRNA Transfektion

In EPLC 32M1 Zellen korreliert die Resistenzentwicklung mit einer vermehrten  $IP_3R$  1/2/3 Expression in teilresistenten Zellklonen, in H1339 Zellen mit einer verminderten SERCA 1/2/3 Expression in teilresistenten Zellklonen. Um den Zusammenhang der veränderten Proteinexpression mit der Resistenzentwicklung im Umkehrschluss zu beweisen, wurden siRNA Transfektionsversuche durchgeführt. Die siRNA Transfektion ermöglicht es, die Aktivität spezifischer Gene auszuschalten bzw. zu verringern, indem sich sogenannte silencing-RNA als anti-sense RNA an die Ziel-RNA anlagert. Somit wird die Translation des Zielproteins verhindert und das Ziel-Protein gar nicht, oder nur noch reduziert exprimiert. Die Methode war somit in der vorliegenden Arbeit ein sehr geeignetes Mittel die Reversibilität der Resistenz in EPLC 32M1 Zellen zu prüfen, bzw. eine Resistenzentwicklung in H1339 nachzuahmen. In teilresistenten EPLC 32M1 Zellklonen erfolgte eine Supprimierung der  $IP_3R$  1/2/3 um eine Reversibilität der Resistenzentwicklung zu überprüfen. In H1339 wurde die

SERCA 1/2/3 Expression in naiven Zellklonen unterdrückt, um künstlich eine Resistenz zu induzieren. Bei nachfolgender Behandlung mit Cisplatin und der Erstellung von Überlebenskurven konnte in EPLC 32 M1 Zellen gezeigt werden, dass die Resistenz durch IP<sub>3</sub>R 1/2/3 Supprimierung reversibel ist. In H1339 Zellen zeigte sich die Möglichkeit einer Resistenzinduktion durch SERCA 1/2/3 Supprimierung in naiven Zellen. Es konnte somit im Umkehrschluss bewiesen werden, dass der durch veränderte Proteinexpression verminderte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> Gehalt in kleinzelligen ebenso wie nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen mit der Cisplatinresistenzentwicklung korreliert.

#### **4.5 Zusammenhang zwischen der verminderten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und der Apoptoseresistenz und die klinische Relevanz der Ergebnisse**

Apoptose kann durch unterschiedlichste Stimuli getriggert werden, zum Beispiel durch oxidativen Stress, Aktivierung von Todesrezeptoren durch Zytokine wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor oder Fas-Ligand, aber auch durch Toxine wie Chemotherapeutika. In früheren Forschungsprojekten zur Apoptose stand vor allem der Zellkern im Mittelpunkt. Neuere Untersuchungen von Scorrano et al. zeigen, dass in den meisten Fällen in den frühen Phasen der Apoptoseinduktion, vor allem die Interaktion zwischen Mitochondrien, ER und die Freisetzung von Cytochrom c entscheidend ist (66). Boehning et al. identifizierten Calcium als einen Messenger, der den Interaktionsprozess zwischen Mitochondrien und ER in der Apoptose antreibt (10). Erreicht ein Apoptosestimulus die Zelle, wie zum Beispiel die in dieser Arbeit durchgeführte Exposition zu Cisplatin, führt dies zur Induktion einer permeability-transition-Pore in einem benachbarten Mitochondrium und zu einer Freisetzung von geringen Mengen Cytochrom c. Das freigesetzte Cytochrom c diffundiert zu dem nahe gelegenen ER und bindet an das Carboxyende der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren. Dies führt zu einer massiven Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Anschließend folgt ein globaler Anstieg der zytoplasmatischen freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Dieses Ca<sup>2+</sup> wird wiederum von den Mitochondrien aufgenommen und es resultiert eine mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Überladung. Diese triggert eine massive Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches die Formation einer Apoptosoms induziert.

In dieser Arbeit kann folgende Hypothese aufgestellt werden: Neben der klassischen Cisplatin-Apoptoseinduktion über DNA-Basenpaarvernetzung führt die Cisplatinexposition zu oben beschriebenen Apoptosemechanismus. In den hier untersuchten kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen schützen sich Cisplatin-resistente Zellklone durch einen verminderten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>-Gehalt vor der Apoptose. Bei Apoptoseinduktion und der folgenden Cytochrom c Bindung an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren kommt es zu einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, dies schützt vor einer mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Überladung mit der daraus

folgenden massiven Cytochrom c Freisetzung, so dass ein Schutz vor einer Apoptose besteht.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten die Grundlage für neue Therapieoptionen in der medikamentösen Therapie des Lungenkarzinoms liefern. Die aktuellen Chemotherapieschemata beruhen, wie bereits einleitend beschrieben, in der Regel auf platinhaltigen Kombinationstherapien. Eine Verhinderung oder zumindest signifikante Reduzierung der Cisplatin-Resistenzentwicklung könnte für die Patienten eine merkbare Verbesserung der medianen Überlebenszeit bedeuten. Einen Ansatzpunkt hierfür würde also die Beeinflussung des  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehaltes bieten. In den letzten zwanzig Jahren wurden zahlreiche Pharmaka entdeckt, die die  $Ca^{2+}$ -Homöostase beeinflussen. Beispielsweise zu nennen sind die SERCA Inhibitoren Cyclopiazonic Acid oder Thapsigargin oder die Xestospongine bzw. 2-Aminoethoxy-Diphenylborate als Inhibitoren der Inositoltriphosphatrezeptor-getriggerten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (41). Bisher ist die Verwendung dieser Agenzien im experimentellen, denn im klinischen Bereich, anzusiedeln. Dennoch gibt es neue Medikamente die bereits Eingang in die klinische Medizin gefunden haben. Ein verminderter  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehalt stellt einen der Pathomechanismen der Herzinsuffizienz dar (78). Istaroxime ist ein Inhibitor der  $Na^+/K^+$  ATPase mit der Eigenschaft, die SERCA 2a Aktivität zu erhöhen und somit den  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehaltes anzuheben. In klinischen Phase I-II Studien zur Verbesserung der Herzinsuffizienz durch Istaroxime konnte gezeigt werden, dass die Herzfunktion signifikant verbessert wurde und darüber hinaus nur wenige Nebenwirkungen in Form von Übelkeit und Schmerzen an der Injektionsstelle auftraten (31;67). Auch eine Gentherapie kann die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase in kardialen Myozyten verändern. Hierzu werden aktuell eine Überexpression von SERCA Pumpen sowie eine Inhibition des hemmenden Effektes von Phospholamban auf die SERCA Aktivität für die potentielle Nutzung beim Menschen zur Behandlung der Herzinsuffizienz getestet (50). In der Krebstherapie könnten diese SERCA aktivierenden Medikamente die Sensitivität für die Chemotherapie erhöhen und somit die aktuell eingesetzten konventionellen Therapieverfahren verbessern. In teilresistenten H1339 Zellen mit einer verminderten SERCA Expression könnte eine Erhöhung der SERCA Aktivität den  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehaltes steigern. Aber auch in teilresistenten, durch einen vermehrten  $Ca^{2+}$ -Leckstrom,  $[Ca^{2+}]_{ER}$  defizienten EPLC 32M1 Zellen, könnte eine Aktivierung der SERCA Pumpen zu einer Steigerung des  $[Ca^{2+}]_{ER}$  –Gehaltes führen. Der Markt an Medikamenten, die die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase beeinflussen, hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, sodass nicht nur für Herzinsuffiziente Patienten neue Therapien entstehen, sondern auch neue, hoffnungsvolle Therapieoptionen für Tumorpatienten eröffnet werden können.

## 5. Zusammenfassung

Die medikamentöse Therapie der Lungenkarzinome beruht in der Regel auf platinhaltigen Kombinationstherapien. Die Chemotherapie bei Lungenkarzinomen führt häufig zu einer viel versprechenden Tumorreduktion. Allerdings wird die Lebenserwartung der Patienten durch die Resistenzentwicklung auf die Chemotherapie limitiert. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Chemotherapie mit Cisplatin die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von Lungenkarzinomzellen verändert, und ob dies mit der Resistenzentwicklung korreliert.

Die Plattenepithelkarzinomzelllinie EPLC 32M1 sowie die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie H1339 wurden mit vier „Zyklen“ Chemotherapie behandelt. Die Cisplatinkonzentrationen wurden analog der humanen *in vivo* Pharmakokinetik gewählt. Zur Analyse des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes wurden die Zellen mit dem zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 AM gefärbt. Durch externe Stimulation der Zellen erfolgte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem größten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Die Veränderungen der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet und somit eine semiquantitative Abschätzung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehaltes gewonnen. Die Proteinexpression der wichtigsten, an der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligten, Proteine wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sowie mit Western Blot Technik quantifiziert. Veränderungen der Genexpression wurden anhand von small-interfering (si) RNA Techniken untersucht.

Fasst man die gewonnenen Ergebnisse zusammen, so führten vier „Zyklen“ Cisplatin zu einer Resistenzentwicklung in EPLC als auch in H1339 Zellen. In teilresistenten Zellklonen beider Zelllinien war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des endoplasmatischen Retikulums (ER) vermindert. In teilresistenten EPLC Zellen korrelierte dies mit einer erhöhten Expression von Inositol-1,4,5-triphosphatrezzeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$  1/2/3). Eine Inhibition der vermehrten  $\text{IP}_3\text{R}$  Expression mittels siRNA konnte die Resistenzentwicklung aufheben. In teilresistenten H1339 Zellen korrelierte der verminderte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehalt mit einer verminderten Expression von sarco/endoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA 1/2/3). Eine Verminderung der SERCA Expression in naiven H1339 Zellen resultierte in einer Resistenzentwicklung der naiven Zellen.

Aus den Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, dass die Chemotherapie mit Cisplatin zu einem verminderten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehalt in teilresistenten Zellklonen führt. Dies wird in EPLC 32M1 Zellen durch eine Hochregulation der  $\text{IP}_3\text{R}$  und in H339 Zellen durch eine verminderte SERCA Expression verursacht. Cisplatin führt bei der Behandlung von Lungenkarzinomzellen nicht nur über den klassischen Weg der DNA-Basenpaarvernetzung zur Apoptoseinduktion. Die Cisplatinexposition führt zu einer Freisetzung von geringen Mengen Cytochrom c aus den Mitochondrien. Dieses wiederum bindet an die  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Die Bindung an die  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren führt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -

Freisetzung aus dem ER. Das ausströmende  $\text{Ca}^{2+}$  wird von den Mitochondrien aufgenommen und es resultiert eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, welche zu einer Freisetzung von großen Mengen Cytochrom c führt und die Apoptose final induziert. Teilresistente kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen schützen sich durch einen verminderten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  –Gehalt vor der Apoptose. In Zukunft könnten neue Medikamente, wie zum Beispiel der SERCA 2a Aktivator Istaroxime, durch eine Erhöhung des intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  –Gehaltes dazu beitragen, die Resistenzentwicklung auf die Chemotherapie mit Cisplatin zu reduzieren. Für Lungenkarzinompatienten könnte dies ein neuer Hoffnungsträger sein.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 1995 Oct 7;311(7010):899-909.
- (2) Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007 Sep;132(3 Suppl):29S-55S.
- (3) Alt A, Lammens K, Chiocchini C, Lammens A, Pieck JC, Kuch D, et al. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta. *Science* 2007 Nov 9;318(5852):967-70.
- (4) Beane J, Sebastiani P, Liu G, Brody JS, Lenburg ME, Spira A. Reversible and permanent effects of tobacco smoke exposure on airway epithelial gene expression. *Genome Biol* 2007;8(9):R201.
- (5) Bergner A, Kellner J, Silva AK, Gamarra F, Huber RM. Ca<sup>2+</sup>-signaling in airway smooth muscle cells is altered in T-bet knock-out mice. *Respir Res* 2006;7:33.
- (6) Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:25.
- (7) Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2005;67:1-21.
- (8) Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 Jul;4(7):517-29.
- (9) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 Oct;1(1):11-21.
- (10) Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003 Dec;5(12):1051-61.
- (11) Borst P, Rottenberg S, Jonkers J. How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell Cycle* 2008 May 15;7(10):1353-9.
- (12) Brouland JP, Gelebart P, Kovacs T, Enouf J, Grossmann J, Papp B. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 2005 Jul;167(1):233-42.
- (13) Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* 1997 Nov 14;73(4):592-9.
- (14) Cahalan MD, Zhang SL, Yeromin AV, Ohlsen K, Roos J, Stauderman KA. Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium* 2007 Aug;42(2):133-44.

- (15) Cerella C, D'Alessio M, De NM, Magrini A, Bergamaschi A, Ghibelli L. Cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> concentrations determine the extent and the morphological type of apoptosis, respectively. *Ann N Y Acad Sci* 2003 Dec;1010:74-7.
- (16) Chen JS, Agarwal N, Mehta K. Multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells contain deficient intracellular calcium pools. *Breast Cancer Res Treat* 2002 Feb;71(3):237-47.
- (17) Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, et al. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* 2004 Jul 19;166(2):193-203.
- (18) Chung FY, Lin SR, Lu CY, Yeh CS, Chen FM, Hsieh JS, et al. Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 expression as a tumor marker in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2006 Aug;30(8):969-74.
- (19) Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007 Dec 14;131(6):1047-58.
- (20) Crepin A, Bidaux G, Vanden-Abeele F, Dewailly E, Goffin V, Prevarska N, et al. Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem J* 2007 Jan 1;401(1):49-55.
- (21) Cullen MH, Billingham LJ, Woodroffe CM, Chetiyawardana AD, Gower NH, Joshi R, et al. Mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in unresectable non-small-cell lung cancer: effects on survival and quality of life. *J Clin Oncol* 1999 Oct;17(10):3188-94.
- (22) Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE. Selective inhibition of oxalate-stimulated Ca<sup>2+</sup> transport by cyclopiazonic acid and thapsigargin in smooth muscle microsomes. *Can J Physiol Pharmacol* 1996 Feb;74(2):182-92.
- (23) de Jongh FE, Verweij J, Loos WJ, de WR, de Jonge MJ, Planting AS, et al. Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure. *J Clin Oncol* 2001 Sep 1;19(17):3733-9.
- (24) Demaurex N, Distelhorst C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science* 2003 Apr 4;300(5616):65-7.
- (25) Deniaud A, Sharaf el dO, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 2008 Jan 10;27(3):285-99.
- (26) Eastman A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* 1986 Jul 1;25(13):3912-5.
- (27) Ferrari D, Pinton P, Szabadkai G, Chami M, Campanella M, Pozzan T, et al. Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> handling in apoptosis. *Cell Calcium* 2002 Nov;32(5-6):413-20.
- (28) Ferrerri-Jacobia M, Mak DO, Foskett JK. Translational mobility of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channel in endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 2005 Feb 4;280(5):3824-31.
- (29) Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev* 2007 Apr;87(2):593-658.

- (30) Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000 Feb;27(2):97-106.
- (31) Ghali JK, Smith WB, Torre-Amione G, Haynos W, Rayburn BK, Amato A, et al. A phase 1-2 dose-escalating study evaluating the safety and tolerability of istaroxime and specific effects on electrocardiographic and hemodynamic parameters in patients with chronic heart failure with reduced systolic function. *Am J Cardiol* 2007 Jan 22;99(2A):47A-56A.
- (32) Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium* 2000 Nov;28(5-6):349-63.
- (33) Heighway J, Betticher DC, Hoban PR, Altermatt HJ, Cowen R. Coamplification in tumors of KRAS2, type 2 inositol 1,4,5 triphosphate receptor gene, and a novel human gene, KRAG. *Genomics* 1996 Jul 1;35(1):207-14.
- (34) Holzapfel CW. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron* 1968 Mar;24(5):2101-19.
- (35) Humez S, Legrand G, Vanden-Abeele F, Monet M, Marchetti P, Lepage G, et al. Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha. *J Cell Physiol* 2004 Nov;201(2):201-13.
- (36) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009 May 27.
- (37) Joseph SK, Hajnoczky G. IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca<sup>2+</sup> release and beyond. *Apoptosis* 2007 May;12(5):951-68.
- (38) Kellner J, Tantzscher J, Oelmez H, Edelmann M, Fischer R, Huber RM, et al. Mechanisms altering airway smooth muscle cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis in two asthma models. *Respiration* 2008;76(2):205-15.
- (39) Khan AA, Soloski MJ, Sharp AH, Schilling G, Sabatini DM, Li SH, et al. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science* 1996 Jul 26;273(5274):503-7.
- (40) Korosec B, Glavac D, Rott T, Ravnik-Glavac M. Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2006 Dec;171(2):105-11.
- (41) Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 2004 Dec;56(4):439-513.
- (42) Laurie SA, Logan D, Markman BR, MacKay JA, Evans WK. Practice guideline for the role of combination chemotherapy in the initial management of limited-stage small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004 Feb;43(2):223-40.
- (43) Le CT, Scagliotti G, Natale R, Danson S, Rosell R, Stahel R, et al. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes. *Lung Cancer* 2005 Jan;47(1):69-80.
- (44) Legrand G, Humez S, Slomiany C, Dewailly E, Vanden AF, Mariot P, et al. Ca<sup>2+</sup> pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPases 2B

- involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* 2001 Dec 14;276(50):47608-14.
- (45) Liang X, Huang Y. Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biosci Rep* 2000 Jun;20(3):129-38.
- (46) Lipskaia L, Hulot JS, Lompre AM. Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflugers Arch* 2009 Jan;457(3):673-85.
- (47) Lipskaia L, Lompre AM. Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 2004 Feb;96(1):55-68.
- (48) Lipskaia L, Lompre AM. Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 2004 Feb;96(1):55-68.
- (49) Lipskaia L, Lompre AM. Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 2004 Feb;96(1):55-68.
- (50) Lipskaia L, Ly H, Kawase Y, Hajjar RJ, Lompre AM. Treatment of heart failure by calcium cycling gene therapy. *Future Cardiol* 2007 Jul;3(4):413-23.
- (51) Livingston RB. Small cell carcinoma of the lung. *Blood* 1980 Oct;56(4):575-84.
- (52) Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003 Mar 14;278(11):9100-6.
- (53) Manegold C, Bulzebruck H, Drings P, Vogt-Moykopf I. [Prognostic factors in small cell bronchial cancer]. *Onkologie* 1989 Oct;12(5):240-5.
- (54) Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003 Dec;5(12):1041-3.
- (55) Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat Rev Cancer* 2007 Jul;7(7):519-30.
- (56) Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 Jul;4(7):552-65.
- (57) Otsu H, Yamamoto A, Maeda N, Mikoshiba K, Tashiro Y. Immunogold localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* 1990 Jun;15(3):163-73.
- (58) Pacifico F, Ulianich L, De MS, Treglia S, Leonardi A, Vito P, et al. The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *J Mol Endocrinol* 2003 Jun;30(3):399-409.
- (59) Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008 Nov;46(3):143-51.
- (60) Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999 Mar;25(3):247-64.
- (61) Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007 Apr;35(4):430-42.

- (62) Poirier MC, Reed E, Shamkhani H, Tarone RE, Gupta-Burt S. Platinum drug-DNA interactions in human tissues measured by cisplatin-DNA enzyme-linked immunosorbent assay and atomic absorbance spectroscopy. Environ Health Perspect 1993 Mar;99:149-54.
- (63) Prasad V, Boivin GP, Miller ML, Liu LH, Erwin CR, Warner BW, et al. Haploinsufficiency of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 Ca<sup>2+</sup> pump, predisposes mice to squamous cell tumors via a novel mode of cancer susceptibility. Cancer Res 2005 Oct 1;65(19):8655-61.
- (64) Ross CA, Meldolesi J, Milner TA, Satoh T, Supattapone S, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. Nature 1989 Jun 8;339(6224):468-70.
- (65) Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda K, Shimomura K, Takemura M, Takagi T, et al. [Possible involvement of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers]. Gan To Kagaku Ryoho 2003 Oct;30(11):1784-7.
- (66) Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. Science 2003 Apr 4;300(5616):135-9.
- (67) Shah SJ, Blair JE, Filippatos GS, Macarie C, Ruzylo W, Korewicki J, et al. Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the Hemodynamic, Echocardiographic, and Neurohormonal Effects of Istaroxime, a Novel Intravenous Inotropic and Lusitropic Agent: a Randomized Controlled Trial in Patients Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial. Am Heart J 2009 Jun;157(6):1035-41.
- (68) Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 Jul 6;101(27):10143-8.
- (69) Splettstoesser F, Florea AM, Busselberg D. IP(3) receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca<sup>2+</sup>-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis. Br J Pharmacol 2007 Aug;151(8):1176-86.
- (70) Steinmann C, Landsverk ML, Barral JM, Boehning D. Requirement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for tumor-mediated lymphocyte apoptosis. J Biol Chem 2008 May 16;283(20):13506-9.
- (71) Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. Crit Rev Oncol Hematol 2007 Jul;63(1):12-31.
- (72) Szlufcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De SH. Uncoupled IP3 receptor can function as a Ca<sup>2+</sup>-leak channel: cell biological and pathological consequences. Biol Cell 2006 Jan;98(1):1-14.
- (73) Tsien RY. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 1998;67:509-44.
- (74) Tsunoda T, Koga H, Yokomizo A, Tatsugami K, Eto M, Inokuchi J, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. Oncogene 2005 Feb 17;24(8):1396-402.

- (75) Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG. Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry* 1997 Jan 1;27(1):54-64.
- (76) Vanoverberghe K, Vanden AF, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, et al. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2004 Mar;11(3):321-30.
- (77) Verboomen H, Wuytack F, De SH, Himpens B, Casteels R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca<sup>2+</sup> pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* 1992 Sep 1;286 ( Pt 2):591-5.
- (78) Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005 Mar;115(3):556-64.
- (79) Zwelling LA, Kohn KW. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II). *Cancer Treat Rep* 1979 Sep;63(9-10):1439-44.

## **7. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem gesamten Lebensweg immer unterstützt und mir in allen Lebenssituationen Rückhalt und Geborgenheit geschenkt haben. Neben der finanziellen Unterstützung und Förderung meines Studiums standen sie im Verlauf meiner Ausbildung und auch im Rahmen dieser Promotion allzeit mit Rat und Tat an meiner Seite.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. R.M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die freundliche Aufnahme als Doktorandin in die Abteilung und für die verständnisvolle und freundliche Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich insbesondere Herrn PD Dr. A. Bergner, Leiter des pneumologischen Forschungslabors der Medizinischen Klinik-Innenstadt, für die hervorragende und äußerst engagierte Betreuung dieser Arbeit danken. Herr PD Dr. A. Bergner unterstützte die Arbeit durch neue Ideen und Anregungen und zeigte ferner stets ein offenes Ohr bei technischen als auch theoretischen Problemen.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle Herrn Hamza Ölmez, medizinisch-technischer Assistent des pneumologischen Forschungslabors, Frau Julia Kellner, wissenschaftliche Mitarbeiterin, sowie meinen Mitdoktoranden für ihre äußerst hilfsbereite Unterstützung bei der Einarbeitung in verschiedene Labortechniken, vor allem aber für das stets kollegiale und freundliche Arbeitsklima danken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. S. Endres, Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie der Medizinischen Klinik, sowie dessen Mitarbeitern für die Mitbenutzung von Räumlichkeiten und Laborgeräten.

Ein abschließender Dank gilt allen hier nicht näher bezeichneten Personen, Freunden und Mitarbeiter der pneumologischen Abteilung, die mich während meiner Promotion unterstützt haben und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.