

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Markus Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EINFLUSS DES HUMANEN INTERMEDIATE CONDUCTANCE
K⁺-CHANNEL hIK1 AUF DIE CA²⁺-HOMÖOSTASE IN
MENSCHLICHEN KERATINOZYTEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
PHILIPP BERGMANN
aus Itzehoe

KIEL 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Alzheimer

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. K. Reiss

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2009

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 26. Mai 2009

gez. Prof. Dr. Kalthoff
(Stellvertretender Ausschussvorsitzender)

DISSERTATION

EINFLUSS DES HUMANEN INTERMEDIATE CONDUCTANCE K^+ -CHANNEL hIK1 AUF DIE Ca^{2+} -HOMÖOSTASE IN MENSCHLICHEN KERATINOZYTEN

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	1
1.1. Balance aus Differenzierung und Proliferation.....	1
1.2. Ca^{2+} als Regulator zellulärer Prozesse.....	2
1.3. Calcium-Signaling-Toolkit.....	3
1.3.1. Signalauslösende Stimuli.....	4
1.3.2. ON-Mechanismen zur Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$	5
1.3.3. Ca^{2+} -abhängige Prozesse in der Zelle.....	7
1.3.4. OFF-Mechanismen.....	7
1.4. Ca^{2+} als Second Messenger in Keratinozyten.....	8
1.4.1. Der Effekt von ATP auf die Keratinozytendifferenzierung und -proliferation.....	8
1.4.2. Ca^{2+} -vermittelte Differenzierung in Keratinozyten.....	9
1.4.3. Der Einfluss von Kalium auf die Differenzierung von Keratinozyten.....	11
1.4.4. Membranpotential und Calciumkonzentration.....	13
1.4.5. Der Effekt von ATP auf das Membranpotential von proliferierenden Keratinozyten.....	15
1.4.6. Die Eigenschaften von hIK1.....	18
1.4.7. Die Effekte einer Downregulation des hIK1 durch Langzeitinkubation mit 1-EBIO.....	20
1.5. Ziel dieser Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Material.....	22
2.1.1. Verbrauchsmaterial und verwendete Chemikalien.....	22
2.1.2. Badlösungen.....	23
2.2. Zellkultur.....	23
2.2.1. HaCaT-Keratinozyten.....	23

2.2.2. Keratinozyten der HaCaT-Kultur.....	23
2.2.3. Einfrieren von Reserve-Kulturen.....	24
2.2.4. Auftauen von Reservekulturen.....	24
2.2.5. Passagierung.....	24
2.3. Zellpräparation.....	25
2.3.1. Präparation der FluoroDishes®.....	25
2.3.2. Aussaat der Zellen.....	25
2.3.3. Inkubation mit 1EBIO.....	25
2.3.4. Zellfärbung.....	26
2.4. Fluoreszenz.....	26
2.4.1. Calcium Green-1 AM und Fura Red AM.....	27
2.5. Ratiometrische Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	28
2.6. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie.....	29
2.6.1. Laser-Modul.....	29
2.6.2. Scan-Modul.....	29
2.6.1. Mikroskopstativ.....	31
2.6.2. Konfokale Funktion.....	31
2.7. Perfusion.....	32
2.8. Protokolle und Auswertung.....	32
2.9. Statistik.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Messungen zur Validität der Methode.....	35
3.2. Der zeitliche Verlauf des ATP-induzierten Ca ²⁺ Transienten.....	36
3.3. Der Verlauf des Transienten ist dosisabhängig.....	37
3.4. Der Effekt einer persistierenden ATP-Applikation auf die [Ca ²⁺] _i	39
3.5. Die Bedeutung von Calciumströmen für die Form und Dauer des Transienten.....	40
3.5.1. Effekt des extrazellulären Ca ²⁺	40
3.5.2. Effekt von Calciumkanalblockern auf den ATP-induzierten Calciumtransienten.....	41
3.6. Der Effekt des hIK1-Kanals auf Dauer und Form des Calciumtransienten.....	43
3.6.1. Auswirkungen der verlängerten Inkubation mit 1-EBIO.....	43
3.6.2. Pharmakologischer Block des hIK1 mit TRAM-34.....	44
3.6.3. Effekt einer Hyperpolarisation auf die transmembranalen Calciumströme.....	45
3.6.4. Auswirkungen einer Hyperpolarisation ohne vorangehende Applikation von ATP.....	47
3.7. Die Amplituden der Calciumtransienten unter verschiedenen Versuchsprotokollen.....	48
4. Diskussion.....	51
4.1. Allgemeines.....	51
4.2. Diskussion der Methoden.....	52
4.2.1. Validität der Methode.....	52
4.2.2. Ausbleicheffekt.....	53

4.2.3. Verwendung relativer Maße.....	53
4.2.4. Die Farbstoffe als Störgröße.....	54
4.3. Dosiswirkungskurve.....	55
4.4. Extrazelluläres Ca^{2+} und sein Effekt auf die Form des Transienten.....	56
4.5. Der Effekt von ZnCl_2 auf transmembranale Calciumflüsse.....	58
4.6. Die Bedeutung des hIK1 für die transmembranalen Calciumflüsse.....	58
4.7. Effekt der Hyperpolarisation ohne den ATP-induzierten Transienten.....	60
4.8. Die Form des Calciumtransienten.....	62
4.8.1. Der initiale Aufstrich.....	62
4.8.2. Die erste Schulter.....	63
4.9. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	65
4.10. Weiterführende Fragestellungen.....	66
5. Zusammenfassung.....	68
6. Anhang und Verzeichnisse.....	70
6.1. Tabellenverzeichnis.....	70
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	70
6.3. Literaturverzeichnis.....	71
6.4. Danksagung.....	79
6.5. Lebenslauf.....	80

1. Einführung

1.1. Balance aus Differenzierung und Proliferation

Die Haut des Menschen erfüllt eine Vielzahl an lebenswichtigen Aufgaben, sie ist dabei das größte und schwerste Organ. Sie kann beim Erwachsenen eine Fläche von zwei Quadratmetern aufweisen und ein Gewicht von zehn Kilogramm erreichen.

Die äußerste Schicht der Haut bildet die Epidermis, ein mehrschichtiges verhornendes Epithel. Diese Zelllage besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, daneben finden sich auch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Durch die hohe Teilungsrates im Stratum basale rücken die Keratinozyten in oberflächlich gelegene Schichten vor. In dieser Zeit durchlaufen sie einen Differenzierungsprozess, welcher zur Bildung des Stratum corneum, einer mehrschichtigen Lage aus kernlosen Hautzellen führt. Diese Hornschicht verleiht der Haut ihre besondere Widerstandskraft gegen mechanische und chemische Einflüsse und ihre Eigenschaft als nahezu wasserdichte Diffusionsbarriere (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Haut benötigt ein fein eingestelltes Gleichgewicht aus Differenzierung und Proliferation ihrer Zellen. Wird dieses Gleichgewicht durch eine Störung der Zellhomöostase zu der einen oder anderen Seite verschoben, kann die Haut wesentlichen Aufgaben wie dem Schutz vor Verletzung, Infektion und Austrocknung nicht weiter nachkommen (Lee *et al.* 1994).

Eine Vielzahl von Dermatosen hat ein gestörtes Gleichgewicht zur Ursache (Proksch *et al.* 2006). Ebenso ist die Wundheilung auf eine Anpassung der Hautzellen an die veränderten Anforderungen angewiesen (Greig *et al.* 2003; Grubauer *et al.* 1989; Pillai und Bikle 1992).

Eine wesentliche Voraussetzung einer funktionierenden Zellhomöostase – in der Haut wie auch allen anderen Zellverbänden – ist ein gewebetypisch zusammengesetzter Satz an Organellen, mit dem die Zelle ihren Stoffwechsel bewerkstelligt sowie bestimmte Parameter ihrer Umgebung wahrnimmt und auf veränderte Anforderungen in geeigneter Weise reagieren kann.

Dieses „Toolkit“ besteht aus den Zellorganellen, welche in zellspezifischer Weise organisiert und verteilt sind. Die speziellen Fähigkeiten einer Zelle ergeben sich aus der Komposition ihrer Enzymaktivitäten, Ionenkanäle und -pumpen sowie Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Auch die differenzierte Regulation der Gentranskription gehört dazu, welche den unterschiedlichen Phasen im Verlauf des Lebenszyklus einer Zelle angepasst ist (Alberts *et al.* 2003).

1.1. Balance aus Differenzierung und Proliferation

Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Fertigkeiten, anhand derer eine Zelle ihr Milieu wahrnehmen und auf Störungen reagieren kann. Ein Beispiel für die zellspezifische Verteilung der Organellen ist die polare Anordnung von Ionenkanälen und -pumpen in transportierenden Epithelien, z.B. in Zellen des proximalen Nierentubulus. Die Mitochondrien liegen in diesen Zellen eng an der basolateralen Membran. Neurone wiederum zeichnen sich durch eine speziell auf die Generierung und Weiterleitung eines Aktionspotenzials ausgerichtete Zusammensetzung von Ionenkanälen im Plasmalemm aus (Kandel *et al.* 2000).

Die speziellen Fähigkeiten eines Keratinozyten liegen in der festen Struktur des Zellverbandes, in den er eingebunden ist und welcher der Haut ihre ungewöhnliche Stabilität bei mechanischer und chemischer Belastung verleiht. Zum anderen ist es auch die eindrucksvolle Fähigkeit der Haut und ihrer Zellen, auf gesteigerte Beanspruchung oder gar Verletzungen zu reagieren. Dies geschieht unter anderem durch Anpassung der Proliferationsrate und des Differenzierungsprozesses (Greig *et al.* 2003).

1.2. Ca^{2+} als Regulator zellulärer Prozesse

Ca^{2+} ist in seiner Eigenschaft als intrazellulärer Botenstoff („Second Messenger“) in eine Vielzahl von zellulären Prozessen eingebunden. Ca^{2+} ist nicht der einzige, aber ein wichtiger Bestandteil in der Regulierung von Prozessen wie Proliferation und Differenzierung (Berridge *et al.* 1999).

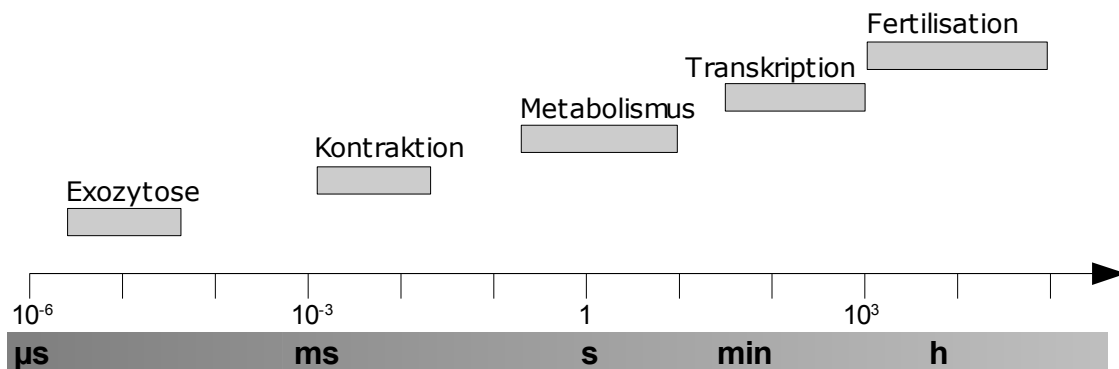


Abbildung 1: **Übersicht von calciumgesteuerten Zellprozessen und die Dauer der Ca^{2+} -Transienten.** Die Dauer von Ca^{2+} -Transienten erstreckt sich über mehrere Größenordnungen. Unterschiedliche Zellfunktionen reagieren auf Transienten einer bestimmten zeitlichen Länge. Die Exozytose von Transmittervesikeln neuronaler Synapsen erfordert Ca^{2+} -Transienten von 100 μs Dauer und Kontraktionen von Skelettmuskelfasern werden durch 10 ms lange Signale ausgelöst. Dagegen haben die Ca^{2+} -Transienten bei der Fertilisation einer Oozyte eine Dauer von etwa einer Stunde (modifiziert nach Berridge *et al.* 2003).

In Ruhe besitzen Zellen eine zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Größenordnung von 10 - 100 nM. Bei Aktivierung – z.B. durch Bindung eines Liganden an einen membranständigen Rezeptor und diesem nachgeordnete Kaskaden – kann diese Konzentration auf Werte von über 1-2 μM ansteigen (Berridge *et al.* 2000; Bootman und Berridge 1995; Clapham 2007). Eine Vielzahl von biologischen Vorgängen greift auf das zweiwertige Ion zurück (vergl. Abbildung 1).

Im Rahmen des Keratinozytenstoffwechsels ist bislang nicht abschließend geklärt, in welche Prozesse Ca²⁺-Signale eingebunden sind. Auch wenn in Keratinozyten möglicherweise auch Exozytosevorgänge stattfinden, werden es eher metabolische Prozesse sowie Transkriptionsvorgänge sein, deren Steuerung Calciumsignale dienen.

Nicht nur in Keratinozyten, in fast allen Zellarten findet Ca²⁺ seine Anwendung als Second Messenger. In dieser Eigenschaft wird Ca²⁺ daher als *universal* bezeichnet. Diese Universalität als Second Messenger erreicht Ca²⁺ durch die Vielseitigkeit, in der seine Konzentration im Zytosol reguliert wird (Berridge *et al.* 2000).

Die Geschwindigkeit des Konzentrationsanstiegs oder -abfalls, die Amplitude, die Dauer und Frequenz der Konzentrationserhöhung sowie die räumlichen Verteilung des zytosolischen Calciums ermöglichen ein differenziertes Muster, mit dem unterschiedlichste zelluläre Prozesse gesteuert werden können (Berridge *et al.* 2000).

1.3. Calcium-Signaling-Toolkit

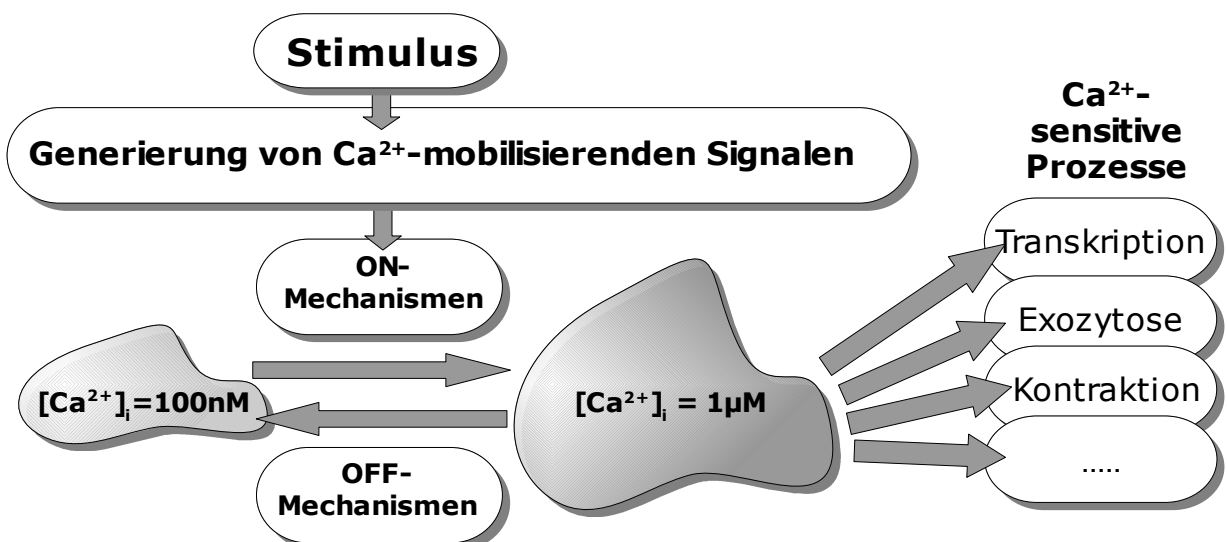


Abbildung 2: **Die Komponenten des Calcium-Signaling.** Ein Stimulus induziert die Generierung von Ca²⁺-mobilisierenden Signalen. ON-Mechanismen führen zu einer erhöhten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration, welche abhängig von ihrem zeitlichen Verlauf unterschiedliche Ca²⁺-sensitive Prozesse zu steuern vermag. OFF-Mechanismen führen die Zelle in den Ruhezustand zurück durch Pufferung bzw. Entfernung des zytosolischen Ca²⁺ (modifiziert nach Berridge *et al.* 1999).

Um präzise in zelluläre Prozesse wie Transkription, Migration oder Mitose eingreifen zu können, steht dem Keratinozyten – wie auch den meisten anderen Zellen – ein „Ca²⁺-Signaling-Toolkit“ (Berridge *et al.* 2000) zur Verfügung. Dieses Toolkit besteht aus den unterschiedlichen intrazellulären Organellen, welche im Zusammenspiel eine Vielfalt an Ca²⁺-Signalen erzeugen können. Das Ca²⁺-Signaling-Toolkit lässt sich in vier funktionelle Einheiten gliedern (vergl. Abbildung 2):

- die Stimuli, die das Ca^{2+} -Signal auslösen,
- die ON-Mechanismen, die zu der Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung führen,
- die Steuerung des jeweiligen Ca^{2+} -sensitiven Prozesses (Effektor),
- die OFF-Mechanismen, die das Ca^{2+} aus dem Zytosol entfernen und die Zelle zu basalem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen (Berridge *et al.* 2000).

1.3.1. Signalauslösende Stimuli

Für die Generierung eines Ca^{2+} -Signals wird sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres Ca^{2+} herangezogen. Zu den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gehört zum einen das Endoplasmatische Retikulum (ER, bzw. in Myozyten das Sarkoplasmatische Retikulum SR), zum anderen dienen auch Mitochondrien (Babcock *et al.* 1997; Hoth *et al.* 1997) und zytoplasmatische Puffer wie Calbindin D-28, Calretinin oder Parvalbumin (Berridge *et al.* 2003) als Speicher für intrazelluläres Calcium.

Es existieren eine Reihe von Signalwegen, welchen allen gemeinsam ist, dass sie in der Generierung von Inositoltriphosphat (InsP_3), cyclischer Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR), Nikotinsäureadenin dinucleotidphosphat („NAADP“) oder Sphingosin-1-phosphat (SP-1) münden. Dabei verzweigen sich die Signalwege in der Zelle nicht nur divergent bzw. konvergent, sondern sie sind auch „downstream“ untereinander verknüpft.

Einige der Signalwege werden durch die Bindung des Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor oder an einen Tyrosinkinase-Rezeptor (RTK) initiiert. In der Folge wird eine Isoform der Phospholipase C (PLC β oder PLC γ) aktiviert, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol (PIP_2) in InsP_3 und Diacylglycerin (DAG) katalysiert. Die Aktivierung von anderen Plasmamembranrezeptoren aktiviert wiederum die ADP-Ribosylzyklase, welche aus Nicotinamidadenin dinucleotid (NAD) und Nicotinamidadenin dinucleotidphosphat (NADP) cADPR bzw. NAADP zu synthetisieren vermag. Auf gleiche Weise kann die Sphingosinkinase Sphingosin zu SP-1 phosphorylieren. Diese intrazellulären Botenstoffe diffundieren zu ihren Rezeptoren am ER (InsP_3R , NAADPR, RYR bzw. SCA MPER). Nach Bindung entlässt das ER große Mengen an Ca^{2+} in das Zytosol, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöht sich dabei auf das 10-fache des basalen Wertes (auf etwa $1\mu\text{M}$; Übersicht bei Berridge *et al.* 1999).

Auch wenn Mitochondrien, zytoplasmatische Puffer und möglicherweise noch weitere Organellen an der Regulation der Calciumkonzentration beteiligt sind, ist das zentrale Element bei der Generierung von Calcium-Signalen in einer Vielzahl von Zelltypen das Endoplasmatische Retikulum. Dabei erfolgt die Freisetzung des Ca^{2+} durch Kanäle, von denen der Inositol-3-Phosphat-Rezeptor (InsP_3 -Rezeptor) und der Ryanodin-Rezeptor (RyR) am besten bekannt sind.

Hauptaktivator des InsP_3 -Rezeptors ist dabei das Ca^{2+} selbst: Bei Bindung von Ca^{2+} an den InsP_3R werden große Mengen an Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol freigesetzt. Dies erfolgt jedoch nur in Anwesenheit von InsP_3 . Es

wird angenommen, dass die Sensitivität des Rezeptors mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentration zunächst zunimmt; in hohen Konzentrationen wirkt Ca^{2+} jedoch eher hemmend auf die weitere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. So resultiert für den InsP_3R ein glockenförmiger Verlauf der Ca^{2+} -Sensitivität (Bootman und Berridge 1995).

Für die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER durch den Ryanodin-Rezeptor ist die Anwesenheit von zyklischer Adenosindiphosphat-Ribose (englisch cADPR) notwendig. Daneben gibt es Befunde, nach denen die enge Nachbarschaft von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VOCs) zum RYR über eine direkte mechanische Kopplung auch zu einer Aktivierung dieser Kanäle führt (Schmidt und Lang 2007).

Es können mehrere Ca^{2+} -mobilisierende Pathways in einer Zelle nebeneinander vorkommen (Clapham 2007).

1.3.2. ON-Mechanismen zur Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Das Ca^{2+} für die Konzentrationserhöhung erhält die Zelle aus intra- und extrazellulären Kompartimenten. Um Ca^{2+} von extrazellulär zu rekrutieren, finden sich in der Zellmembran eine Reihe von Calciumkanälen, welche in der Hauptsache durch ihren Aktivierungsmechanismus unterschieden werden. Dabei kommen meist verschiedene Ca^{2+} -permeable Kanäle in einer Zelle vor.

Die membranständigen Calciumkanäle teilen sich in eine Anzahl von Gruppen auf: es handelt sich um die Voltage-Operated Ca^{2+} channels („VOCs“), die Receptor-Operated channels („ROCs“), Second-Messenger-Operated channels („SMOCs“) und Store-Operated channels („SOCs“).

Die Offenwahrscheinlichkeit der Voltage-Operated Ca^{2+} Channels wird primär durch die Membranspannung reguliert. Anhand ihrer molekularen und pharmakologischen Eigenschaften können L-type ($\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$), P/Q-type ($\text{Ca}_v2.1$), N-type ($\text{Ca}_v2.2$), R-type ($\text{Ca}_v2.3$) und T-type ($\text{Ca}_v3.1$ - $\text{Ca}_v3.3$)-Kanäle unterschieden werden (Übersicht bei Berridge *et al.* 2000).

VOCs sind jene Elemente des Calcium-Signaling-Toolkits, welche die schnellsten Änderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration vermitteln. Die synchrone Aktivierung einer größeren Anzahl (einige Tausend / Zelle) dieser Kanäle lässt innerhalb von Millisekunden die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle auf das zehnfache ansteigen (Clapham 2007).

Die rezeptorgesteuerten Kanäle gliedern sich nach ihren namensgebenden Liganden in NMDA-Rezeptoren (NR1, NR2A - NR2D), ATP-Rezeptoren (P2X7) und den nicotinergen Acetylcholin-Rezeptor.

Zu den SMOCs werden die Cyclic nucleotide gated channels (CNGA 1-4, CNGB 1, CNGB3) sowie ein arachidonate-regulated channel (I_{ARC}) gezählt.

1.3. Calcium-Signaling-Toolkit

Eine weitere Gruppe bilden Store-Operated Ca^{2+} Channels (SOC), bei welchen der Strom durch den Füllungszustand des Endoplasmatischen Retikulums reguliert wird.

Die genaue Funktionsweise der Store-Operated Ca^{2+} Channels war bis zuletzt unklar und Gegenstand aufwändiger Forschung. SOCs leiten den I_{CRAC} , einen Ca^{2+} -Strom von extrazellulär. Namensgebend für diesen Strom ist die Art der Steuerung: die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt zur Aktivierung des I_{CRAC} („Calcium Release-Activated Ca^{2+} -Current“). Bereits vor vielen Jahren wurde bekannt, dass der Füllungszustand des ER Einfluss auf den kapazitiven Calciumeinstrom nimmt (Hoth und Penner 1992). In weiteren Arbeiten wurden unterschiedliche Mechanismen publiziert, welche den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom inhibieren können. Als mögliche Blocker für den I_{CRAC} wurden Ni^{2+} (Skryma *et al.* 2000), 2-ABP (Peppiatt *et al.* 2003), SKF 96365 (Magnier-Gaubil *et al.* 1996; Merritt *et al.* 1990), YM-58483 (Ishikawa *et al.* 2003), B-TP2 (Zitt *et al.* 2004) und andere präsentiert. Bis zuletzt blieb unklar, welches Molekül das physische Korrelat zum I_{CRAC} darstellt. Zudem blieb bis vor kurzer Zeit unbekannt, ob es sich eher um eine mechanische Koppelung von ER und Ca^{2+} -Kanal handelt oder ob es ein löslicher Faktor ist, welcher den Füllungszustand des ER mit dem Kanal funktionell koppelt. Dass der I_{CRAC} auch bei Keratinozyten eine Rolle spielt, ist ebenfalls in verschiedenen Arbeiten postuliert worden (Csernoch *et al.* 2000).

Mittlerweile ist der Zusammenhang zwischen dem Füllungszustand des ER und dem davon abhängigen kapazitiven Calciumeinstrom weitgehend aufgeklärt. Wesentliche Komponenten dieses Prozesses sind die Faktoren STIM1 als Calciumsensor im Endoplasmatischen Retikulum (Roos *et al.* 2005), Orai (synonym CRACM) als Kanal in der Plasmamembran und iPLA2 β . Das letztgenannte Molekül ist Bestandteil der Signaltransduktion vom Calciumspeicher zur Plasmamembran (Übersicht bei Bolotina 2008). Bei dem Glykoprotein STIM1, welches in der Membran des ER sitzt und mit einer Ca^{2+} -bindenden Einheit (EF-Hand) in das Lumen des ER hineinragt (Csutora *et al.* 2008; Csutora *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2005), handelt es sich nach derzeitiger Lesart der experimentellen Befunde um einen Sensor, der bei Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ seine Konfiguration ändert und so wiederum die Generierung von Ca^{2+} Influx Factor (CIF) induziert. CIF seinerseits aktiviert iPLA2 β , eine Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase A2 β , welche ihrerseits am Ende den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom aktiviert (Zhang *et al.* 2005).

Möglicherweise handelt es sich bei dem Kanal, welcher den „Store-Operated-Calcium-Entry“ leitet, sogar um mehr als eine Entität: Der von Orai1 kodierte Kanal ist in seiner Leitfähigkeit unabhängig von InsP_3 und dessen Rezeptor. Jedoch wird er aktiviert durch die Depletion des ER und ist angewiesen auf die Anwesenheit von iPLA2 β . Dagegen verhält es sich für den von TRPC1 kodierten Kanal umgekehrt: seine Leitfähigkeit ist verknüpft mit der Aktivierung des InsP_3R , sie ist jedoch unabhängig vom Füllungszustand des ER und der Anwesenheit von iPLA2 β (Bolotina 2008).

Trotzdem reagieren beide Kanäle auf 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat („2-APB“), einen InsP_3 -Antagonisten. InsP_3ROC reagiert direkt, ICRCAC über einen längeren Signalweg auf die Generierung von InsP_3 . Indirekt könnte die Depletion des ER über die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipase C („PLC“) die Bildung von InsP_3 induzieren, welche ihrerseits den InsP_3ROC aktiviert. Bestätigt sich in weiteren Experimenten dieses Modell, dann werden auch die Befunde bestätigt, welche eine direkte Koppelung zwischen InsP_3R und dem SOC-vermittelnden Kanal vorhersagten (Petersen und Berridge 1996; Rosado und Sage 2001; Übersicht bei Bolotina 2008).

Als intrazelluläre Speicher von Ca^{2+} gibt es zum einen das Endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien, zum anderen wird Ca^{2+} auch im Zytosol selber gespeichert. Hier ist es jedoch an Puffersubstanzen wie Calbindin D-28, Calretinin oder Parvalbumin gebunden, so dass es nicht als Ligand oder elektrophysiologisch wirksam werden kann (Berridge *et al.* 2003).

1.3.3. Ca^{2+} -abhängige Prozesse in der Zelle

Die auf die beschriebene Weise generierten Calciumsignale richten sich an unterschiedliche Effektoren, welche zusammen in einer Zelle vorkommen können. Ein klassischer Ca^{2+} -abhängiger Prozess ist die Kontraktion einer Muskelfaser. Im Myozyten findet sich angelagert an Aktinpolymere das Troponin C, welches sich mit der Bindung von Ca^{2+} in seiner Konformation ändert und nun das Tropomyosin aus seiner Lage an der Aktinhelix heben kann (Übersicht bei Schmidt und Lang 2007). Dieser Vorgang ist Voraussetzung für das Anlegen des Myosinköpfchens an das Aktinpolymer und das Aneinander-Gleiten der beiden großen Moleküle.

Die Aktivität einer großen Anzahl an Enzymen ist calciumabhängig. Die Prozesse, welche sie steuern, stehen somit auch unter der Kontrolle von Calciumsignalen. Zu diesen Enzymen gehören unter anderem die Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMKI-IV, die Myosin-Leichtketten-Kinase MLCK, die Proteinkinase C und ihre Isoformen, die Adenylylcyclase und ihre Unterformen, die NO-Synthase und einige weitere (Zusammenstellung bei Berridge *et al.* 2003).

1.3.4. OFF-Mechanismen

Entscheidend für ein präzises Ca^{2+} -Signal ist die rasche Clearance des Ca^{2+} aus dem Zytosol. Hierfür steht der Zelle ein Sortiment an Pumpen und Austauschern zur Verfügung. Um eine niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration aufrecht zu erhalten, besitzt die Zelle eine plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPase (PMCA), einen $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX oder synonym SLC8A1-3) und einen $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ -Austauscher (NCKX oder synonym SLC24A1-5). NCX tauscht ein Calciumion gegen drei Na^+ -Ionen, NCKX pumpt - ebenfalls elektrogen - ein Ca^{2+} - und ein K^+ -Ion im Austausch gegen 4 Na^+ -Ionen nach extrazellulär (Clapham 2007).

PMCA und NCX ergänzen sich in ihrer Funktion: während PMCA bei einer hohen Affinität lediglich eine geringe Kapazität besitzt, ist es bei NCX umgekehrt: zwar hat er nur eine geringe Affinität zum Substrat, doch durch eine hohe Kapazität ist er in der Lage, in hoher Geschwindigkeit große Mengen an Ca^{2+} aus der Zelle zu schaffen. Dagegen ist die PMCA eher geeignet, in der ruhenden Zelle die Calciumkonzentration niedrig zu halten.

Das ER verliert konstitutiv Ca^{2+} in das Zytosol, für den Transport des Ca^{2+} zurück in das ER besitzt die Zelle verschiedene Isoformen der Smooth Endoplasmatic Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA). Der Umsatz über die Membran des ER ist hoch, die SERCA besitzt eine große Kapazität (Lytton *et al.* 1991).

1.4. Ca^{2+} als Second Messenger in Keratinozyten

Für die Regulierung von Differenzierung und Zellteilung, aber auch zu anderen Zwecken besitzen Keratinozyten die Fähigkeit, Calcium-Signale zu generieren und darauf zu reagieren.

Es wird vermutet, dass anhaltende Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eher mit einer Differenzierung der Zelle verknüpft sind, während wiederholte transiente Ca^{2+} -Konzentrationserhöhungen eher mit proliferativen Prozessen assoziiert werden können (Sharpe *et al.* 1993).

1.4.1. Der Effekt von ATP auf die Keratinozytendifferenzierung und -proliferation

Nach einer Hautverletzung kommt es durch die Freisetzung aus Thrombozyten zu erhöhten Konzentrationen von ATP im Bereich der Epidermis (Pillai und Bikle 1992). In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ATP zu einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt, welche durch erhöhte InsP_3 -Spiegel begleitet wird (Bíró *et al.* 1998; Csernoch *et al.* 2000; Pillai und Bikle 1992). Diese transienten Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermag nach Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Pillai die Reepithelisierung zu stimulieren, am ehesten durch eine Hemmung der Zelldifferenzierung. Die Hinzugabe von ATP (100 μM) hatte eine reduzierte Kornifizierung und eine erhöhte DNA-Syntheserate im Sinne einer stärkeren Proliferation zur Folge. Verschiedene Autoren postulieren, dass eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – wie in anderen Zelltypen auch – eine Veränderung der Expressionsmuster, z.B. von Differenzierungsmarkern, bewirken kann (Pillai und Bikle 1992; Sharpe *et al.* 1993).

Literaturbefunde (Koegel *et al.* 2003) legen nahe, dass der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch die Bindung von ATP an P2Y2-Rezeptoren und die nachfolgende Generierung von InsP_3 vermittelt wird. P2Y2 Rezeptoren sind G-Proteingekoppelt und aktivieren über dieses die Phospholipase C, welche ihrerseits die Spaltung von Phosphatidylinositol in InsP_3 und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Clapham 2007, Greig *et al.* 2003). In der weiteren Folge aktiviert DAG die Proteinkinase C und InsP_3 setzt Ca^{2+} aus InsP_3 -sensitiven Speichern in das Zytosol frei.

An HaCaT-Keratinozyten war nachzuweisen, dass diese Signalkaskade auch in Hautzellen zu finden ist (Csernoch *et al.* 2000): Abhängig von [Ca²⁺]_o gelang es durch die Applikation von ATP, einen Calciumtransienten in HaCaT-Zellen zu induzieren, welcher in Anwesenheit von Econazole, einem Blocker des I_{CRAC}, signifikant schwächer ausfiel. Für die zweite Phase des Ca²⁺-Transienten war die weitere Anwesenheit von ATP nicht notwendig.

ATP führt in HaCaT-Keratinozyten nicht nur zu einem Ca²⁺-Transienten, sondern induziert auch eine Hyperpolarisation, welche durch die Aktivierung von K⁺-Kanälen erzeugt wird (Burgstahler *et al.* 2003; Koegel und Alzheimer 2001; Koegel *et al.* 2003). Das Ausmaß dieser Reaktion war abhängig vom Grad der Differenzierung. In suprabasal gelegenen, K10-positiven Zellen, war die Hyperpolarisation geringer als in den proliferierenden Zellen der basalen Schicht, welche noch kein K10 exprimierten.

1.4.2. Ca²⁺-vermittelte Differenzierung in Keratinozyten

Keratinozyten reagieren bemerkenswert empfindlich auf Veränderungen der [Ca²⁺]_o (Breitkreutz *et al.* 1993). So führt in Keratinozyten – anders als in Fibroblasten – bereits die Erhöhung der [Ca²⁺]_o von 0.10 mM auf 0.12 mM zu einer Erhöhung auch der [Ca²⁺]_i (Lee *et al.* 1992; Pillai und Bikle 1992).

Wird die Calciumkonzentration der Badlösung von 0,07 mM auf 1 mM angehoben, hat dies deutliche Auswirkungen auf die Zellbiologie der kultivierten Hautzellen.

Bereits Minuten nach der Erhöhung verteilt sich das im Zytosol gelöste Desmoplakin so um, dass es für die Bildung von neuen Desmosomen an der Zellmembran verwendet werden kann (Sharpe *et al.* 1989).

Innerhalb der ersten Stunden steigt die Expressionsrate von Involucrin, Loricrin, K1 (Yuspa *et al.* 1989) sowie die Aktivität der Keratinozyten-spezifischen Transglutaminase. Ein bis zwei Tage nach den ersten Differenzierungsvorgängen beginnt sich eine kornifizierende Hülle auszubilden.

Nach den ersten 12-24h folgt eine Abflachung der Zellen, eine Zunahme der Zell-Zell-Kontakte sowie eine vermehrte Granulierung im Zytosol. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer vermehrten Schichtenbildung der kultivierten Keratinozyten. Zellen in suprabasalen Schichten exprimieren Differenzierungsmarker, z.B. Involucrin oder Keratin 10 (Yuspa *et al.* 1989). Die beobachteten Entwicklungen sind bekannte Merkmale einer Differenzierung von kultivierten Keratinozyten (vergl. Tabelle 1; Lee *et al.* 1992). Diese Differenzierung ist zunächst reversibel, wenn die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in den nächsten 24h auf den Ursprungswert gesenkt wird; bei anhaltend hohen Ca²⁺-Werten differenzieren sich die Keratinozyten aus und verlieren ihre Kompetenz zur Proliferation (Sharpe *et al.* 1989). Im Anschluss an die ersten 24 Stunden werden späte Differenzierungsmarker wie Filagrin oder CE exprimiert (Yuspa *et al.* 1989).

1.4. Ca²⁺ als Second Messenger in Keratinozyten

In Versuchen von Sharpe et al. (1989) sank die Proliferationsrate innerhalb von vier Tagen auf 7%, nachdem [Ca²⁺]_o von 70 µM auf 1,0 mM angehoben wurde.

Für Prozesse wie Proliferation und Differenzierung ist bekannt, dass eine Reihe an Enzymen darin involviert sind, deren Aktivität abhängig von der Calciumkonzentration ist: Proteinkinasen, Phospholipasen, Phosphodiesterasen und Adenylatcyclasen (Berridge *et al.* 2003; Hennings *et al.* 1980).

Ca²⁺-induzierte Differenzierung ist zudem möglicherweise Folge der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), NFκB oder des guanine nucleotide binding protein ras. Allerdings ist auch bekannt, dass die vermehrte Expression von c-fos und c-jun einerseits Folge einer anhaltenden Erhöhung der [Ca²⁺]_i sein kann, andererseits aber auch zur Zelldifferenzierung beitragen kann (Nguyen und Markwardt 2002; Pillai und Bikle 1992).

Dieselben Autoren haben gezeigt, dass ein Anstieg von [Ca²⁺]_o auch einen Anstieg von intrazellulärem [Ca²⁺]_i zur Folge hat. Zudem ließ sich in Zellen, die morphologische Kriterien der Differenzierung aufwiesen, ebenfalls eine erhöhte [Ca²⁺]_i messen.

Zu der Tatsache, dass eine erhöhte [Ca²⁺]_o die Balance eher in Richtung der Differenzierung verschiebt, passen die Befunde, nach denen [Ca²⁺]_o in der basalen Schicht Epidermis am geringsten ist und seinen maximalen Wert im Stratum granulosum erreicht (Menon *et al.* 1985; Menon *et al.* 1994; Vicanová *et al.* 1998; Yuspa *et al.* 1989).

In Versuchen an Nacktmäusen, bei denen die Barrierefunktion der Haut mit Azeton zerstört wurde, zeigte sich, dass die Reparatur dieser Barriere durch ansteigende [Ca²⁺]_o-Werte empfindlich gestört wurde. Ein Merkmal der Wiederherstellung der Hautbarriere ist die Synthese von epidermalen Lipiden (Lee *et al.* 1992) sowie die Sekretion von Lamellenkörperchen (Denda *et al.* 2007). Der halbmaximale Effekt lag bei einer [Ca²⁺]_o von 0,01 mM, bei 0,1 mM war die Reparatur maximal gehemmt. Die Beigabe von typischen Ca²⁺-Kanal-Blockern wie Nifedipin oder Verapamil hob die Störung der Barriere-reparatur dagegen auf. Für die rasche Wiederherstellung der epidermalen Barriere sind also geringe [Ca²⁺]_o günstig. Bemerkenswerterweise hemmte eine Erhöhung von [K⁺]_o auf Werte von bis zu 80 mM die Erholung der Haut in dosisabhängiger Weise (Lee *et al.* 1992).

Tabelle 1: Merkmale proliferierender und ausdifferenzierender Keratinozyten

<i>Merkmale proliferierender Zellen</i>	<i>Merkmale ausdifferenzierender Zellen</i>
<ul style="list-style-type: none">• Hohe Proliferationsrate, Wachstum der Kultur im Monolayer (Hennings <i>et al.</i> 1983b)• wenige Zell-Zell-Kontakte, geringe Zellgröße	<ul style="list-style-type: none">• Expression von Differenzierungsmarkern wie Involucrin, K1, K10, Filagrin, CE (Ryle <i>et al.</i> 1989; Yuspa <i>et al.</i> 1989)

<i>Merkmale proliferierender Zellen</i>	<i>Merkmale ausdifferenzierender Zellen</i>
(Hennings <i>et al.</i> 1983b; Mauro <i>et al.</i> 1990)	• desmosomale Kontakte (Watt und Green 1981)
• spindelförmige Zellform (eigene Beobachtung), Ausbildung von Mikrovilli (Sharpe <i>et al.</i> 1989)	• vermehrte Zell-Zell-Kontakte (Hennings <i>et al.</i> 1983b)
• Expression der Keratine K5 und K14 (Yuspa <i>et al.</i> 1989)	• Schichtenbildung / Stratifizierung (Hennings <i>et al.</i> 1983b)
• hohe Expression von hIK1-mRNA (Koegel und Alzheimer 2001)	• Expression von Transglutaminase und Ausbildung von „cornified sheets“ (Hennings <i>et al.</i> 1983a)
• höhere Expression von P2Y2-mRNA als in differenzierenden Zellen (Dixon <i>et al.</i> 1999; Koegel <i>et al.</i> 2003)	• abnehmende Proliferationsrate (Read und Watt 1988)
	• vermehrte Expression von K ⁺ -Kanälen (Mauro <i>et al.</i> 1997)
	• geringe Expression von hIK1-mRNA (Koegel und Alzheimer 2001)
	• Abflachung der Zellen
	• verstärkte zytoplasmatische Granulierung
	• erhöhte [Ca ²⁺] _i (Sharpe <i>et al.</i> 1993)

Die Literatur postuliert verschiedene Möglichkeiten, wie eine Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu einer Anhebung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. Grundsätzlich rekrutiert sich das Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern sowie über eine Anzahl von Kationenkanälen aus dem Interstitium. Extrazelluläres Ca²⁺ aktiviert die Phospholipase C (PLC), welche ihrerseits die Bildung von InsP₃ aus Phosphatidylinositol katalysiert. Des Weiteren stimuliert eine erhöhte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration den transmembranalen Calciumeinstrom in die Zelle. Dieser Einstrom wird zum einen über spannungsgesteuerte unspezifische Kationenkanäle vermittelt, zum anderen ist es calciumaktivierten K⁺-Kanälen möglich, die Membran zu hyperpolarisieren. Dies wiederum verstärkt die treibende Kraft für den Calciumstrom (Pillai und Bikle 1992).

1.4.3. Der Einfluss von Kalium auf die Differenzierung von Keratinozyten

Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten extrazellulären Calciumkonzentration und fortschreitender Differenzierung ist in verschiedenen Experimenten gezeigt worden (Mauro *et al.* 1997; Sharpe *et al.* 1989). Dabei hat sich anhand einiger experimenteller Befunde gezeigt, dass neben Calciumströmen auch die Expression und die Aktivität von Kaliumkanälen eine erhebliche Bedeutung für die Differenzierung von Keratinozyten haben.

Beispielsweise ist für die Ca²⁺-induzierte Differenzierung eine ausreichend hohe intrazelluläre K⁺-Konzentration notwendig (Hennings *et al.* 1983a). In einer weiteren Arbeit wurde dargelegt, dass die Anwesenheit von Kalium

1.4. Ca²⁺ als Second Messenger in Keratinozyten

erforderlich für die Ausbildung und den Erhalt der epidermalen Permeabilitätsbarriere ist (Lee *et al.* 1994). Diese Permeabilitätsbarriere ist das Ergebnis eines regelrecht durchlaufenden Differenzierungsprozesses.

Die Befunde aus der Literatur deuten demnach darauf hin, dass neben einer hinreichenden Menge an Ca²⁺ auch die Anwesenheit von Kaliumkanälen zumindest eine Bedingung ist für die Differenzierung von Keratinozyten (Mauro *et al.* 1997).

Dabei wurde deutlich, dass die Regulation von Kalium- und Calciumkonzentrationen in Keratinozyten eng miteinander verknüpft sind. Bei Zellen, welche bei [Ca²⁺]_o = 1mM kultiviert wurden, veränderte sich [Ca²⁺]_i abhängig von der extrazellulären Kalium-Konzentration. In epidermalen Zellen der Kaninchen-Kornea sank die intrazelluläre Calciumkonzentration bei Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration.

Im gleichen Sinne sank die Calciumkonzentration in Keratinozyten bei einer pharmakologischen Blockade von Kaliumkanälen mit Verapamil oder Charybdotoxin (Mauro *et al.* 1997). Diese beiden Blocker, nicht aber Apamin, waren zudem in der Lage, die Ca²⁺-induzierte Differenzierung der Hautzellen zu unterbinden (Mauro *et al.* 1997). Obwohl der pharmakologische Block der Kaliumkanäle die Ca²⁺-induzierte Differenzierung verhindern kann, werden bestimmte Kaliumkanäle (vergl. Tabelle 2) vorrangig in Involucrin-positiven Zellen, also in ausdifferenzierten Keratinozyten, nachgewiesen. Dies lässt sich möglicherweise als Hinweis darauf verstehen, dass zumindest bestimmte Kaliumströme erst mit der Differenzierung in physiologisch relevantem Ausmaß nachzuweisen sind. Dass eine ausreichend hohe intrazelluläre K⁺-Konzentration für den Differenzierungsprozess erforderlich ist, wird unterstützt durch den Befund, dass Ouabain, ein Blocker der Na⁺ / K⁺-ATPase, entscheidende Schritte des Differenzierungsprozess unterbinden vermag (Hennings *et al.* 1983b). Immerhin ist der ATP-abhängige Na⁺ / K⁺-Antiporter für Kalium ein wichtiger Weg in die Zelle.

Es handelt sich durchaus um physiologisch relevante Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration, die durch Veränderungen des Kaliumgradienten verursacht werden. Eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration resultiert nach einem kurzen Peak in einem Plateau mit einer um 30 - 100 nM erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration. Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration können Veränderungen von [Ca²⁺]_i um immerhin 90 nM zur Folge haben (Mauro *et al.* 1997).

Die Literatur bietet verschiedene Erklärungen an, über welche Wege Kaliumkanäle die Zelldifferenzierung beeinflussen können.

- Kaliumkanäle haben Einfluss auf das Zellvolumen, welches wiederum das Differenzierungsvermögen beeinflusst. Das Zellvolumen hat zudem Einfluss auf den Zellzyklus und auf die intrazelluläre Natrium-Konzentration (Watt und Green 1981).

- Kaliumkanäle wirken auf das Membranpotential. Dieses hat wiederum Einfluss auf Integrin-vermittelte Zellkontakte und die darauf folgende Differenzierung (Arcangeli *et al.* 1993)
- Die Aktivität von Kaliumkanälen kann die Differenzierung von Lymphozyten beeinflussen, indem sie Einfluss auf die Proteinbiosynthese oder die Produktion von Wachstumsfaktor wie Interleukin-2 nehmen (Price *et al.* 1989).
- K⁺-Ströme haben Einfluss auf das Zellmembranpotential. Dies kann die treibende Kraft für den Ca²⁺-Influx verändern (Fanger *et al.* 2001; Mauro *et al.* 1997).

Während in den Versuchen von Mauro *et al.* (1995) die Expression eines 70 pS-K⁺-Kanals in Hautzellen mit dem Grad der Differenzierung zunahm, ließ sich für HaCaT-Keratinozyten nachweisen, dass die Expression eines anderen Typs von K⁺-Kanälen, nämlich des calciumaktivierten intermediär leitenden Kaliumkanals hK1 in Zellen mit partieller Differenzierung deutlich reduziert ist (Koegel *et al.* 2003).

Nach wie vor ist es Gegenstand von Untersuchungen, wie [K⁺]_o auf die Funktion von Keratinozyten Einfluss nimmt. Ein Merkmal regenerierender Haut nach Zerstörung der Hautbarriere ist die vermehrte Exozytose von Lamellenkörperchen sowie die Synthese von epidermalen Lipiden (Denda *et al.* 2007; Lee *et al.* 1992). Eine Verringerung der intrazellulären Kaliumkonzentration scheint günstig für die Wiederherstellung der epidermalen Barrierefunktion zu sein, während eine hohe [K⁺]_i diesen Prozess hemmt (Denda *et al.* 2007). Denda *et al.* beobachteten in ihren Experimenten, dass die Hinzugabe von K⁺-Kanal-Öffnern wie 1-EBIO den Regenerationsprozess der Haut unterstützten. K⁺-Blocker wie Glibenclamid hemmten hingegen die Regeneration. Den Grund für diesen Befund sah die Arbeitsgruppe um Denda in der geringeren intrazellulären Kaliumkonzentration bei der Hinzugabe von K⁺-Kanal-Öffnern.

1.4.4. Membranpotential und Calciumkonzentration

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na]_o + P_K[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$$

Gleichung 1: Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit des Membranpotentials von den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen, den relativen Permeabilitäten sowie der Temperatur. T: Temperatur in Kelvin, R: allgemeine Gaskonstante, F: Faradaysche Konstante, P: Permeabilität.

Auch nichterregbare Zellen, zu denen Keratinozyten zählen, weisen ein nach innen negatives Membranpotential auf. Das Ruhemembranpotential entsteht durch ionale Konzentrationsgradienten über eine Zellmembran,

die für die verschiedenen Ionen unterschiedlich permeabel ist. Es lässt sich durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für das Membranpotential beschreiben (Gleichung 1).

In Ruhe wird die Membranspannung in den meisten Zellen zum größten Teil durch die hohe Leitfähigkeit für Kalium bestimmt, jedoch hängt sie von dem Vorkommen und der Anzahl weiterer Kanäle ab. Die Forschung an

1.4. Ca²⁺ als Second Messenger in Keratinozyten

Ionenkanälen wurde durch die Entwicklung der Patch-Clamp-Technologie erheblich vorangebracht, ihre Etablierung hat eine Vielzahl dieser Proteine bekannt gemacht, welche eine Leitfähigkeit für Ionen aufweisen.

Tabelle 2: Synopsis der bislang an Keratinozyten beschriebenen Ionenkanäle

<i>Kanal</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Differenzierungsgrad</i>	
hIK1 (Gardos Channel, hSK4, IK _{Ca} , K _{ca} 3.1)	HaCaT	proliferierend, Downregulation bei Differenzierung	(Koegel und Alzheimer 2001; Koegel <i>et al.</i> 2003)
Ca ²⁺ -unabhängiger K ⁺ -Kanal mit einer Leitfähigkeit von 170 pS	HaCaT	differenzierend	(Nguyen und Markwardt 2002)
Two types of large-conductance K ⁺ channels (about 250 pS)	HaCaT		(Ivanchenko und Markwardt 2005)
70-pS K ⁺ -Kanal	primäre Keratinozyten	differenziert	(Mauro <i>et al.</i> 1997)
CaCC2	HaCaT	proliferierend	(Koegel und Alzheimer 2001)
CaCC3	HaCaT	proliferierend	(Koegel und Alzheimer 2001)
Voltage-gated Ca ²⁺ -sensitive Cl ⁻ - channels	primäre Keratinozyten	proliferierend	(Mauro <i>et al.</i> 1990)
DIDS-sensitiver 200 pS Cl ⁻ - Kanal	HaCaT	proliferierend	(Wohlrab <i>et al.</i> 2000)
spannungsunabhängiger nicht- selektiver Kationenkanal	primäre Keratinozyten	proliferierend	(Mauro <i>et al.</i> 1995)

<i>Kanal</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Differenzierungsgrad</i>	
spannungsunabhängiger Ca ²⁺ -sensitiver Kanal für verschiedene Kationen mit einer Leitfähigkeit von 18 pS	primäre Keratinozyten	proliferierend	(Galiotta <i>et al.</i> 1991)
rektifizierender Kationenkanal mit großer Leitfähigkeit	primäre Keratinozyten		(Galiotta <i>et al.</i> 1991)
TRPV3	primäre Keratinozyten	proliferierend	(Peier <i>et al.</i> 2002)
TRPV6	primäre Keratinozyten	differenzierend	(Lehen'kyi <i>et al.</i> 2007)
TRPC1, TRPC5, TRPC6, TRPC7	primäre gingivale Keratinozyten	differenzierend	(Cai <i>et al.</i> 2005; Cai <i>et al.</i> 2006)
ENac	primäre Keratinozyten	differenzierend	(Brouard <i>et al.</i> 1999; Mauro <i>et al.</i> 1995)

In Patch-Clamp-Experimenten von Koegel *et al.* lag das Ruhemembranpotential von HaCaT-Keratinozyten bei -42 mV (Koegel und Alzheimer 2001). In Versuchen von Mauro *et al.* wurde für primäre humane Keratinozyten zuvor ein geringeres Membranpotential von durchschnittlich -24 mV gemessen (Mauro *et al.* 1990).

1.4.5. Der Effekt von ATP auf das Membranpotential von proliferierenden Keratinozyten

Die Bindung von ATP hat neben dem Calciumtransienten eine charakteristische Änderung der Membranspannung zur Folge: nach Hinzugabe von ATP zur Badlösung kommt es initial zu einer kurz andauernden Depolarisation, gefolgt von einer starken und lang anhaltenden Hyperpolarisation (Koegel und Alzheimer 2001). Diese Hyperpolarisation ist dosisabhängig: Bei einer ATP-Konzentration von 1 µM kehrte das Membranpotential nach dem Auswaschen rasch zurück auf den Ausgangswert. Bei höheren Konzentrationen (10-30 µM) überdauerte die Hyperpolarisation das Auswaschen des ATP um wenigstens fünf Minuten, in einigen Zellen dauerte die Hyperpolarisation länger als 20 min (vergl. Abbildung 3). Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch bei Versuchen mit der Applikation von Bradykinin oder Histamin (Koegel *et al.* 2003).

1.4. Ca²⁺ als Second Messenger in Keratinozyten

Durch Photolyse intrazellulär aus Caged-IP₃ freigesetztes InsP₃ führte in den Versuchen von Koegel et al. ebenfalls zu der typischen Hyperpolarisation, wie sie nach Applikation von ATP 1 µM zu sehen ist (Koegel und Alzheimer 2001). Diesen Befund deuten die Autoren dahingehend, dass die Hyperpolarisation Folge der Freisetzung von Ca²⁺ aus den InsP₃-sensitiven Speichern ist. Um mögliche InsP₃-unabhängige Signalwege auszuschließen, wurde der Versuch in Anwesenheit von Forskolin wiederholt. Jedoch hatte die Aktivierung der Adenylyl Cyclase durch Forskolin weder Einfluss auf das Ruhemembranpotential noch auf die Hyperpolarisation nach ATP-Gabe. Auch die Stimulation der Proteinkinase C (PKC) durch Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) hatte hinsichtlich der Membranspannung keinen Effekt. In den Versuchen von Koegel *et al.* (2003) hatte allein die Aktivierung der PKC durch Calphostin C einen hyperpolarisierenden Effekt auf die Zellmembran, es hatte jedoch auch keinen Einfluss auf den Spannungsverlauf nach der ATP-Applikation.

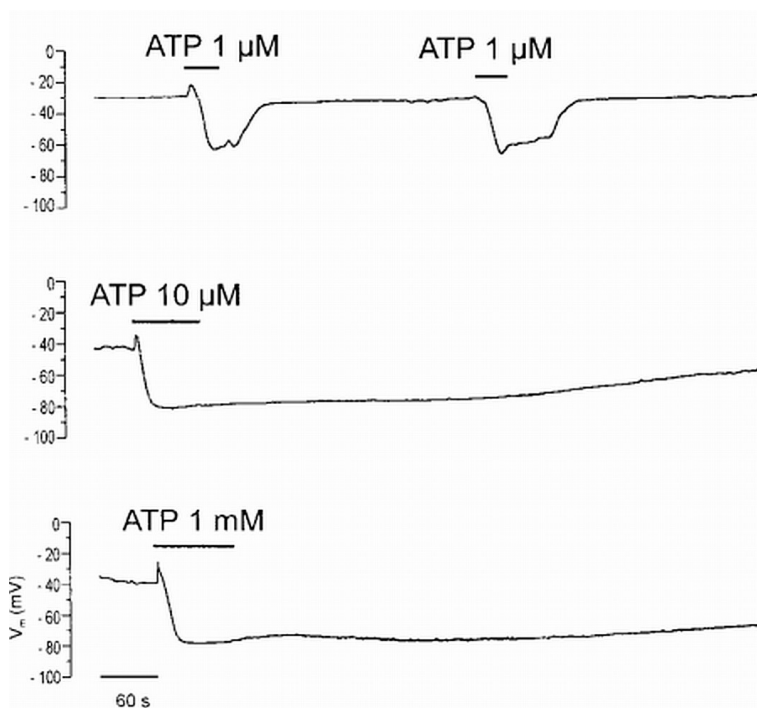


Abbildung 3: **Applikation von ATP und die resultierende Hyperpolarisation.** In Registrierungen in Whole-Cell-Konfiguration wurden von Koegel et al. aufsteigende Konzentrationen von ATP auf kultivierte HaCaT-Keratinozyten appliziert. Konzentrationen von > 10 µM ließen einer kurzen Depolarisation eine lang anhaltende Hyperpolarisation folgen (Messung und Grafik aus Koegel und Alzheimer 2001).

Anwesenheit von Nifluminsäure oder Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS), beides Blocker von Cl⁻-Kanälen, war die typische initiale Depolarisation nach ATP deutlich reduziert. Vice versa fiel die initiale Depolarisation in einer Perfusionslösung mit niedriger [Cl⁻] signifikant stärker aus als unter Kontrollbedingungen.

Anhand des pharmakologischen Profils wurde von denselben Autoren der P2Y₂-Rezeptor als initialer Bestandteil der Signalkette identifiziert, welche zu der Hyperpolarisation führt. In einem RNase protection assay konnte von Koegel et al. die Expression der P2Y₂-mRNA nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist auch hier, dass in proliferierenden Zellen die Expression stärker war als in Kulturen aus konfluent wachsenden Zellen, in denen bereits Differenzierungsmarker exprimiert werden.

In derselben Arbeit wurde untersucht, welche Ionenkanäle an dem charakteristischen Verlauf der Membranspannung nach ATP-Applikation beteiligt sind (Koegel und Alzheimer 2001). In

Werden sie allein appliziert, hyperpolarisieren Nifluminsäure und DIDS die Membran der HaCaT-Zellen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass das relativ hohe Ruhemembranpotential durch konstitutiv offene Cl⁻-Kanäle erzeugt wird. Kationen-Kanäle sind dagegen an der ATP-induzierten Depolarisation kaum beteiligt, zumal die Spannungsantwort auf ATP in Anwesenheit von Ni²⁺ oder nach Austausch des Na⁺ gegen NMDG nicht signifikant verändert war. Trotzdem verschob die Kationenkanalblockade das Ruhemembranpotential in Richtung negativerer Werte. Die Existenz von Cl⁻-Kanälen wurde bereits früher für primäre Keratinozyten beschrieben (Mauro *et al.* 1990).

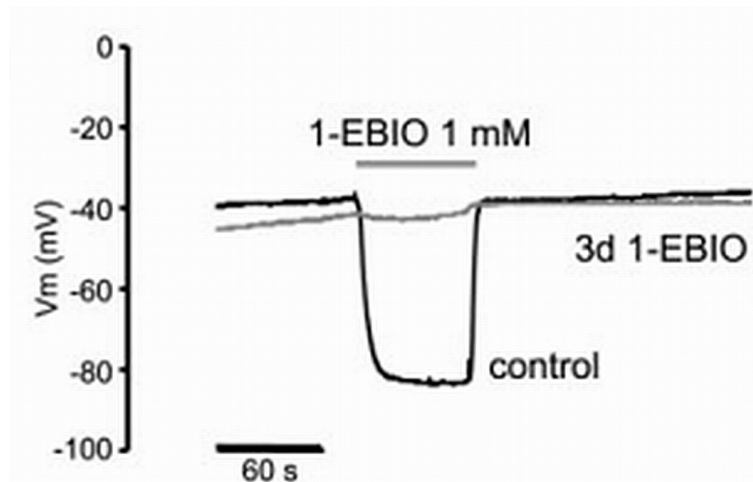


Abbildung 4: **Effekt einer akuten Applikation von 1-EBIO nach Herunterregulation des hIK1.** 1-EBIO führt – akut appliziert – an HaCaT-Zellen zu einer starken Hyperpolarisation. Der Effekt bleibt aus, wenn zuvor durch eine dreitägige Inkubation in der Substanz der hIK1-Kanal herunter reguliert wurde (Messung und Grafik aus Koegel *et al.* 2003).

dieser Kanäle, ein der ATP-Antwort ähnlicher Spannungsverlauf erzeugen (vergl. Abbildung 4 „control“). Zugleich zeigten Versuche von Koegel *et al.*, dass auch die Depolarisation nach ATP durch die Anwesenheit von 1-EBIO erheblich verstärkt war. Das passt zu dem Umstand, dass 1-EBIO auch als Aktivator von Cl⁻-Strömen gilt.

In RT-PCR Experimenten konnte in den HaCaT-Zellen die Expression von zwei Cl⁻-Kanälen und dem hIK1-Kanal nachgewiesen werden. An Cl⁻-Kanälen exprimieren die Keratinozyten demnach den CaCC2 und den CaCC3. Der CLCA1-Kanal war nicht nachweisbar. Die Expression des hIK1-Kanals war in den Experimenten von Koegel *et al.* abhängig vom Differenzierungsgrad. In Kulturen, in denen die Zellen exponentiell wuchsen, war die Expressionsrate erheblich höher als in Zellen konfluenter Kulturen, welche zugleich Zeichen von Differenzierung trugen.

Die lang anhaltende Hyperpolarisation nach ATP-Gabe konnte von Koegel *et al.* dosisabhängig mit Charybdotoxin unterbunden werden (Koegel *et al.* 2003). Dabei hatten TEA, Ba²⁺ oder Verapamil nur einen geringen Effekt auf die Hyperpolarisation. Die Sensitivität gegenüber Charybdotoxin und Clotrimazol legt nahe, dass es sich hier um spannungsunabhängige Ca²⁺-aktivierte K⁺-Ströme handelt, welche die Hyperpolarisation erzeugen. Tatsächlich ließ sich durch 1-Ethyl-2-benzimidazolone (1-EBIO), einem Aktivator

1.4.6. Die Eigenschaften von hIK1

Auch Keratinozyten verfügen über eine Anzahl von verschiedenen Ionenkanälen. Patch-Clamp Experimente und Expressionsstudien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten verschiedene K⁺-, Ca²⁺- und andere Kationenströme (siehe Tabelle 2). Wie viele andere nichterregbare Zellen, exprimieren auch HaCaT-Keratinozyten den humanen intermediate Conductance K⁺-Kanal hIK1. Er ist ein Ca²⁺-aktivierter Kalium-Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit. Jensen et al. fanden in RNA dot blot Analysen, dass der hIK1 in einer Vielzahl an Geweben exprimiert wird. Die stärksten RNA-Signale erhielten sie aus Zellen der Speicheldrüsen, Plazenta sowie aus Zellen der Trachea und im Lungengewebe (Jensen *et al.* 1998). In immunhistochemischen Experimenten wurde der Kanal von Thompson-Vest et al. in fast allen Oberflächenepithelien nachgewiesen. Das N-terminale Ende des hIK1-Proteins wurde in schichtenbildenden Epithelien wie der Haut, der Kornea, den Schleimhäuten in Mund, Ösophagus und Vagina nachgewiesen, genauso wie im Urothel der Blase. Des weiteren wurde er in Zellen von exokrinen Drüsen gefunden, z.B. in den Gängen der Speichel- und Tränendrüsen sowie im exokrinen Teil des Pankreas und Zellen der Atemwege. In geringerem Ausmaß konnte der hIK1 in anderen Geweben nachgewiesen werden, welche ebenfalls an Flüssigkeitstransporten beteiligt sind: in Zellen des Plexus choroideus und des Ependyms, in den Zellen von Pleura und Peritoneum, sowie im Gewebe der Gallengänge und des Dünndarms (Thompson-Vest *et al.* 2006).

Es ist bekannt, dass er an so unterschiedlichen Funktionen wie Ionentransport und der Regulation des Zellvolumens, aber auch an Zellmigration und Zellproliferation beteiligt ist. Grissmer et al. wiesen auf die herausragende Bedeutung der hIK1 im Rahmen der T-Zellaktivierung hin (1993). Nach Aktivierung eines T-Lymphozyten führe das Öffnen des hIK1 zur Membranhyperpolarisation und zum verstärkten Einstrom von Calcium. In der Folge stiege die Expression des hIK1 um das 15-20fache an (Ghanshani *et al.* 2000; Grissmer *et al.* 1993). Der hIK1-Kanal lässt sich vor allem durch folgende Merkmale charakterisieren: er ist sehr selektiv für Kalium und er wird durch submillimolare intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert. Patch-Clamp-Experimente in der Whole-Cell-Konfiguration an HEK-293 Zellen zeigten eine Einwärtsgleichrichter-Charakteristik. Als Calcium-Sensor dient ein auf der intrazellulären Seite kovalent gebundenes Calmodulin-Molekül.

Tabelle 3: Übersicht der Eigenschaften calciumaktivierter Kaliumkanäle

<i>SK</i>	<i>IK</i>	<i>BK</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Leitfähigkeit für K⁺ (414 bzw. 18 pS) • Expression in Neuronen des ZNS und peripheren Geweben (Köhler <i>et al.</i> 1996) • halbmaximale Aktivierung bei [Ca²⁺]_i = 300 nM, Leitfähigkeit ist spannungsunabhängig • Unterscheidung der SK-Kanäle in SK1 (Apamin-insensitiv) und SK2 (Apamin-sensitiv); aktivierbar durch 1-EBIO 	<ul style="list-style-type: none"> • Mittlere Leitfähigkeit für K⁺ (20-80 pS) • Expression in nichterregbarem Gewebe, typischerweise in Zellen von Oberflächenepithelien sowie in transportierenden Epithelien. • halbmaximale Aktivierung bei [Ca²⁺]_i = 300 nM • blockierbar durch Charybdotoxin, Clotrimazole (Vergara <i>et al.</i> 1998), TRAM-34 (Wulff <i>et al.</i> 2000), aktivierbar durch 1-EBIO, Chlorzoxazone oder Zoxazolamine. 	<ul style="list-style-type: none"> • Große Leitfähigkeit für K⁺ (~250 pS) • Expression in ZNS-Neuronen und Zellen der glatten Muskulatur • BK-Kanäle bestehen aus α- und β-Untereinheiten (Limón <i>et al.</i> 2005) • halbmaximale Aktivierung bei [Ca²⁺]_i = 30 nM (-40 mV), Aktivierung durch Depolarisation und Anstieg der [Ca²⁺]_i • blockierbar durch Charybdotoxin und Iberotoxin (Galvez <i>et al.</i> 1990)

Anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle in drei Klassen einteilen: spannungsabhängige, gut leitende Kalium-Kanäle (Big Conductance K⁺, BK), spannungsunabhängige, gering leitende Kalium-Kanäle (Small Conductance K⁺, SK) und einwärts gleichrichtende, spannungsunabhängige Kalium-Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (Intermediate Conductance K⁺, IK). Während der BK und der SK auch in erregbaren Zellen exprimiert werden, wird der hIK1 nur in nicht erregbaren Zellen exprimiert. RNA dot blot Experimente ergaben eine starke Expression von hIK1 in Zellen der Speicheldrüse, Plazenta, Trachea und Lunge. In geringerem Ausmaße kann die RNA für hIK1 auch in Zellen der Niere, Brustdrüse, Leber, Thymus und Milz nachgewiesen werden (Jensen *et al.* 1999). Die gleichen Autoren haben das Gen für den hIK1 in der Chromosomenregion 19q13.2-19q13.3 lokalisiert. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigt sich der hIK1 als nicht inaktivierender einwärts gleichrichtender Kanal (3,0 pA bei -100 mV; 1,1 pA bei +100 mV). Biionische Experimente belegen eine relative Selektivität für K⁺-Ionen, es ergibt sich eine Sequenz aus abnehmenden Permeabilitäten für K⁺(1,0) = Rb⁺ > Cs⁺(10,4) >> Na⁺, Li⁺, NMDG⁺.

Für die pharmakologische Beeinflussung des hIK1 stehen sowohl Blocker als auch Aktivatoren zur Verfügung. Clotrimazol blockiert den hIK1 mit einer IC₅₀=153 nM, Charybdotoxin blockiert mit einer IC₅₀=28 nM. Clotrimazol und Charybdotoxin wirken jedoch nicht selektiv auf den hIK1-Kanal. Seit 2001 ist TRAM-34 bekannt.

Ohne signifikante Beeinträchtigung des Cytochrom P450-Systems blockiert TRAM-34 den hIK1-Kanal unabhängig von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit einer IC₅₀=24 nM. Die Affinität zum hIK1 ist 200-1500fach höher als zu verwandten K⁺-Kanälen (Wulff *et al.* 2000). Als Aktivatoren des hIK1 sind 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone, EC₅₀=84 µM), Chlorzoxazon (EC₅₀=98 µM) und Zoxazolamin bekannt (EC₅₀ liegt oberhalb der Löslichkeit von Zoxazolamin).

Die Zusammenschau der Befunde aus der Literatur legt den Schluss nahe, dass es nach der Bindung von ATP oder seinen Analoga zu der PLC-abhängigen Generierung von InsP₃ und DAG kommt. Die anschließende Freisetzung von großen Mengen Ca²⁺ aus den InsP₃-sensitiven Speichern führt zur Öffnung von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen und dem hIK1-Kanal. Aus der Aktivierung dieser Kanäle nach der ATP-Applikation lässt sich der charakteristische Verlauf der Membranspannung erklären (Koegel *et al.* 2003).

1.4.7. Die Effekte einer Downregulation des hIK1 durch Langzeitinkubation mit 1-EBIO

Koegel *et al.* konnten zudem zeigen, dass die Inkubation von HaCaT-Keratinozyten mit dem hIK1-Aktivator 1-EBIO (1 mM) überraschenderweise dazu führt, dass der hIK1 nicht mehr nachweisbar ist. Bereits nach drei Stunden in Anwesenheit von 1-EBIO war die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation abgeschwächt, schon nach sieben Stunden hyperpolarisierte die Membran gar nicht mehr.

In RNase protection assays konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression des hIK1-Transkripts stark herunter reguliert wird. Der verlängerte Kontakt zu 1-EBIO hatte in den Beobachtungen von Koegel *et al.* im wesentlichen folgende Konsequenzen für die Keratinozyten: Die Proliferationsrate sank, zugleich war die Expression von Differenzierungsmarkern reduziert und die Zellgröße nahm zu.

In Zellen, in denen nach Inkubation in 1-EBIO die Expression des hIK1 signifikant reduziert war, war das Membranpotential mit -19 mV deutlich depolarisierter als in den Kontrollzellen (Koegel *et al.* 2003). Möglicherweise ist dies als Hinweis darauf zu verstehen, dass der hIK1 auch zum Ruhemembranpotential beiträgt.

Mit der Applikation von ATP ist in Keratinozyten ein Calciumtransient zu beobachten, welcher durch einen schnellen Anstieg und einem langsamen Abfall von [Ca²⁺]_i gekennzeichnet ist. Nach verlängerter Behandlung mit 1-EBIO ist die Zeitkonstante des [Ca²⁺]_i-Abfalls signifikant kleiner; [Ca²⁺]_i kehrt schneller zum Ausgangswert zurück als in den Kontrollzellen ohne das hIK1-Defizit.

1.5. Ziel dieser Arbeit

Nach bisherigem Kenntnisstand ist die feine Balance zwischen Proliferation und Differenzierung integraler Bestandteil einer intakten Funktion der Haut. Zugleich zeigen die Befunde aus der Literatur, dass die Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere die des hIK1, einen bemerkenswerten Einfluss auf bedeutende Lebensvorgänge wie Transkription, Mitose und Differenzierung nimmt.

Aufbauend auf den oben geschilderten Arbeiten von Koegel et al. zur Bedeutung des hIK1 für HaCaT-Keratinocyten, soll in dieser Dissertation insbesondere die Kopplung der Ca^{2+} -Homöostase mit der Aktivität des hIK1 näher analysiert werden.

Dabei stehen zwei zentrale Fragen im Vordergrund der Arbeit:

- Lassen sich mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie, die eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung erlaubt, die verschiedenen Komponenten der ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten darstellen? Aus welchen Kompartimenten wird das Ca^{2+} rekrutiert, inwieweit tragen hIK1 und andere Kanäle zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei? Welche Mechanismen sind an der Entfernung des Ca^{2+} aus dem Zytosol beteiligt?
- Inwieweit wird durch die Langzeitapplikation des hIK1-Öffners 1-EBIO, der zur paradoxen Herunterregulation des hIK1 führt, die Ca^{2+} -Homöostase beeinträchtigt und inwieweit erklärt dies die Langzeiteffekte von 1-EBIO auf Proliferation und Differenzierung der HaCaT-Keratinocyten?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterial und verwendete Chemikalien

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Materialien und Bezugsquellen

<i>Verbrauchsmaterial und Chemikalien</i>		
HaCaT-Zellen	(Boukamp <i>et al.</i> 1988)	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad	31885-023
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Sigma, München	P 3813
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin	S 0115
Trypsin/EDTA	Sigma, München	L2143
Penicillin/Streptomycin	Sigma, München	P4333
Calcium Green-1 AM (CG1)	Molecular Probes, Eugene	C3012
Fura Red AM (FR)	Molecular Probes, Eugene	F3021
Pluronsäure	Molecular Probes, Eugene	F127
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München	D8418
Kollagen Typ I	Sigma, München	C7661
Adenosin 5'-triphosphat (ATP)	Sigma, München	A7699
Thapsigargin	Sigma, München	T9033
1-Ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO)	Tocris, Ellisville Missouri	1041
1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM-34)	Sigma, München	T6700
ZnCl ₂	Sigma, München	
FluoroDishes	WPI, Sarasota	FD35
Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht	83.1810.002
<i>Geräte</i>		
Inkubator HERAcell®150	Kendro, Waltham	51022392
Laborbank HERAsafe KS	Kendro, Waltham	
Laser Scanning Microscope LSM 510	Zeiss, Jena	
Mikroskopstativ Axiovert 200	Zeiss, Jena	
Osmometer, Modell 210	Fiske, Norwood, MA	

2.1.2. Badlösungen

Tabelle 5: Hepes Buffered Saline (HBS) und ihre Zusammensetzung

	<i>HBS</i>	<i>HBS, Ca²⁺-frei</i>	<i>HBS, hohes K⁺</i>
KCl	3,0 mM	3,0 mM	31 mM
CaCl ₂	1,8 mM	-	1,8 mM
MgCl ₂	1,0 mM	2,8 mM	1,0 mM
NaCl	118 mM	118 mM	87 mM
HEPES/Na-HEPES	3 mM	3 mM	3 mM
EGTA	-	5 mM	-
Natrium-Glukonat	20 mM	20 mM	20 mM
D(+)-Glucose-Monohydrat	10 mM	10 mM	10 mM

Alle Bad- und Perfusionslösungen wurden direkt vor dem Versuch auf ihre Osmolarität überprüft, auf 37°C erwärmt und mit NaOH 1 M auf einen pH 7,4 eingestellt.

2.2. Zellkultur

2.2.1. HaCaT-Keratinocyten

Für die Versuche wurden freundlicherweise von Frau Heidi Kögel (Institut für Zellbiologie, ETH, Zürich) einige Kulturen mit HaCaT-Zellen zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Keratinocyten der HaCaT-Kultur

Seit 1988 steht eine Zelllinie zur Verfügung, welche spontan immortalisierte und seither als Modell für Keratinocyten etabliert ist. Entnommen aus der Peripherie eines Operationspräparates eines 62jährigen Melanom-Patienten, ließen sich die Zellen einer Kultur über mehrere Passagen hinweg kultivieren, ohne dass sie die wesentlichen Eigenschaften von Hautzellen sowie die Fähigkeit zur Differenzierung *in vivo* verloren haben (Boukamp *et al.* 1988).

Die besonderen Bedingungen, unter denen die Zellen dieser Kultur immortalisierten, erklären ihren Namen: Da das Kulturmedium eine verringerte Calciumkonzentration von 0,2 mM aufwies und die Inkubationstemperatur mit 38,5°C erhöht war, wurde die entstandene Zelllinie von den Autoren der Veröffentlichung „HaCaT“ genannt: „*human Adult Keratinocytes propagated under low Ca²⁺ and elevated Temperature*“. Obwohl die Zell-

linie unter Kulturbedingungen bereits nach wenigen Passagen robust gegenüber Änderungen der Calciumkonzentration im Medium und der Umgebungstemperatur war, ist sie nicht tumorigen. Der Karyotyp ist hypodiploid mit durchschnittlich 44 Chromosomen, das Y-Chromosom fehlt. Nach Transplantation unter die Muskelfaszie athymischer Mäuse zeigten HaCaT-Zellen ein Wachstumsmuster ähnlich dem von normalen menschlichen Hautzellen. Auf einer glutaraldehydfixierten Kollagenmatrix mit eingebetteten Fibroblasten bilden HaCaT-Zellen eine histologisch typische Epidermis aus, wenn auch mit einer Latenz von 2 Wochen gegenüber einer Kultur aus primären Keratinozyten. Diese Latenz werteten die Autoren als Zeichen für eine verringerte Sensitivität gegenüber Regulationsmechanismen aus dem extrazellulären Milieu (Boukamp *et al.* 1988).

2.2.3. Einfrieren von Reserve-Kulturen

Teile der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen bei einem Konfluenzgrad von etwas 80% eingefroren. Hierfür wurde die Kultur zunächst mit PBS gewaschen, für 10 min in Trypsin inkubiert, dann abpipettiert und in einem Eppendorf-Cup zu einem Zellpellet herab zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer Lösung aus FCS und 20 % DMSO resuspendiert und in geeigneten Eppendorf-Cups eingefroren. Einige Cups wurden zur weiteren Sicherheit in flüssigem Stickstoff (~ 196°C) gelagert.

2.2.4. Auftauen von Reservekulturen

Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wurden die Zellen jeweils zügig im Wasserbad aufgetaut und zu einem Pellet zentrifugiert. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde das Pellet in normales DMEM-Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche mit 25 cm² Wachstumsfläche übertragen und mit ca. 10 ml Kulturmedium überdeckt. Vor Erreichen der Konfluenz wurde die Kultur passagiert und in eine größere Flasche umgesetzt.

2.2.5. Passagierung

Jede aufgetaute Kultur wurde über 10-15 Passagen kultiviert und dann verworfen. Für die Routine-Kultivierung wurden Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 75cm² verwendet. Inkubiert wurde die Kultur bei 5% CO₂, 37° C und gesättigter Luftfeuchte in einem HERAc[®]150-Brutschrank. CO₂-Konzentration und Temperatur wurden kontinuierlich und automatisch überwacht. Das Kulturmedium enthielt DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Das Medium wurde regelmäßig nach 48-52h gewechselt. Sobald die Konfluenz einen Grad von etwa 80 % erreichte, wurden die Zellen passagiert.

Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10-12 min mit 4 ml EDTA/Trypsin-Lösung vom Schalenboden abgelöst. Um die Einwirkzeit des Trypsins auf die Zellen zu verringern, ließ sich das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch kräftiges Klopfen der Flasche auf die Arbeitsfläche beschleunigen. Sobald sich alle Zellen abgelöst hatten, wurde die Hälfte der Zellsuspension abpipettiert und verworfen. Die verbliebene Trypsin-

lösung wurde in einen Eppendorf-Cup überführt. Nach Abzentrifugieren wurde das Zellpellet mit einer Eppendorfpipette in Kulturmedium resuspendiert und wieder in die Kulturflasche überführt. Zuletzt wurde die Kulturflasche mit etwa 12 ml Kulturmedium aufgefüllt. Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter aseptischen Kautelen und den Bedingungen einer Sicherheitswerkbank, die nach den Anweisungen des Herstellers gewartet wurde. Diese Sicherheitswerkbank ist tauglich für Arbeiten der Sicherheitsstufe 2.

2.3. Zellpräparation

2.3.1. Präparation der FluoroDishes®

Für die Versuche im LSM wurden industriell vorgefertigte sterile Glasbodenschalen („FluoroDish“) verwendet. Die Kulturschalen hatten einen Durchmesser von 35 mm, der Boden bestand aus einer eingeklebten Glasscheibe mit einem Durchmesser von 23 mm und 0,17 mm Dicke. Um den HaCaT-Zellen ein Anhaften am Glasboden zu ermöglichen, wurden die Schalenböden mit Kollagen Typ I beschichtet. Das Kollagen Typ I war unter sterilen Bedingungen in 0,1M Essigsäure gelöst (1 mg/ml) und in Aliquots zu 1 ml bei -20°C eingefroren worden. Für die Beschichtung wurde jeder Glasboden mit 0,66 ml der Kollagenlösung (250 µg/ml) benetzt für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Angenommen, sämtliches Kollagen aus der Lösung hätte sich dem Glasboden gleichmäßig angehaftet, würde sich eine durchschnittliche Kollagendichte von 39 µg/cm² errechnen. Der Hersteller empfiehlt eine Kollagendichte von 6-10 µg/cm². In Versuchen mit einer errechneten Kollagendichte von 19 µg/cm² zeigte sich jedoch, dass die Zellen nicht zuverlässig anhafteten.

2.3.2. Aussaat der Zellen

Am Vortag des Versuchs wurden die Zellen analog zur Passagierung zunächst mit PBS gewaschen und für 10-12 min trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorf-Cup abzentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und einer Dichte von 500.000 bis 750.000 Zellen pro Schale in die FluoroDishes® übertragen. Jede Schale wurde auf 2 ml mit Medium aufgefüllt und bis zum Experiment bei 37° C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte inkubiert. Zum Zeitpunkt der Messung hatte die Kultur in dem FluoroDish® normalerweise einen Konfluenzgrad von etwa 80 % erreicht.

2.3.3. Inkubation mit 1EBIO

Für Experimente, bei denen die HaCaT-Zellen für 24 h in 1EBIO (1 mM) inkubiert wurden, erfolgte das Aussetzen der Zellen in die Versuchsschalen analog zur regulären Zellpräparation, jedoch wurden die Schalen dann mit 1-EBIO-haltigem Medium aufgefüllt.

2.3.4. Zellfärbung

Für die Ratiometrie im LSM wurden die Zellen mit Calcium Green-1 AM (CG1) und Fura-Red AM (FR) beladen. Von den Farbstoffen wurden zunächst Stammlösungen hergestellt (CG1 0,968 mM, FR 1,147 mM in 50% DMSO und 50% Pluronic). Für die Färbung der Zellen wurden jeweils 20 µl der Stocklösung in 3,22 ml HBS gelöst, es resultierten Konzentrationen von 6,014 µM für CG1 und 7,129 µM für FR. Eine Stunde vor Beginn der Messung wurden die Zellschalen dem Inkubator entnommen, das Medium verworfen und die Zellen sorgfältig mit HBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 0,5 ml Färbelösung überdeckt und für 30 min bei 37°C und Raumluft inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen nochmals sorgfältig mit HBS gewaschen und dann für weitere 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur ($T = 22^{\circ}\text{C}$) in der Badlösung ruhen gelassen.

2.4. Fluoreszenz

Es wird von Fluoreszenz gesprochen, wenn Licht von einem Molekül absorbiert und ein Teil der absorbierten Energie nach einer kurzen Latenzzeit, welche im Bereich von Nanosekunden liegt, wieder in Form von Photonen abgegeben wird.

Durch die Absorption von Photonen einer bestimmten Energie wird ein Elektron eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls in einen höheren Energiezustand gehoben. Dadurch geht das Molekül vom Grundzustand in einen angeregten Zustand über. In einem kurzen Relaxationsprozess fällt das Molekül in seinen Grundzustand zurück, wobei Energie in Form eines Photons abgestrahlt wird (Deitmer und Schild 2000).

2.4.1. Calcium Green-1 AM und Fura Red AM

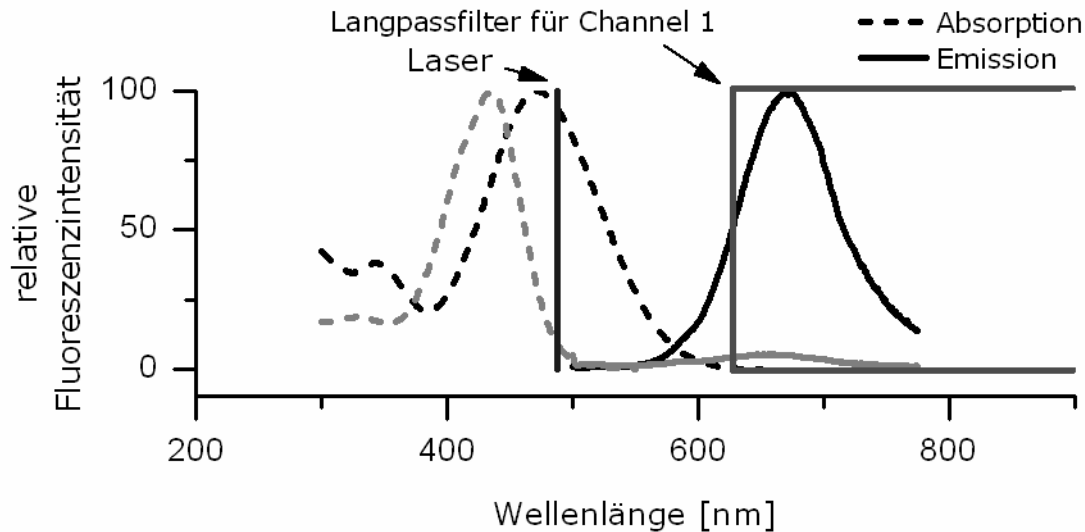


Abbildung 5: **Absorptions- und Emissionsspektren von Fura Red.** In Ca^{2+} -gesättigter Lösung (grau) wird Fura Red (mit Licht mit $\lambda = 488 \text{ nm}$) zu 8,6 % seiner maximalen Absorptionsfähigkeit (gestrichelt) angeregt. Die emittierte Fluoreszenz liegt bei 5,2 % der maximalen Intensität und ist damit ebenfalls gering (durchgezogen). Anders verhält es sich bei Ca^{2+} -freier Lösung (schwarz). Das Absorptionsspektrum verschiebt sich in den langwelligeren Bereich und FR wird von Licht einer Wellenlänge von 488 nm zu 93,7 % seines Absorptionsmaximum angeregt. Die emittierte Fluoreszenz ist bei einer Wellenlänge von 660 nm am stärksten und fast 20fach stärker als in Ca^{2+} -gesättigter Lösung (Daten aus einer Produktinformation von Invitrogen). Eingezeichnet ist das Band zur Detektion der von Fura Red emittierten Fluoreszenz.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden Derivate der beiden Farbstoffe gewählt, bei welchen die Carboxylgruppen mit Acetoxymethylgruppen verestert sind. Als Ester sind die Farbstoffe unpolar und damit in der Lage, die Zellmembranen zu passieren. Im Zytoplasma werden die Esterbindungen von zumeist unspezifischen Esterasen gespalten. Bei diesem Prozess entsteht Formaldehyd, Acetat und die Säure des Farbstoffes (Deitmer und Schild 2000). Durch die Entesterung bleiben die Gradienten der Farbstoffe über die Membran während der Inkubation erhalten und die Farbstoffe können in den Zellen zu einer Konzentration akkumulieren, welche höher als jene in der Inkubationslösung werden kann. Dieser Prozess wird auch als „Capturing“ bezeichnet.

Bei calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen ist die Fluoreszenzintensität abhängig von der Calciumkonzentration. So verhält es sich auch mit Calcium Green-1 (CG1) und Fura Red (FR). Licht einer Wellenlänge von 488 nm regt CG1 zu 46% seiner maximalen Absorptionsfähigkeit an. Bei FR verschiebt sich zusätzlich das Absorptionsmaximum mit steigender Ca^{2+} -Konzentration in den kurzwelligeren Bereich von 471 nm nach 435 nm. In Ca^{2+} -freier Pufferlösung wird FR von Licht einer Wellenlänge von 488 nm zu 93% seiner maximalen

2.4. Fluoreszenz

Absorptionsfähigkeit angeregt, in gesättigter Ca^{2+} -Lösung nur zu 8,6%. Entsprechend steigt die Fluoreszenzintensität von FR mit geringer werdender $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

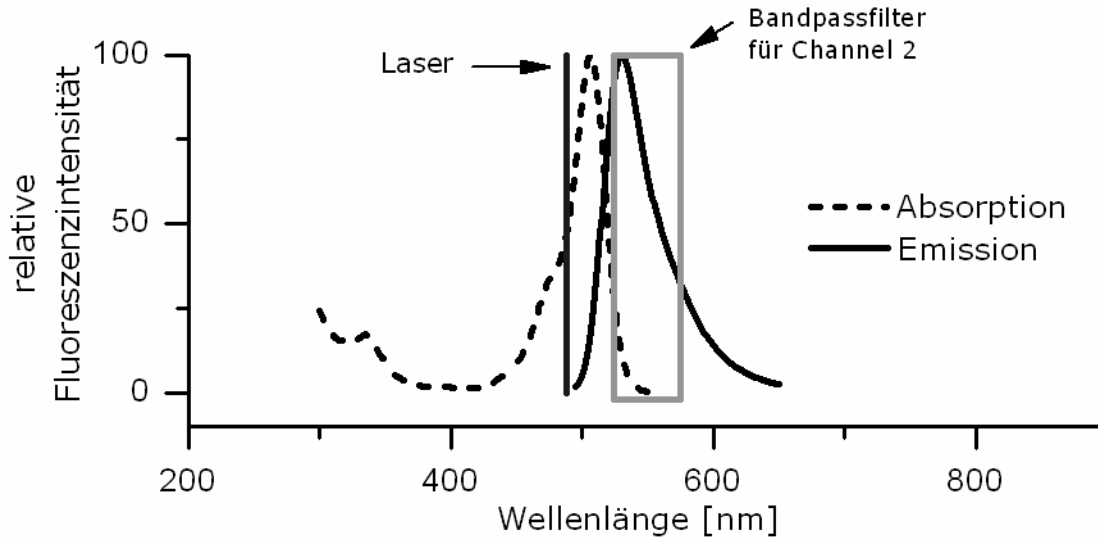


Abbildung 6: **Absorptions- und Emissionsspektrum von Calcium Green-1 (CG-1)**. Anders als FR verändert CG1 sein Absorptionsspektrum nur minimal. Von Licht einer Wellenlänge von 488 nm lässt es sich zu 46,6 % seiner maximalen Absorptionsfähigkeit anregen (gestrichelt), das Emissionsmaximum liegt bei 529 nm (durchgezogene Linie). Auch bei geringer werdendem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liegen die Maxima im gleichen Bereich (Kurve nicht abgebildet, Daten aus Produktinformation von Invitrogen). Eingezeichnet ist das Band zur Detektion der von CG1 emittierten Fluoreszenz.

2.5. Ratiometrische Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die detektierte Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Calciumkonzentration in der Zelle. Würde nur ein einzelner Farbstoff verwendet, wäre die registrierte Fluoreszenzintensität jedoch zusätzlich abhängig von der Konzentration des Farbstoffes in der Zelle, der Zelldicke sowie dem Grad der Ausbleichung.

Werden die Zellen mit zwei Farbstoffen beladen, sind auch beide Farbstoffe von diesen Faktoren abhängig. Nun lassen sich die beiden ersten dieser Einflussgrößen heraus rechnen, wenn der Quotient der beiden Fluoreszenz-Intensitäten zueinander gebildet wird. Zeigen beide Fluoreszenzfarbstoffe eine vergleichbare Ausbleichcharakteristik und sind beide demselben Anregungslicht ausgesetzt, dann lässt sich auch diese Größe durch die Division der Intensitäten eliminieren.

Für die unternommenen Versuche wurden die Intensitätsverläufe aufgezeichnet und in eine Origin-Tabelle exportiert. Um den Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration darzustellen und zu untersuchen, wurde dann mit Hilfe der Origin-Software für jeden Zeitpunkt der Messung der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten von CG1 und FR gebildet.

$$[Ca^{2+}]_i(t) \sim \frac{F_{CalciumGreen}(t)}{F_{FuraRed}(t)}$$

Gleichung 2: Formel zur Ermittlung des Maßes für die relative intrazelluläre Calciumkonzentration

Der absolute Wert für die Calciumkonzentration wurde nicht ermittelt, es wurden die Verläufe auf die Grundlinie („Baseline“) normiert. Hierfür wurde das arithmetische Mittel aller Werte der Baseline errechnet und anschließend sämtliche Quotienten durch dieses Mittel dividiert. So liegt die Grundlinie aller Messungen bei dem Ordina-

tenwert 1, und als Maß für die Calciumkonzentration wurden nicht absolute Werte, sondern die Ratio der beiden Fluoreszenzintensitäten angegeben.

2.6. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Für die beschriebenen Versuche wurde das Laser-Scanning-Microscope LSM 510 (Zeiss) verwendet. Das LSM 510 ist aus drei Modulen zusammengesetzt: dem Laser-Modul, dem Scan-Modul und dem Mikroskop (Stativ).

2.6.1. Laser-Modul

Das Laser-Modul des LSM 510 besteht aus drei Lasern, welche parallel auf einer schweren schwingungsdämpfenden Grundplatte montiert sind. Der verwendete Argon-Laser (Lasos Lasertechnik GmbH) hat eine maximale Ausgangsleistung von 30 mW und erzeugt Laser-Strahlung der Wellenlängen von 458, 477, 488 und 514 nm. Über Spiegel werden die Strahlengänge des Argon-Lasers sowie der beiden Helium-Neon-Laser in einen gemeinsamen optischen Ausgang gekoppelt. Durch einen temperaturkontrollierten akustisch-optischen Strahlteiler (AOTF) erfolgt die Selektion der Laserlinien und die Strahlabschwächung. Ein Lichtleiter führt den Laserstrahl polarisationserhaltend (für 450-770 nm) in das Scanmodul. Die Laser sind durch den Hersteller nach DIN EN 60825-1 als der Klasse IIIb zugehörig klassifiziert.

2.6.2. Scan-Modul

Das Scan-Modul ist linksseitig am Mikroskop-Stativ angebracht. Das Laserlicht, welches über den Lichtleiter in das Scanmodul gelangt, wird nach Passieren des Kollimators vom Hauptfarbteiler zum Scanner reflektiert. Der Scanner besteht aus zwei unabhängigen galvanometrischen Spiegeln und führt den Lichtstrahl im Zusammenspiel mit der Optik des Scanners und des Stativs als Lichtpunkt über das Präparat. Die Fluoreszenz aus dem Präparat passiert erneut den Hauptfarbteiler und kann distal davon durch einen weiteren Nebenfarteiler in zwei Kanäle aufgespalten werden. Wieder distal der Nebenfarteiler befindet sich für jeden Kanal ein in Größe und Position einstellbares *Pinhole*, welches die konfokale Funktionalität des Kanals herstellt. Jenseits der *Pinholes* liegt jeweils der Photomultiplier, welcher die einfallende Fluoreszenz detektiert. Das Scan-Modul ermöglicht eine maximale Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln für bis zu drei Kanäle und erreicht eine maximale Geschwin-

2.6. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

digkeit von fünf Bildern (bei einer Bildgröße von 512 x 512 Pixel) in einer Sekunde. Das Scanfeld hat in der Zwischenbildebene eine maximale Bilddiagonale von 18 mm. Die Datentiefe beträgt maximal 12 bit ($2^{12}=4096$ Grauwertabstufungen). Für die Messungen wurde - wenn nicht anders erwähnt - folgende Einstellungen verwendet:

- Bildgröße: 230 μm · 230 μm (512 x 512 Pixel, 22 Pixel / 10 μm)
- Bildfrequenz: 0.5 Hz
- Anregungswellenlänge: 488 nm, 10 % der maximalen Laserintensität
- Objektiv: Plan-Neofluar 40x / 1.3 Oil
- Scan-Zoom: 1; Average 1
- Hauptfarbteiler: 488 nm
- Nebenfärbteiler: 545 nm
- Pinholes: für beide Kanäle 807 μm , entsprechend einer Schichtdicke im Präparat von 10 μm
- für Channel 1: Pinhole 807 μm , vorgeschaltetes Langpassfilter LP 585 nm
- für Channel 2: Pinhole 807 μm , vorgeschaltetes Langpassfilter LP 505 nm

Aus der Summe der getroffenen Einstellungen ergibt sich für Channel 1 (Ch1), dass dieser Kanal die Fluoreszenz mit einer Wellenlänge größer als 585 nm registriert. Ch1 ist somit funktionell mit einem Langpassfilter versehen. Im Wellenlängenbereich dieses Kanals liegt ein Maximum des Spektrums von FR. Channel 2 (Ch2) registriert Fluoreszenz einer Wellenlänge von 505 nm bis 545 nm, es liegt also ein Bandpassfilter vor. In diesem Band liegt das Maximum der Fluoreszenzemission von CG-1.

Bei den verwendeten Einstellungen wird 54,2% der vom CG1 emittierten Fluoreszenz in Channel 2 detektiert. 1,1 % des emittierten Lichts ist zu kurzwellig, um von diesem Kanal detektiert zu werden, 43,3 % der Lichtenergie ist zu langwellig. 11,3 % des von CG 1 emittierten Lichtes ist gar so langwellig, dass es von Channel 1 registriert wird. Dieser Kanal ist eigentlich dazu bestimmt, das Licht von FR zu detektieren.

Ch1 detektiert 98,3 % der von FR emittierten Fluoreszenz. 1,75 % der Lichtenergie ist zu kurzwellig für das bei diesem Kanal verwendeten Langpassfilter. Weniger als 1 % der FR-Fluoreszenz liegt im Bereich des Bandpassfilters, welcher für die Detektion der Fluoreszenz des CG-1 bestimmt ist.

Die Fluoreszenzintensität des FR ist geringer als die des CG1. 5,8 % des in Ch1 detektierten Lichtes ist Fluoreszenz, welche von CG1 emittiert wird.

2.6.1. Mikroskopstativ

Für die Mikroskopie wurde das inverse Mikroskop Axiovert 200 M (Zeiss) eingesetzt, welches auf einer schweren Arbeitsplatte mit Druckluftdämpfung montiert war. Objektivtrommel und Reflektorkarussell werden durch einen Servo angesteuert, auch der Z Trieb des Objektivs erfolgt servokontrolliert. Für die Laser-Scan-Mikroskopie wurde ein Öl-Immersions-Objektiv mit vierzigfacher Vergrößerung verwendet. Für die Musterung der Kultur und die Auswahl des Scanfeldes wurde ein 10x-Objektiv verwendet.

2.6.2. Konfokale Funktion

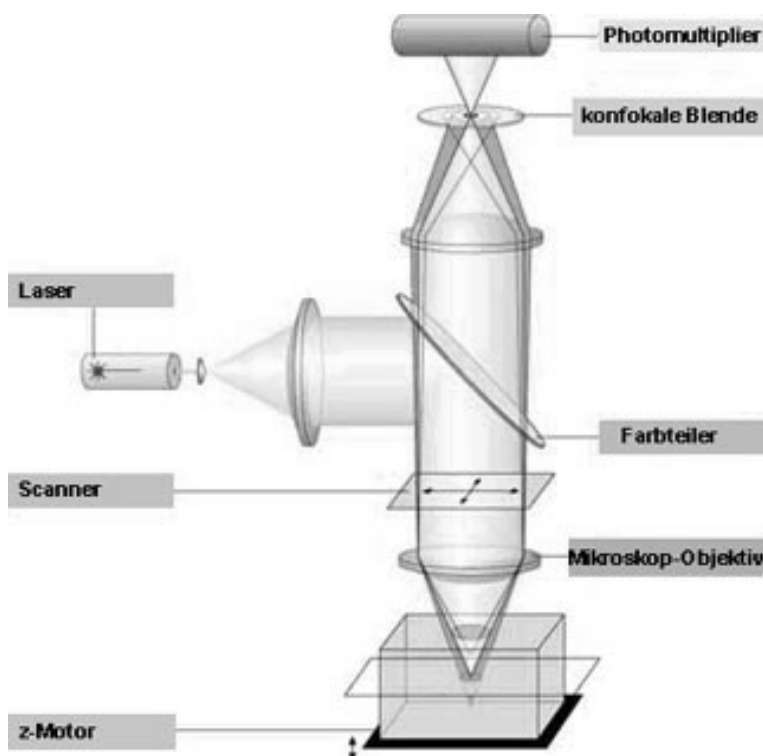


Abbildung 7: Die konfokalen Funktion in einem Laser-Scan-Mikroskop von Zeiss. In der Probe wird über ihre gesamte Dicke der Fluoreszenzfarbstoff mit dem Laserlicht angeregt. Jedoch wird mit der konfokalen Blende („Pinhole“) sämtliches Licht, welches nicht aus der eingestellten Ebene emittiert wird, ausgeblendet (Darstellung von Zeiss 2008).

welcher gescannt wird. Licht, welches unter- oder oberhalb der gewünschten Schnittebene entsteht, wird durch das Pinhole ausgeblendet. Das Pinhole gewährleistet auf diese Weise eine scharfe, von Streulicht weitgehend befreite Abbildung des Fokuspunktes (Paddock 2008).

Das Laserlicht, mit welchem das LSM 510 die Zellen zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe scannt, wird mit einem Objektiv auf die Probe fokussiert. Obwohl die Anregungsintensität im Fokus des Objektivs am größten ist, entsteht Fluoreszenz innerhalb des gesamten Lichtkegels, mithin über die gesamte Dicke der gefärbten Probe (vergl. Abbildung 7).

Das emittierte Fluoreszenzlicht wird bei einem konfokalen Mikroskop mit dem Objektiv auf eine sehr kleine Blende, das Pinhole, fokussiert. Der Fokuspunkt des Objektivs und das Pinhole liegen in konjugierten Ebenen, d.h. sie liegen *konfokal*. Jetzt bestimmt die Weite des Pinholes die Dicke des virtuellen Schnittes,

2.7. Perfusion

Für die Laser-Scan-Messungen wurden die Zellen in FluoroDishes kultiviert, welche für den Versuch in einen speziell angefertigten Einsatz geklemmt wurden. Dieser Einsatz ließ sich passgenau in den Mikroskop-Tisch setzen und gewährleistete eine Perfusion der Zellen ohne eine Gefährdung der darunter liegenden Elektronik. Als Standard-Badlösung wurde eine HBS-Lösung (Koegel *et al.* 2003) eingesetzt. Die Ionenzusammensetzung der HBS-Lösung entspricht am ehesten einer Extrazellulärflüssigkeit. Direkt vor dem Versuch wurde die Lösung auf 37°C erwärmt und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Osmolarität der Badlösungen wurden vor jedem Versuch mit einem Osmometer überprüft und lag regelmäßig in einem Bereich von 290 mosmol/l.

Das ATP wurde am Tag des Versuchs zu einer 10 mM-Stammlösung (Aqua dest.) zubereitet.

Die Applikation der Pharmaka erfolgte über ein Y-Filament. Das Y-Filament besteht aus einem MikroFil®-Filament mit einem Innendurchmesser von 28 Gauge (250 µm), welches so in ein Y-Element eingesteckt ist, dass das proximale Ende in einer kleinvolumigen Kammer endet. In diese Kammer führen ein Zugang und ein Abfluss aus jeweils einem flexiblen PE-Schlauch (Innendurchmesser 0.9 mm, ca. 80 cm Länge). Das proximale Ende des oben gelegenen Zuflusses reicht in ein Reagenzglas, während das distale Ende des unten gelegenen Abflusses in einen Abwurf reicht. Der unten gelegene Schlauch ist unterbrochen durch ein kurzes Interponat aus weichem Silikon, welches mit einer Klemme verschlossen werden kann. Das Öffnen dieser Klemme ermöglicht ein Austauschen der Perfusionslösung im Schlauchsystem, das Schließen lässt die Perfusionslösung wieder durch das Y-Filament laufen.

Das Perfusionssystem wurde vor jedem Versuch sorgfältig mit Ethanol 70% sowie Aqua dest. gespült, um auch lipidlösliche Substanzen zu entfernen. Bestand der Verdacht auf Verunreinigung durch unlösliche Substanzen, wurde das gesamte Schlauchsystem verworfen und durch ein neues ersetzt.

2.8. Protokolle und Auswertung

Die Versuche verliefen nach einem standardisierten Protokoll. Vor Applikation der Substanzen wurden die Zellen zunächst für wenigstens 30 min bei Raumluft in Dunkelheit ruhen gelassen.

Die Kulturschale wurde dann in das Inset geklemmt und auf dem Mikroskoptisch fixiert. Nach Musterung der Kultur bei 10x-Vergrößerung wurde ein Messfeld gewählt, in welchem die HaCaT-Keratinocyten in typischer subkonfluenter Konfiguration wuchsen. Bei 40x-Vergrößerung erfolgte die vorsichtige Positionierung des Microfil®-Filaments so, dass die Öffnung im Mikroskopbild links zu liegen kam. Die Scan-Bilder werden von

der Software so ausgerichtet, dass das Filament senkrecht auf dem unteren Rand zeigt. Scan-Zeitserien bei 10x-Vergrößerung zeigten, dass das Gesichtsfeld bei 40x-facher Vergrößerung schnell und gleichmäßig perfundiert wird (Messungen nicht gezeigt).

Nach dem Start der Zeitserie wurden zunächst zur Bestimmung der Baseline jeweils 100 Scans mit einer Frequenz von 0.5 Hz durchgeführt. Nun wurde – abhängig vom Protokoll – das Pharmakon eingewaschen. ATP wurde jeweils für 90 s über die Zellen perfundiert. Nach spätestens 1500 Bildern wurden die Messungen beendet. Ließ sich bei Beobachtung der Fluoreszenzbilder über fünf Minuten keine Änderung der Fluoreszenz wahrnehmen, erfolgte der Beendigung der Registrierung bereits zu einem früheren Zeitpunkt.

Für jede Messung wurden 15 - 20 Zellen ausgesucht, welche die typischen Merkmale von proliferierenden HaCaT-Zellen aufwiesen: spindelige Form, vereinzelter Kontakt zu einer oder mehreren Nachbarzellen, jedoch keine zu geringe Fläche. Die ausgewählten Zellen befanden sich nie offensichtlich in einem Mitoseprozess; sie wiesen weder Färbartefakte noch eine offenkundige Über- oder Unterbeladung mit den Farbstoffen auf. Als weitere Bedingung für die Einbeziehung war das Fehlen von Calciumoszillationen während der Aufzeichnung der Baseline.

Die ausgesuchten Zellen wurden - jede für sich und über ihre gesamte Ausdehnung - als „Regions of Interest“ (ROI) gekennzeichnet. Die LSM-Software stellte nach der Auswahl der Zellen und deren Markierung eine Tabelle bereit, in der für jede Zelle die Werte für die in dem jeweiligen Kanal detektierte Fluoreszenz dargestellt wurden.

Für die Verrechnung und Darstellung der Daten wurde für jede Schale diese Tabelle an die Origin-Software übergeben. Für jede Zeitserie und Zelle wurde der Quotient aus den beiden Fluoreszenzintensitäten errechnet und dann der Mittelwert der Baseline ermittelt. Durch diesen Mittelwert der Baseline wurde dann die Ratio dividiert, um sie auf den Grundwert 1 zu normieren. Im Anschluss wurden aus den auf die Baseline normierten Verläufen der Zellen einer Schale der Mittelwert gebildet.

Um die beschreibenden Parameter der Zeitverläufe zu bestimmen, wurden verschiedenen Werte bestimmt. Der $t_{0,5}$ -Wert beschreibt jene Zeit, welche der Transient braucht, bis die Calciumkonzentration auf den halbmaximalen Wert abgefallen ist. Der $t_{0,1}$ -Wert bezeichnet die Zeitdauer, in der die Calciumkonzentration auf 10% des Maximalwertes abgesunken ist; er stellt somit eher ein Maß für die Dauer des Transienten dar. Als weiteren Parameter wurde jene Fläche bestimmt, welche der Transient vom Zeitpunkt t_0 bis zum Zeitpunkt $t_{0,1}$ mit einer abszissenparallelen Geraden mit $y = 1$ einschließt. Dieser Parameter ist zu Beschreibung pharmakokinetischer Prozesse gebräuchlich und wird „Area under the curve“ (AUC) genannt. Die Maximale Amplitude der Ratio wurde ebenfalls bestimmt und verglichen.

Für jedes Protokoll wurden die Experimente von wenigstens fünf Schalen ausgewertet, welche an wenigstens zwei Tagen mit jeweils eigens zubereiteten Badlösungen durchgeführt wurden.

2.9. Statistik

Die Transientenamplituden sowie die $t_{0,1}$, $t_{0,5}$ und AUC-Werte wurden mittels ANOVA-Test und post-Test nach Tukey miteinander verglichen. Signifikant galten Ergebnisse mit $p < 0,05$; als hoch signifikant Ergebnisse mit $p < 0,0005$.

Die Berechnungen und die Plot-Abbildungen wurden mit der Origin 7G SR1-Software erstellt. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Irfan View, Gimp und InkScape. Dieses Dokument wurde mit OpenOffice erstellt, die Literaturverwaltung wurde mit Bibus bewerkstelligt.

3. Ergebnisse

3.1. Messungen zur Validität der Methode

In einer ersten Serie von Experimenten wurde untersucht, wie sich der Ca^{2+} -Transient mit der verwendeten Methode darstellt. Bislang sind in der Literatur vorrangig Befunde beschrieben, welche mit fluorometrischen Methoden gewonnen wurden (Csernoch *et al.* 2000; Koegel *et al.* 2003). Die Laser-Scan-Mikroskopie bietet hingegen die Möglichkeit, räumlich und zeitlich gut aufgelöste Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumkonzentration herzustellen.

Die zeitliche Auflösung einer Zeitserie wird limitiert durch den Ausbleicheffekt über die Länge der Aufzeichnungen. Bei einer Scanfrequenz von 0,5 Hz lassen sich Zeitserien von über 45 min Dauer aufzeichnen. Dabei erreicht das Bleaching zwar - in absolutem Maßstab - ein bemerkenswertes Ausmaß, durch die Verrechnung zur Ratio wird dieser Effekt jedoch in ausreichender Weise kompensiert.

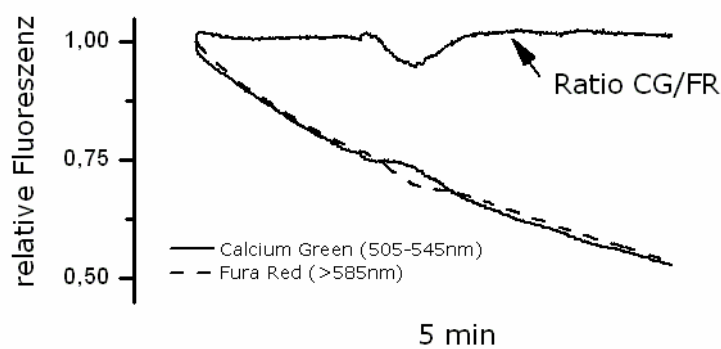


Abbildung 8: **Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von CG1 und FR sowie ihr Quotient.** Dargestellt ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität in einem Verlauf über 12 min. Die Aufzeichnung erfolgte bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Intensität von 10 % der Maximalleistung. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde gemittelt aus der gescannten Fläche eines Quadrates mit 230 μm Kantenlänge und anschließend auf den Maximalwert bei $t=0$ genormt. Die Ratio CG-1 / FR ist der Quotient aus den genormten Fluoreszenzintensitäten in den Frequenzbereichen von Calcium Green-1 und FR. Die Ratio kann als Maß für die Calciumkonzentration gewertet werden.

faktes (Sekunde 250 - 450) befreit.

Vorgänge wie das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs lassen sich in aller Regel durch eine Funktion für eine exponentielle Abnahme beschreiben. Der in Abbildung 8 dargestellte Graph für die Fluoreszenz in dem Band von 505-545 nm lässt sich mit Hilfe von Origin an eine Funktion für exponentielle Abnahme anpassen. Um das Ausbleichen des Farbstoffes an eine Funktion anzupassen, wurde folgende Formel gewählt:

$$f(t) = A_1 \cdot e^{(-x/T)} + y_0$$

Gleichung 3: Formel zum Anpassen des Ausbleichens der Fluoreszenzintensitäten

Für das Anpassen wurden die Graphen von dem Bereich des Arte-

3.2. Der zeitliche Verlauf des ATP-induzierten Ca^{2+} Transienten

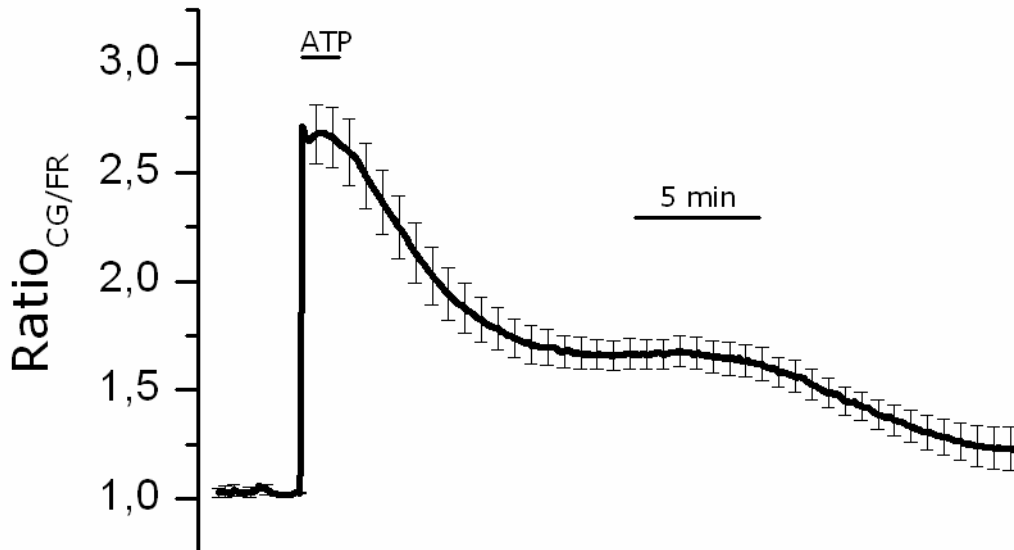


Abbildung 9: Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation von ATP ($30 \mu\text{M}$) über eine Dauer von 90 s. Der abgebildete Graph ist das arithmetische Mittel der Transienten von Zellen aus 7 Schalen. Die ATP-Applikation ($30 \mu\text{M}$) erfolgte über das Y-Filament über eine Dauer von 90 s. $[\text{Ca}^{2+}]_o$ betrug immer 1,8 mM. $n = 7, \pm \text{SEM}$

Abbildung 9 zeigt die gemittelten Transienten aus sieben Schalen, welche gemäß dem Standardprotokoll zum Zeitpunkt $t = 0$ für 90 s über das Y-Filament mit ATP (hier: $30 \mu\text{M}$) perfundiert wurden. $[\text{Ca}^{2+}]_o$ betrug wie bei allen Experimenten, ausgenommen die Experimente in EGTA-gepufferter Badlösung, 1,8 mM.

Der abgebildete Transient ist typisch für die Antwort der Zelle auf einen ATP-Stimulus. Um die Baseline darzustellen, wurden die Zellen zunächst unter Kontrollbedingungen für etwa 200 s mit der Standardbadlösung perfundiert. Direkt nach dem Anfluten von ATP steigt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einer steilen Flanke direkt auf den Maximalwert des Transienten an. Im Anschluss an diesen Peak fällt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder ab, um erneut zu einer ersten Schulter anzusteigen. Im Anschluss an diese „Schulter“ fällt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Verlauf von ca. 20 min auf den Ausgangswert zurück. Im Verlauf dieses Abfalls bildet sich ein weiteres Plateau („2. Schulter“) heraus.

Der Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den Ausgangswert nimmt zwar einen typischen Verlauf, ist aber zu variabel, um ihn regelmäßig an eine einzige Funktion anzupassen. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fiel in den Kontrollmessungen nach der Perfusion

mit ATP ($30 \mu\text{M}$) in $408,5 \text{ s}$ ($\pm 27,6 \text{ s}$) auf die Hälfte des maximalen Wert ab und brauchte $1611,3 \text{ s}$ ($\pm 93,5 \text{ s}$) um auf 10% des Maximalniveaus zurückzukehren. Die AUC betrug $1268,8$ ($\pm 170,1$).

3.3. Der Verlauf des Transienten ist dosisabhängig

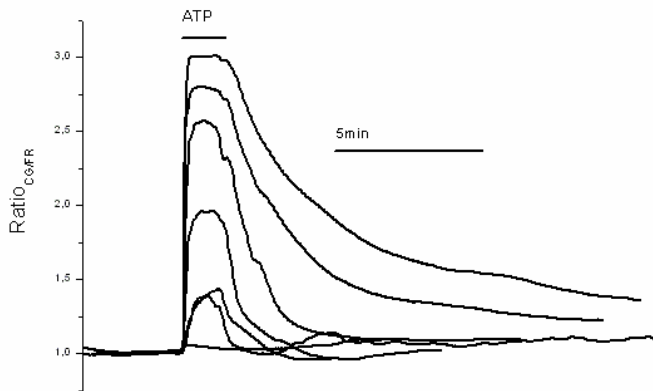


Abbildung 10: **Aufsteigende Dosen von ATP und die durch sie induzierten Transienten.** Dargestellt sind die Ca^{2+} -Transienten in HaCaT-Zellen nach ATP-Applikation von 90 s Dauer in aufsteigender Dosierung (10 nM bis $100 \mu\text{M}$). Nicht nur die Amplitude, auch andere Merkmale der Transienten verändern ihre Ausprägung mit steigender ATP-Konzentration.

Um zu testen, ob der Ca^{2+} -Transient in seiner Form und Dauer abhängig ist von der Dosis des applizierten ATP, wurden die Zellen mit Konzentrationen unterschiedlicher Größenordnungen perfundiert. Die niedrigste getestete Dosis betrug $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, die höchste ATP-Konzentration betrug $0,1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Um zu berücksichtigen, dass bei niedrigen ATP-Konzentration nur einzelne Zellen auf den Stimulus mit einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reagieren, wurden für diese Untersuchung nicht einzelne Zellen ausgesucht, sondern es wurde ein

rechteckiges Feld von $100 \times 50 \mu\text{m}$ Kantenlänge definiert, dessen Fluoreszenz erfasst und gemittelt wurde. Bei der niedrigsten untersuchten ATP-Konzentration ($1 \times 10^{-9} \text{ M}$) reagierte keine Zelle auf typische Weise. Für höhere als die untersuchten ATP-Konzentrationen ($0,1 \times 10^{-3} \text{ M}$) gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Toxizität (Pillai und Bikle 1992).

Typischerweise veränderte sich bei aufsteigender ATP-Konzentration sowohl die Amplitude als auch die Länge der Ca^{2+} -Transienten. Zudem ließ sich beobachten, dass die Steilheit der initialen Flanke mit steigender Konzentration zunahm. Um den Transienten quantitativ zu beschreiben, wurden als Parameter zum einen die Amplitude der Ratio als auch die „Area under the curve“ (AUC) gewählt.

3.3. Der Verlauf des Transienten ist dosisabhängig

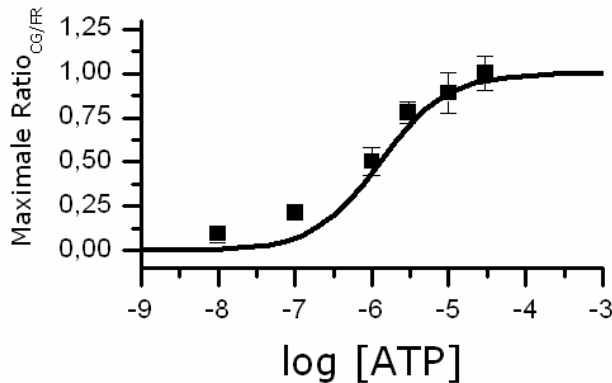


Abbildung 11: **Die Dosiswirkungskurve für ATP, gemessen an der maximalen Amplitude des Transienten.** Gemessen wurde die maximale Amplitude der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es wurden auch Werte für $[\text{ATP}] = 100\mu\text{M}$ gemessen, allerdings existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass ATP-Konzentrationen dieser Größenordnung toxisch wirken. $\text{EC}_{50} = 0,69\mu\text{M}$

Abbildung 11 zeigt die maximale Ratio CG/FR auf den Logarithmus der ATP-Konzentration aufgetragen (10^{-8} bis 3×10^{-6}); die Fehlerbalken beschreiben den SEM. Der Fit-Algorithmus der Origin-Software passte die Punkte fehlergewichtet an. Der mit Origin ermittelte EC_{50} -Wert beträgt $0,69\mu\text{M}$.

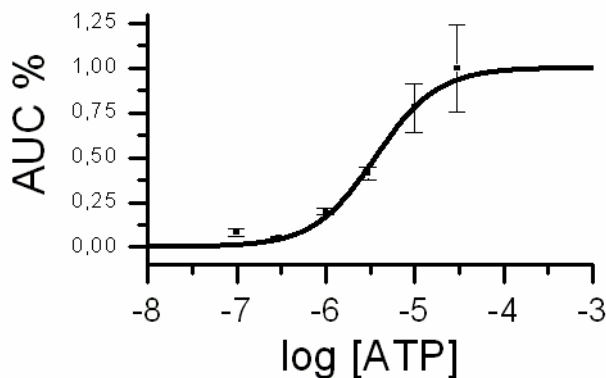


Abbildung 12: **Dosisabhängiger Effekt von ATP auf die AUC.** Auch die AUC wurde bei der Antwort der HaCaT-Zellen auf einen ATP-Stimulus untersucht. Die IC_{50} der AUC liegt bei $3,56\mu\text{M}$ und damit in einem höheren Bereich als die der Amplitude. Wieder fehlt der Wert für $[\text{ATP}] = 100\mu\text{M}$.

Abbildung 12 zeigt die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Fläche unter dem Ordinatenwert 1 wurde abgezogen. In Abbil-

Untersucht man die Amplitude der Calciumantwort auf einen ATP-Stimulus, so lässt sich beobachten, dass die Reaktion der einzelnen Zelle auf ATP in geringer Konzentration ($< 10^{-6}\text{M}$) einer Alles-Oder-Nichts-Charakteristik folgt. Erst mit dann aufsteigender ATP-Konzentration ließ sich eine graduell zunehmende Amplitude des Calciumtransienten und der AUC messen. Mit Hilfe der Origin-Software ließ sich darstellen, auf welche Weise die Amplitude des Calciumtransienten von der Dosis des ATP-Stimulus abhängt. In Abbildung 11 ist die maximale Ratio CG/FR auf den Logarith-

Auf die gleiche Weise wie bei der maximalen CG-1 / FR-Ratio wurde auch untersucht, wie die AUC von der ATP-Dosis abhängt. Wie für die maximale Ratio gilt auch für die AUC, dass bei geringen ATP-Konzentrationen die Reaktion der Zellen auf ATP einer Alles-Oder-Nichts-Charakteristik folgt. Für die Untersuchung der AUC wurde die CG-1 / FR-Ratio auf die Baseline (=1) normiert. Anschließend wurde der Zeitpunkt t bestimmt, zu welchem die Ratio auf 10% der maximalen Ratio abgefallen ist und mit Hilfe von

Abbildung 12 ist die normierte AUC auf den Logarithmus der ATP-Dosis aufgetragen. Bezüglich der AUC ermittelt sich mit Origin für den EC_{50} -Wert eine Dosis von $3,56 \mu\text{M}$.

3.4. Der Effekt einer persistierenden ATP-Applikation auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$

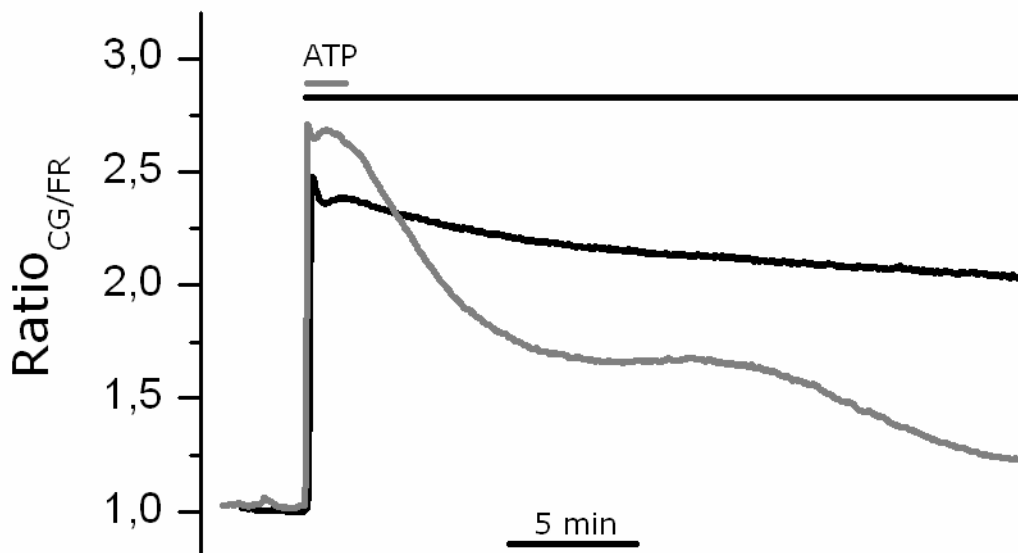


Abbildung 13: **Effekt einer fortgesetzten Applikation von ATP im Vergleich zur kurzen Applikation.** Wird ATP fortdauernd auf die Keratinozyten appliziert, dann lässt sich ein Transient wie abgebildet (schwarz) registrieren. Im Vergleich der Verlauf des Transienten nach einer ATP-Applikation von 90 s Dauer.

Im Standardprotokoll wird ATP für die Dauer von 90 s appliziert. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, wie sich die anhaltende Applikation von ATP im Vergleich zu dem Standardprotokoll auf den Ca^{2+} -Transienten auswirkt. Abbildung 13 zeigt die beiden Transienten im Vergleich. Beide Graphen bilden das arithmetische Mittel einer größeren Anzahl an Messungen ab. Der grau gezeichnete Transient beschreibt den Verlauf des Calciumtransienten in den Kontrollen, welche für die Dauer von 90 s mit ATP ($30 \mu\text{M}$) perfundiert wurden. Für die Zellen, deren Calciumtransienten durch den schwarz gezeichneten beschrieben werden, wurde das gleiche Protokoll angewandt, jedoch erfolgte nicht nach 90 s das Ende der ATP-Applikation, sondern sie wurde für die Dauer des Experimentes fortgesetzt.

Die wesentlichen Merkmale der Transienten sind bei beiden Gruppen identisch: die steile Flanke des initialen Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie der erste kurze Abfall, welcher sich direkt anschließt. Der weitere Verlauf der ATP-induzierten Transienten in den Kontrollmessungen ist durch einen kontinuierlichen Abfall der Calciumkonzentration gekennzeichnet, welcher durch eine weitere langgezogene Schulter markiert wird (vergl. Abschnitt 3.2).

3.4. Der Effekt einer persistierenden ATP-Applikation auf die $[Ca^{2+}]_i$

Der Abfall der Calciumkonzentration in den Zellen, welche kontinuierlich mit ATP (30 μ M) perfundiert wurden, ist deutlich langsamer und weist keine Anzeichen einer „Schulter“ auf. Die Amplitude der beiden Ca^{2+} -Transienten unterscheidet sich nicht wesentlich voneinander.

3.5. Die Bedeutung von Calciumströmen für die Form und Dauer des Transienten

3.5.1. Effekt des extrazellulären Ca^{2+}

Um zu untersuchen, ob die Zelle den Calciumtransienten aus intra- oder extrazellulären Kompartimenten speist, wurde der Versuch in calciumfreier Badlösung wiederholt. Kontaminationen mit Ca^{2+} , etwa durch das Perfusionsystem oder aus den Zellen selber, wurden durch die Beigabe von EGTA (5 mM) zur Perfusionslösung komplexiert. Um die Gesamtsumme der divalenten Kationen konstant zu halten, betrug die $MgCl_2$ -Konzentration (statt standardmäßig 1,0 mM) 2,8 mM (vergl. Tabelle 5).

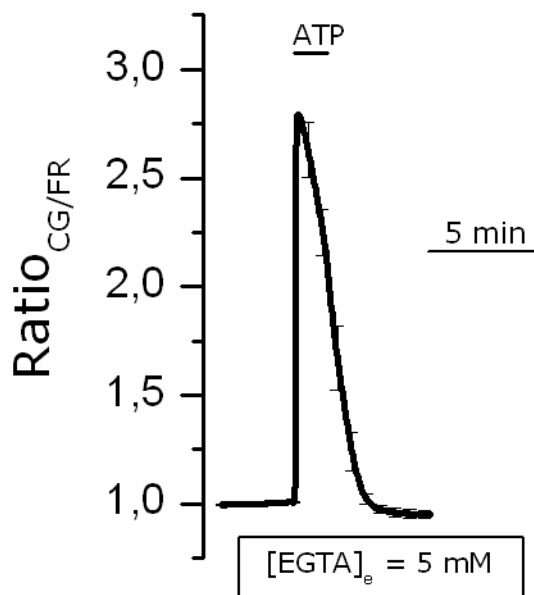


Abbildung 14: **Applikation von ATP in calciumfreier, EGTA-supplementierter Extrazellulärlösung.** Der Badlösung wurde kein Ca^{2+} zugesetzt und eventuell vorhandenes Ca^{2+} durch die Beigabe von EGTA (5 mM) komplexiert. Der Transient ist im Vergleich zu dem der Kontrollzellen deutlich verkürzt und $[Ca^{2+}]_i$ kehrt ohne Ausbildung einer Schulter direkt auf den Ausgangswert zurück. $n = 5, \pm \text{SEM}$

Die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ unterschied sich in calciumfreier Extrazellulärlösung in Dauer und Form sehr deutlich vom Kontrolltransienten in einer Badlösung mit physiologischer Ca^{2+} -Konzentration.

Während sich die maximale Amplitude des Transienten in normaler HBS-Badlösung nicht signifikant von dem Transienten in EGTA-gepufferter Ca^{2+} -freier Lösung unterschied, war der Transient bei fehlendem extrazellulärem Ca^{2+} deutlich verkürzt. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wert fiel ohne Ausbildung eines Plateaus stetig und direkt auf den Ruhewert ab. Eine Schulter, wie sie unter Standardbedingungen zu erkennen war, ließ sich weder in den einzelnen Aufzeichnungen noch in der Mittelung der Spuren erkennen. Nach 103,8 s ($\pm 6,9$ s) war $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder auf die Hälfte des Maximalwertes abgesunken, nach 156,6 s ($\pm 9,6$ s) betrug $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur noch 10% des Maximalwertes (entsprechend 33,9 % bzw. 8,5 % der Kontrolle, $p < 0,5 \cdot 10^{-4}$). Die AUC betrug in calciumfreier Extrazellulärlösung 175,1 ($\pm 18,4$) Einheiten. Dies entspricht 17,8 % des Kontrollwertes ($p < 0,5 \cdot 10^{-3}$).

3.5.2. Effekt von Calciumkanalblockern auf den ATP-induzierten Calciumtransienten

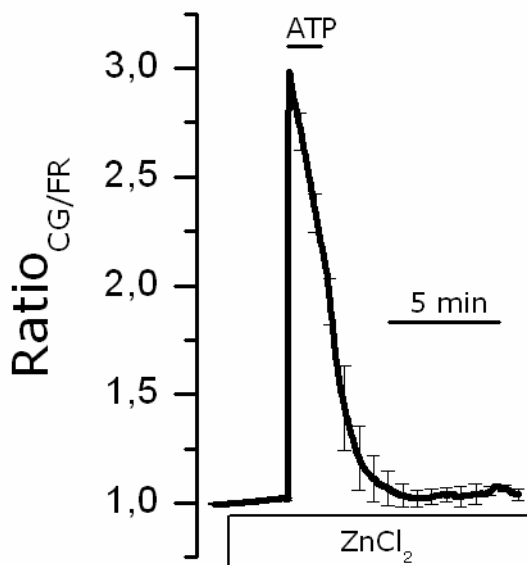


Abbildung 15: **Der Effekt von ATP in Anwesenheit von ZnCl_2 in der Badlösung bei physiologischer $[\text{Ca}^{2+}]_o$.** Der Transient gleicht in Verlauf und gemessenen Parametern dem Transienten in calciumfreier Badlösung. $n=4$, \pm SEM

Gore et al. zeigten 2004, dass Zinkchlorid (ZnCl_2) in physiologisch relevanten Konzentrationen in der Lage ist, den kapazitiven Calciumeinstrom in die Zelle zu blockieren (Gore et al. 2004). Für die vorliegende Arbeit wurden neben ZnCl_2 weitere Substanzen auf ihre Fähigkeit, den Calciumeinstrom zu blockieren, überprüft. Zu diesen Substanzen gehörten Econazole (Franzius et al. 1994), La^{3+} (Skryma et al. 2000), 2-APB (Braun et al. 2003), SKF 96365 (Merritt et al. 1990) und BTP2 (Zitt et al. 2004). In den von uns durchgeführten Versuchen

3.5. Die Bedeutung von Calciumströmen für die Form und Dauer des Transienten

zeigte sich jedoch, dass ZnCl_2 (Gore *et al.* 2004) die Substanz war, deren Effekte am besten zu reproduzieren waren.

Um zu untersuchen, ob es sich um ZnCl_2 -sensitive Kanäle handelt, über welche das Ca^{2+} vom extrazellulär in die Zelle strömt, wurde das Standardprotokoll wiederholt, nun jedoch wieder in Anwesenheit von Ca^{2+} (1.8 mM) und ZnCl_2 ($[\text{ZnCl}_2]_0 = 100 \mu\text{M}$). Abbildung 15 gibt den Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration wider. Vergleichbar mit dem Transienten, der in EGTA-gepufferter Extrazellulärlösung durch ATP induziert wurde, fiel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt und ohne die Ausbildung einer „Schulter“ auf das Ausgangsniveau ab.

In Anwesenheit von ZnCl_2 (100 μM) dauerte es $116,0 \text{ s} \pm 16,0$ (25,8 % des Kontrollwertes, $p < 0,5 \cdot 10^{-3}$), um auf die Hälfte des Maximalwertes zurückzufallen. Um auf 10 % des Maximalwertes abzufallen, dauerte es durchschnittlich $199,8 \text{ s} \pm 38,0$ (9,5 % des Kontrollwertes, $p < 0,1 \cdot 10^{-4}$). Die AUC maß in Anwesenheit von ZnCl_2 (100 μM) $219,6 \pm 27,5$ Einheiten (23,1 % des Kontrollwertes, $p < 0,005$). Die Amplitude des Calciumtransienten unterschied sich auf 0,05-Ebene wiederum nicht signifikant von denjenigen der Transienten unter Kontrollbedingungen bzw. ohne extrazelluläres Ca^{2+} ($2,99 \pm 0,1$ vs. 2,76 bzw. 2,80).

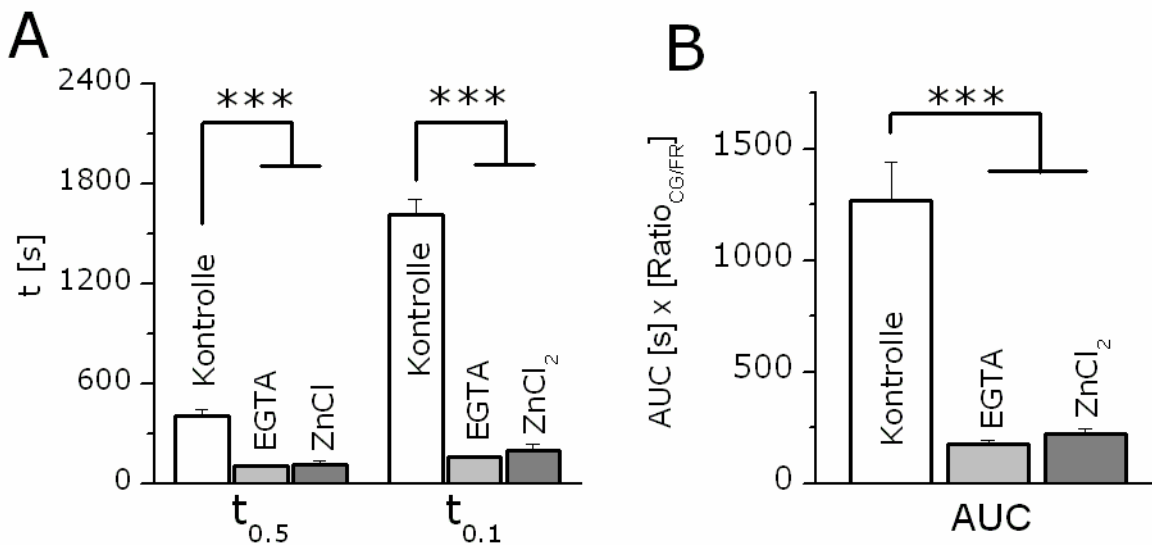


Abbildung 16: **Zusammenstellung der $t_{0,5}$, $t_{0,1}$ und AUC-Werte für die Kontrolle sowie die Transienten mit beeinträchtigtem Calciumfluss.** Um den zeitlichen Verlauf der Calciumtransienten zu beschreiben, wurden drei Kenngrößen gewählt. Die Einheit für die AUC ist das Produkt aus der Zeit und dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten, welcher auf die Baseline normiert wurde. Eine Ratio ist per se einheitenlos, daher ist die Einheit für die AUC in diesem Fall [s]. **(A)** In der Zusammenstellung der $t_{0,5}$ -Werte ist zu erkennen, dass die Halbwertszeiten der Zellen, in denen extrazelluläres Ca^{2+} durch EGTA komplexiert wurde (EGTA-Gruppe) und in Anwesenheit von ZnCl_2 (100 μM) (ZnCl_2 -Gruppe) nur etwas mehr als ein Viertel des Kontroll- $t_{0,5}$ -Wertes betragen. **(B)** Die AUC der EGTA- und der ZnCl_2 -Gruppe unterschieden sich nicht in signifikanter Weise, die AUC der Kontrolle maß dagegen den fast fünffachen Wert.

3.6. Der Effekt des hIK1-Kanals auf Dauer und Form des Calciumtransienten

3.6.1. Auswirkungen der verlängerten Inkubation mit 1-EBIO

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, wie sich die paradoxe Ausschaltung des hIK1 durch anhaltenden Gabe von 1-EBIO (vergl. Abschnitt 1.4.7) auf Amplitude und Dauer des Ca^{2+} -Transienten auswirkt. Dazu wurden die Zellen für die 24h vor dem Versuch mit 1-EBIO (1 mM) inkubiert. 1-EBIO lag als Stammlösung in 1 M Konzentration vor. In dem Inkubationsmedium resultierte eine DMSO-Konzentration von 0,1 %. In Experimenten, in denen dem Zellkulturmedium lediglich das Lösungsmittel zugesetzt war, ließ sich kein Unterschied zu den Kontrollmessungen erkennen (nicht abgebildet).

Direkt vor dem Versuch wurde das 1-EBIO-haltige Medium wie bei den Kontrollzellen ausgewechselt. Vom Zeitpunkt der Färbung an durchliefen die Zellen das gleichen Protokoll wie die Kontrollzellen: Nach einer Latenz von ca. 3 min wurden die Zellen für 90 s über das Y-Filament mit der ATP-Lösung perfundiert. Direkt im Anschluss an diese 90 s wurde die Perfusionslösung gegen die Badlösung ausgetauscht.

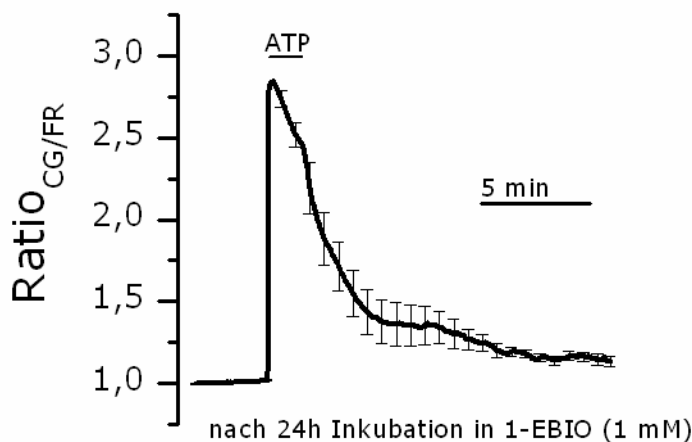


Abbildung 17: **Der ATP-induzierte Calciumtransient nach vorhergegangener Inkubation mit 1-EBIO.** Die Zellen für diese Versuchsreihe wurden für die 24 h vor dem Versuch in 1-EBIO (1 mM) inkubiert. Der ATP-induzierte Ca^{2+} -Transient war im Vergleich zum Transienten der Kontrollzellen deutlich verkürzt, die 1. Schulter nur gering ausgeprägt. $n = 9, \pm \text{SEM}$

Wiederum war der Maximalwert der Amplitude direkt nach dem initialen Aufstrich der Calciumkonzentration erreicht und wie bei allen anderen angewandten Protokollen nicht verschieden von der Kontrolle ($2,86 \pm 0,04$ vs. $2,76 \pm 0,16$, $p > 0,05$). Im Unterschied zu dem weiteren Verlauf des Transienten in den Zellen, welche in calciumfreier Extrazellulärlösung gemessen wurden, zeigte er eine weitere Schulter, welche sich jedoch im Vergleich

3.6. Der Effekt des hIK1-Kanals auf Dauer und Form des Calciumtransienten

zu den Kontrollbedingungen schmaler und spitzer zeichnete. Der weitere Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration war gekennzeichnet durch einen distinkten Bereich, in dem der Abfall in seiner Steilheit abrupt abnahm und die Calciumkonzentration deutlich langsamer auf den Ruhewert zurückkehrte. Die Zeit, in der die Calciumkonzentration auf den halbmaximalen Wert ($t_{0,5}$) zurückkehrte, betrug in diesen Zellen $188,2 \text{ s} \pm 37,0 \text{ s}$ (37,1 % des Kontrollwertes, $p < 0,005$). Der $t_{0,1}$ -Wert maß $450,8 \text{ s} \pm 84,4 \text{ s}$ und somit 25,9 % der Kontrolle ($p < 0,5 \cdot 10^{-4}$). Die von dem Calciumtransienten überstrichene Fläche (AUC) betrug 34,2 % des Kontrollwertes ($397,3 \pm 76,4$, $p < 0,5 \cdot 10^{-3}$).

3.6.2. Pharmakologischer Block des hIK1 mit TRAM-34

Um zu überprüfen, ob die in den zuvor beschriebenen Messungen veränderten Merkmale des ATP-induzierten Calciumtransienten auf ein Fehlen des hIK1 zurückzuführen ist, wurde die Applikation von ATP (30 μM) in Anwesenheit von TRAM-34 wiederholt. TRAM-34 ist sehr selektiv und besitzt hinsichtlich einer Blockade des hIK1 eine hohe Potenz (Wulff *et al.* 2000). Mit der Verwendung von TRAM-34 geht man den Nachteilen einer aufwändigen Handhabung eines Blockers wie Charybdotoxin (komplizierte Lagerung, unbekannte Interaktion des Proteins mit den Kunststoffschläuchen des Perfusionssystems) und den weiteren Effekten von Clotrimazol (Blockade des Cytochrom P450 und eventuell weiterer Ca^{2+} -Kanäle) aus dem Wege.

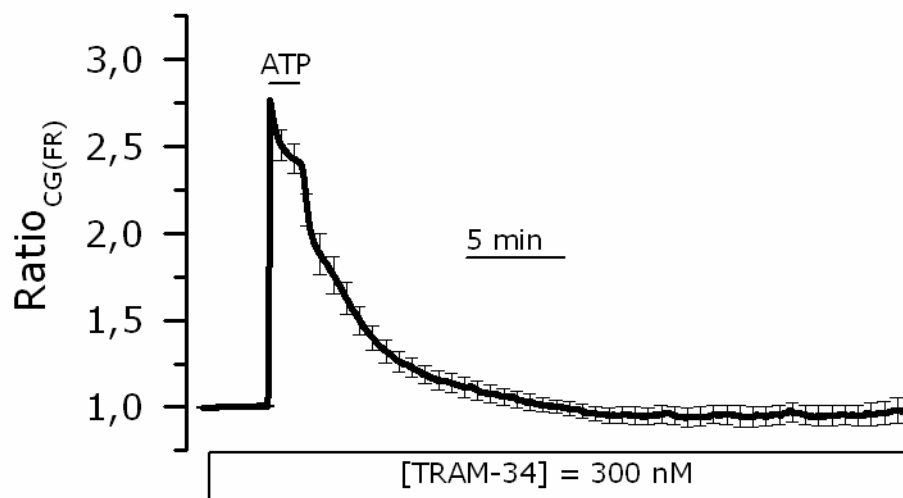


Abbildung 18: **Der Calciumtransient nach ATP-Applikation in Anwesenheit von TRAM-34 (300 nM).** Der ATP-induzierte Calciumtransient nahm unter der pharmakologischen Blockade des hIK1 einen andersförmigen Verlauf als in der Kontrollmessung. Um eine pharmakologische Blockade des hIK1 zu erreichen, wurden die HaCaT-Keratinocyten für die Dauer des Experimentes mit TRAM-34 (300 nM) perfundiert. $n = 7$, \pm SEM

Um den Effekt einer pharmakologischen Blockade des hIK1 zu überprüfen, wurde die Substanz in einer Konzentration von 300 nM etwa drei Minuten vor der ATP-Applikation der Perfusionslösung beigegeben. In keiner der

durchgeführten Messungen ließ sich allein durch diese Zugabe ein akuter Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration erkennen (Daten nicht gezeigt).

Der Maximalwert des Transienten wurde wiederum direkt mit dem ersten Aufstrich erreicht und unterschied sich auf 0,05-Ebene nicht signifikant von den gemessenen Werten der anderen Protokolle ($2,77 \pm 0,12$). Direkt nach Erreichen des Maximalwertes fiel die Calciumkonzentration wieder ab. Im weiteren Verlauf des Transienten wurde eine Schulter ausgebildet, welche allerdings im Vergleich zur der des Kontrolltransienten weniger stark ausgeprägt und ähnlich der Schulter des Transienten aus der 1-EBIO-Gruppe war. Vergleichbar mit den Zellen, welche für 24 h mit 1-EBIO inkubiert wurden, fiel die intrazelluläre Calciumkonzentration nun mit geringer werdender Geschwindigkeit stetig weiter ab. In $166,7 \text{ s} \pm 15,9 \text{ s}$ (38,2 % des Kontrollwertes) fiel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den halbmaximalen Wert ab, nach durchschnittlich $510,9 \pm 78,1 \text{ s}$ (34,4 % des Kontrollwertes, $p < 0,1 \cdot 10^{-4}$) betrug die intrazelluläre Calciumkonzentration nur noch 10 % des Maximalwertes. Die AUC des Transienten, welcher in Anwesenheit von TRAM-34 gemessen wurde, maß $373,8 \pm 52,3$ Einheiten. Dies entspricht 36,6 % derjenigen AUC, welche ohne Blockade des hIK1 gemessen wurde ($p < 0,5 \cdot 10^{-3}$).

3.6.3. Effekt einer Hyperpolarisation auf die transmembranalen Calciumströme

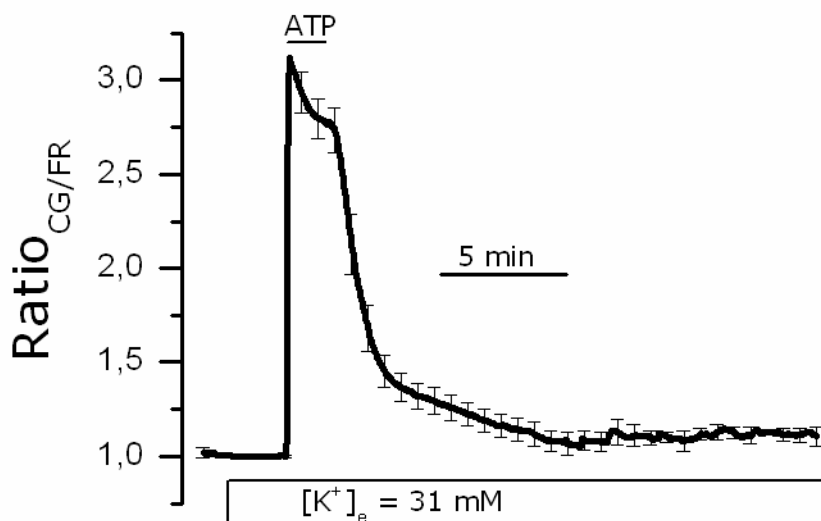


Abbildung 19: **Der ATP-induzierte Ca^{2+} -Transient bei einer $[\text{K}^+]_o = 31 \text{ mM}$.** Wurde die Zellmembran durch eine hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration auf -40 mV (entspricht dem Ruhemembranpotential) „geklemmt“, veränderte sich der Verlauf des Transienten in ebenso deutlicher Weise wie bei den Transienten in Anwesenheit von TRAM-34 oder nach Inkubation mit 1-EBIO. $n = 8, \pm \text{SEM}$

Es sind unterschiedliche Mechanismen denkbar, mit denen der calciumaktivierte Kaliumkanal die Calciumtransienten beeinflussen könnte. Um zu testen, ob es die Hyperpolarisation ist, die die typischen Form des Calciumtransienten so maßgebend bestimmt, wurde $[\text{K}^+]_o$ auf 31 mM angehoben. Gemäß der Nernst-Gleichung ergibt

3.6. Der Effekt des hIK1-Kanals auf Dauer und Form des Calciumtransienten

sich bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 31 mM und einer angenommenen intrazellulären Konzentration von 140 mM ein Gleichgewichtspotential von -40 mV als mittleres Ruhepotential. Sind das Kalium-Umkehrpotential und das Ruhemembranpotential identisch, führt eine Öffnung von Kaliumkanälen nicht zu einer Hyperpolarisation. Um die Osmolarität und die Kationenkonzentration konstant zu halten, wurde die NaCl-Konzentration bei diesen Versuchen von 118 mM auf 87 mM reduziert.

Wurde die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation, die sich normalerweise auf ca. 30 mV bemisst, durch diese K⁺-Klemme unterbunden, veränderte sich die Form des Calciumtransienten nach ATP-Stimulation wiederum in beträchtlicher Weise (vergl. Abbildung 19). Wie in allen anderen gemessenen Transienten wurde das Maximum direkt mit der ersten Flanke erreicht. Von allen Versuchsprotokollen erreichte der Calciumtransient bei einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration den größten Wert: $3,13 \pm 0,11$ ($p > 0,05$). Ähnlich den Transienten, welche unter pharmakologischer und funktioneller Blockade des hIK1 gemessen wurden, erreicht der weitere Verlauf der Calciumkonzentration nach einem kurzen Abfall etwa eine Minute nach Ende der ATP-Applikation eine Schulter, welche jedoch wiederum ein geringeres Ausmaß als in dem Kontrolltransienten zeigte. Nach dieser Schulter fiel die Calciumkonzentration stetig ab. Nach Erreichen eines distinkten Punktes (ca. 5 min) verlangsamte sich der Abfall deutlich, die Calciumkonzentration sank nun mit geringerer Rate auf das Ruhenniveau ab. Der halbmaximale Wert der intrazellulären Calciumkonzentration war nach 160,5 s ($\pm 10,0$ s) erreicht. Dies entsprach 35,6 % des Kontrollwertes ($p < 0,5 \cdot 10^{-5}$). Der $t_{0,1}$ -Wert betrug $(435,4 \pm 64,8)$ s, dies entsprach 31,0 % der Zeit, in welcher der Kontrolltransient um 90 % abgefallen war ($p < 0,5 \cdot 10^{-5}$). Die AUC maß mit durchschnittlich $400,3 \pm 46,0$ Einheiten 36,6 % des Kontrollwertes ($p < 0,1 \cdot 10^{-3}$).

3.6.4. Auswirkungen einer Hyperpolarisation ohne vorangehende Applikation von ATP

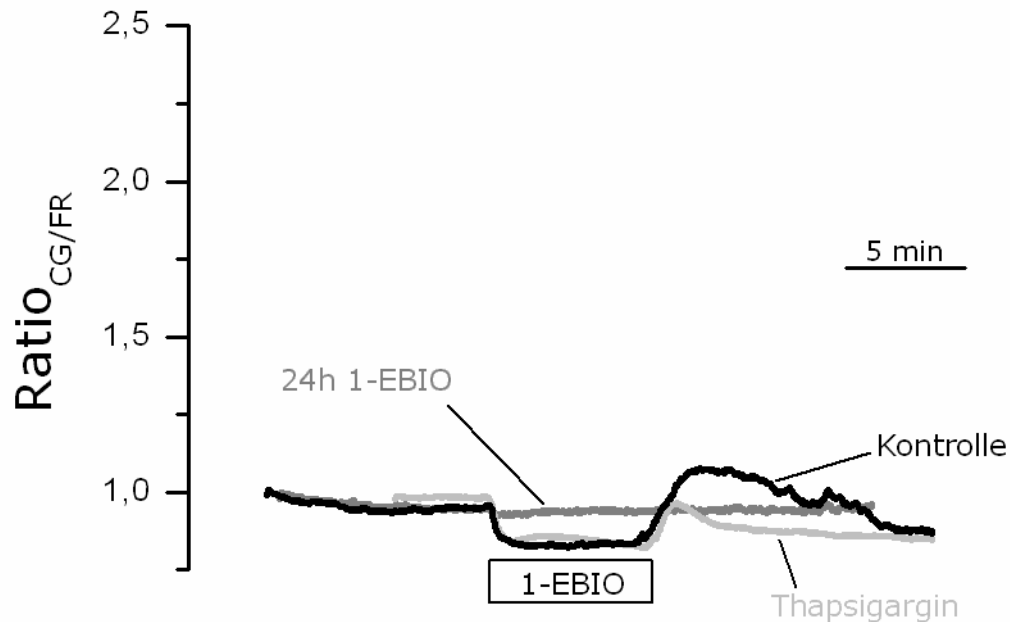


Abbildung 20: **Effekte der Hyperpolarisation durch 1-EBIO ohne vorhergehende Applikation von ATP.** Die Applikation des hIK1-Aktivators 1-EBIO (1 mM) führte in den Kontrollmessungen an unbehandelten HaCaT-Keratinocyten zu einem unmittelbaren Absinken der $[Ca^{2+}]_i$ auf ein geringfügig geringer liegendes Niveau. Nach dem Auswaschen der Substanz kehrte $[Ca^{2+}]_i$ nach einem kurzen Überschießen zurück auf das Ausgangsniveau. In Messungen an Zellen die zuvor mit Thapsigargin (150 nM) behandelt worden waren, ließ sich regelmäßig ein vergleichbarer Effekt beobachten. Für diese Messungen wurde abgewartet, bis $[Ca^{2+}]_i$ auf basale Werte zurückgekehrt war. Die akute Applikation von 1-EBIO auf Zellen, die für 24h vor dem Versuch mit eben dieser Substanz behandelt wurden, zeigte keinen nennenswerten Effekt.

Die Versuche im vorangegangenen Abschnitt zeigten den Effekt der Hyperpolarisation auf den ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten, den sie begleitet. Um zu testen, ob die Hyperpolarisation der Membran für sich bereits ebenfalls einen Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$ hat, wurden die Keratinocyten ohne vorherige Applikation von ATP mit 1-EBIO (1 mM) perfundiert. Von Koegel et al. wurde 2003 wiederum an HaCaT-Keratinocyten gezeigt, dass die Applikation des hIK1-Öffners zu einer Hyperpolarisation auf etwa -80 mV führt (vergl. Abbildung 4).

Direkt nach Beginn der Applikation von 1-EBIO (1 mM) sank die Fluoreszenzratio um etwa 10 % ab und verblieb nun für die Dauer der Perfusion stabil auf diesem Wert (vergl. Abbildung 20, „Kontrolle“). Sobald die Applikation von 1-EBIO beendet wurde, stieg die Fluoreszenzratio im Sinne einer überschießenden Reaktion auf

3.6. Der Effekt des hIK1-Kanals auf Dauer und Form des Calciumtransienten

Werte an, welche über dem Ausgangsniveau lagen, um dann im Verlauf von einigen Minuten auf das basale Niveau zurückzukehren.

Um zu testen, ob der Effekt auf eine Aktivierung von hIK1-Kanälen und die Verschiebung der Membranspannung zu negativeren Werten zurückzuführen ist, wurde der Versuch an Zellen wiederholt, die zuvor für 24h in 1-EBIO inkubiert wurden. Koegel et al. zeigten, dass die akute Anwendung von 1-EBIO bei diesen Zellen – anders als in den Kontrollzellen – keinen Effekt auf das Membranpotential hat (vergl. Abbildung 3; Koegel *et al.* 2003). Die typische Reaktion auf die akute Anwendung von 1-EBIO – das Absinken von $[Ca^{2+}]_i$, und die charakteristische Rückkehr auf den Basalwert – ließ sich an Zellen mit herunter regulierten hIK1 nicht mehr beobachten (vergl. Abbildung 20 „24 h 1-EBIO“).

Um ferner auszuschließen, dass das Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ auf Prozesse zurückzuführen ist, welche in Zusammenhang mit dem Endoplasmatischen Retikulum und seinem Füllungszustand stehen, wurden in einem weiteren Experiment die Zellen Minuten vor der Applikation von 1-EBIO mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin blockiert wirkungsvoll die „Smooth Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase“ (SERCA), eine Ca^{2+} -Pumpe, welche beständig Ca^{2+} aus dem Zytosol in das ER transportiert (Lytton *et al.* 1991; Tu *et al.* 2005). Wird die SERCA mit Thapsigargin (150 nM) blockiert, dann entleert sich das ER passiv in das Zytosol: $[Ca^{2+}]_i$ steigt vorübergehend an und vorhandene SOC-Kanäle werden aktiviert (vergl. Abschnitt 1.3.2). Befindet sich die Zelle in einer Badlösung mit physiologischer $[Ca^{2+}]_o$, steigt $[Ca^{2+}]_i$ durch den aktivierten I_{CRAC} stark an (Csernoch *et al.* 2000). Bei calciumfreier Badlösung kehrt $[Ca^{2+}]_i$ jedoch innerhalb weniger Minuten wieder auf basale Werte zurück (eigene Daten, Messung nicht gezeigt). Für die Applikation von 1-EBIO wurde erwartet, bis $[Ca^{2+}]_i$ in calciumfreier Badlösung wieder auf basale Werte zurückgekehrt war. Nun bei depletiertem ER angewendet, entfaltete 1-EBIO eine vergleichbare Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ wie in den Kontrollzellen. Zunächst erfolgte mit Beginn der Applikation ein leichter Abfall von $[Ca^{2+}]_i$. Mit dem Auswaschen des 1-EBIO kam es nach einer leicht überschießenden Reaktion an die Angleichung der Fluoreszenzratio an das Ruhenniveau.

3.7. Die Amplituden der Calciumtransienten unter verschiedenen Versuchsprotokollen

Die Ratio errechnet sich jeweils aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von CG-1 und FR. Die Fluoreszenzintensitäten und deren Verrechnung zur Ratio bilden lediglich ein relatives Maß für die Calciumkonzentration, sie zeigen keinen absoluten Wert an. Um die Verläufe der Transienten miteinander vergleichbar zu machen, wurden die Transienten durch die Division jedes Wertes einer Zeitserie durch das arithmetische Mittel der Baselinequotienten normiert (vergl. Abschnitt 2.5). Der Maximalwert eines Transienten ist daher als das Vielfache eines Quotienten bezogen auf den Ruhewert zu verstehen.

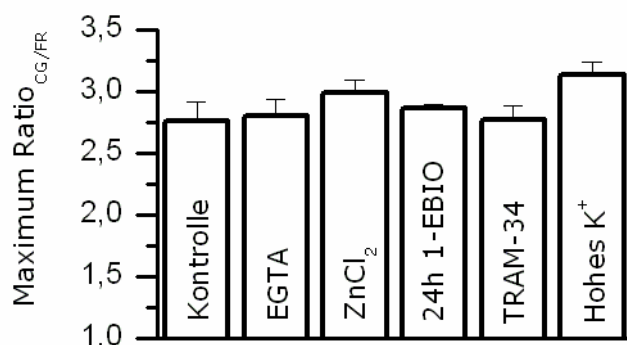


Abbildung 21: **Maxima der Calciumtransienten.** Die Maxima der Transienten aus den unterschiedlichen Gruppen unterscheiden sich auf 0,05-Ebene nicht signifikant voneinander.

In der Zusammenstellung der Amplituden in Abbildung 21 wird deutlich, dass es bezüglich der Amplitude des Transienten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Protokollen gab. Unabhängig von den Bedingungen wurde der Maximalwert direkt mit der ersten Flanke erreicht. Direkt nach diesem Wert fiel die Calciumkonzentration zunächst wieder rasch ab. Die im Durchschnitt größte Amplitude erreichten die Zellen, deren Membran

durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration auf den Ruhewert bei -40 mV geklemmt wurden ($3,13 \pm 0,11$). Die geringste Amplitude wurde in den Kontrollzellen gemessen. Diese Zellen erreichten einen durchschnittlichen Ratiometriewert von $2,76 \pm 0,16$ und liegen 12,02 % unter dem Maximalwert der „Hohes K⁺“-Gruppe. Die Maxima unterscheiden sich auf 0,05-Ebene nicht signifikant voneinander.

Tabelle 6: Synopsis der gemessenen Werte

<i>Gruppe</i>	<i>t_{0,5} ± SEM</i>	<i>%</i>	<i>t_{0,1} ± SEM</i>	<i>%</i>	<i>AUC ± SEM</i>	<i>%</i>	<i>n</i>
Kontrolle	408,5 ± 27,6	100,0	1611,3 ± 93,5	100,0	1268,8 ± 170,1	100,0	6
TRAM-34	166,7 ± 15,9	38,2	510,9 ± 78,1	34,4	373,8 ± 52,3	36,6	7
Hohes [K ⁺] _o	160,0 ± 10,0	35,6	435,4 ± 64,8	31,0	400,3 ± 46,0	41,3	8
1-EBIO	188,2 ± 37,0	37,1	450,8 ± 84,4	25,9	397,3 ± 76,4	34,2	9
ZnCl ₂	116,0 ± 16,0	25,8	199,8 ± 38,0	9,5	219,6 ± 27,5	23,1	4
EGTA	103,8 ± 6,9	33,9	156,6 ± 9,6	8,5	175,1 ± 18,4	17,8	5

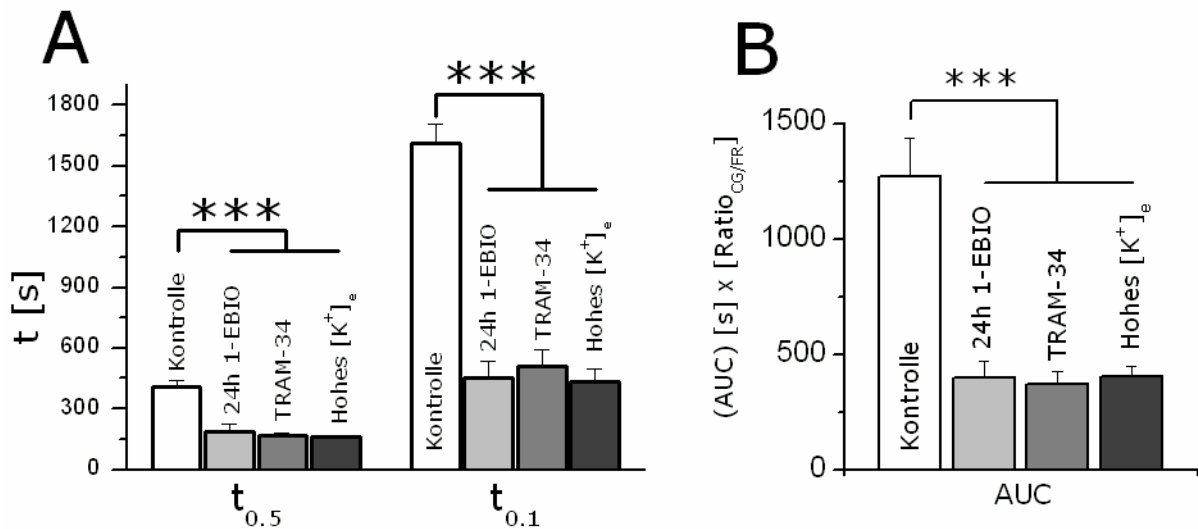


Abbildung 22: **Übersicht über die $t_{0.5}$, $t_{0.1}$ - und AUC-Werte der Zellen mit beeinträchtigten Kaliumflüssen.** (A) Wiederum wurden die Kennwerte $t_{0.5}$ und $t_{0.1}$ für die $[Ca^{2+}]_o$ -Verläufe ermittelt. In der Übersicht wurden die Zeitkonstanten der Calciumtransienten aus jenen Versuchsreihen zusammengestellt, in denen die Funktion des hIK1 beeinträchtigt wurde. Der $t_{0.5}$ -Wert der Kontrolle war jedoch 2,2-2,5fach größer als die $t_{0.5}$ -Werte der Zellen, in welchen die Funktion des hIK1-Kanals gehemmt wurde. Der $t_{0.1}$ -Wert der Kontrolle war 3,2 bis 3,7-fach größer als die Werte aus den anderen drei Gruppen. Die $t_{0.1}$ -Werte aus der 24h-1-EBIO-Gruppe, der TRAM-34- und der Hohes $[K^+]_e$ -Gruppe unterschieden sich wieder nicht signifikant voneinander. (B) Der Wert für die AUC beschreibt die Fläche, die der Calciumtransient überstreicht vom Beginn der ATP-Applikation bis zu dem Zeitpunkt, zu dem $[Ca^{2+}]_i$ nur noch 10 % des Maximalwertes beträgt. Wie bei den $t_{0.5}$ - und $t_{0.1}$ -Werten unterschieden sich die Gruppen, in welchen der hIK1-Kanal beeinträchtigt wurde, auf 0,05-Ebene nicht in signifikanter Weise voneinander. Der höchste Wert aus dieser Gruppe (Hohes $[K^+]_e$) war 8,4 % größer als der kleinste (TRAM-34). Die AUC-Werte der Kontrollmessung waren 3,1 bis 3,4-fach größer als in den Gruppen, in welchen in Kaliumströme eingegriffen wurde (\pm SEM, für n vergl. Tabelle 6).

4. Diskussion

4.1. Allgemeines

Nicht nur aus klinischer Sicht erscheint es wichtig, die Prozesse zu verstehen, welche so zentralen biologischen Vorgängen wie Proliferation und Differenzierung zugrunde liegen, in der Haut wie auch in anderen Geweben.

Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente war es, zu ermitteln, auf welche Weise der calciumaktivierte Kaliumkanal hIK1 auf die Calciumhomöostase der Hautzelle einwirkt.

Hierbei galt besonderes Interesse der Frage, welchen Effekt die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation auf die Form und Dauer des ATP-induzierten Calciumtransienten hat. Der Fragestellung liegt die Beobachtung zugrunde, dass HaCaT-Keratinocyten, sobald sie nicht mehr über den Kaliumkanal hIK1 verfügen, eine erheblich verminderte Proliferationsrate und ein nunmehr eingeschränktes Differenzierungsvermögen besitzen (Koegel *et al.* 2003). Das Fehlen des hIK1-Kanals manifestierte sich in den untersuchten Zellen in einem Ausbleiben der Hyperpolarisation bei ATP-Applikation, sobald dieser blockiert oder herunter reguliert war (vergl. Abschnitt 1.4.7).

Dass Kaliumströme eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung der Hautzellen spielen, zeigte sich bereits vor vielen Jahren in den Befunden von Hennings *et al.* (1980), nach denen eine ausreichend hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration notwendig ist, um eine intakte Permeabilitätsbarriere der Haut zu gewährleisten (Hennings *et al.* 1980). Die Arbeitsgruppe um Lee zeigte zudem, dass Kaliumflüsse unbedingt notwendig sind und eine hohe $[K^+]_o$ ungünstig für Reparaturvorgänge in der Haut ist (Lee *et al.* 1994). Passend hierzu finden sich Befunde, denen zufolge die Blockade von Calcium- und Kaliumkanälen mit Verapamil bzw. Charybdotoxin die Proliferation von kultivierten Hautzellen hemmen (Mauro *et al.* 1997).

Insgesamt deutet eine Summe von Befunden aus der Literatur darauf hin, dass für eine intakte Funktion von Keratinocyten zum einen also eine ausreichend hohe $[Ca^{2+}]_o$ eine notwendige Bedingung ist, zum anderen aber auch Kaliumströme von intra- nach extrazellulär eine weitere Prämisse darstellen (Hennings *et al.* 1983b; Lee *et al.* 1994; Mauro *et al.* 1997). Möglicherweise stellt der hIK1-Kanal und die Art und Weise seiner Aktivierung die Erklärung für die Bedeutung der intra- und extrazellulären Kaliumkonzentrationen dar.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. Validität der Methode

Für diesen Zweck wurde in einem ersten Set von Experimenten untersucht, ob die verwendete Methode – konfokale Laser-Scan-Mikroskopie in Kombination mit den calciumsensitiven Farbstoffen Calcium Green-1 und Fura Red – für diese Fragestellung valide Ergebnisse ermöglicht.

CG-1 und FR sind calciumsensitive Farbstoffe, welche als Ester in der Lage sind, die Zellmembran zu permeieren. Im Zytosol sind es überwiegend unspezifische Esterasen, welche die Fluoreszenzmoleküle entestern. Diese sind nun im Zellinneren „gefangen“.

Untersucht man diesen Vorgang kritisch, muss erörtert werden, ob und wie sich die Farbstoffe im Zellinneren verteilen. Wenn die Farbstoffe lipophil genug für das Plasmalemm sind, sollten sie selbstverständlich auch in der Lage sein, weitere – „tiefer“ gelegene – Kompartimente zu erreichen. Wenn die Esteraseaktivität in den Mitochondrien oder im Karyoplasma größer wäre als im Zytosol, dann wäre das beobachtete Fluoreszenzsignal eher ein Maß für die Calciumkonzentration in diesen Kompartimenten. Für verschiedene weitere Fragestellungen wäre es durchaus interessant, den Verlauf der Calciumkonzentration getrennt nach intrazellulären Kompartimenten zu verfolgen. Dies scheitert jedoch an der zu geringen räumlichen Auflösung des verwendeten LSM-Systems. In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Aktivität der zytosolischen Esterasen so groß ist, dass lediglich ein geringer Teil des Farbstoffes diesen Enzymen entgeht und in weitere Kompartimente diffundieren kann. Würde man annehmen, dass es sich um einen wesentlichen Teil des Farbstoffes handelt, welcher in „tiefergelegene“ Kompartimente diffundiert, dann wäre gleichzeitig festzuhalten, dass es sich in diesem Kompartiment um das gleiche Konzentrationsverhältnis CG-1 / FR handeln dürfte, wie es im Zytosol zu finden ist. Insofern entstünde wenigstens kein systematischer Fehler bei der Bestimmung der Ratio.

Weil in der Auswertung jeweils die Fluoreszenzratio für eine ganze Zelle kalkuliert wurde, spiegelt der Ratiometriewert das arithmetische Mittel über alle erfassten Kompartimente wider. In den unternommenen Experimenten wurde der Zellkern regelmäßig sehr deutlich dargestellt und hob sich durch eine höhere Fluoreszenzintensität vom Zytosol ab. Wird der Umstand berücksichtigt, dass der virtuelle Schnitt durch die Zelle eine Dicke von 10 µm besitzt, dann kann davon ausgegangen werden, dass ein wesentlicher Teil der detektierten Fluoreszenz aus dem Zellkern stammt. In Linescan-Untersuchungen unterschied sich der Quotient aus den beiden Fluoreszenzintensitäten nicht zwischen Zellkern und Zytoplasma (Messungen nicht gezeigt). Andere Kompartimente, z.B. das ER, der Golgi-Apparat oder die Mitochondrien, welche man an den typischen Lokalisationen suchen würde (perinukleär bzw. subplasmalemmal), ließen sich auch in der größten Auflösung nicht fluorometrisch darstellen.

4.2.2. Ausbleicheffekt

Bei der Aufzeichnung langer Zeitserien, wie sie in den dargestellten Experimenten angewandt wurde, kommt es auch bei einer geringen Laserleistung zum Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe.

Dieser Umstand limitiert zum einen die Anzahl der Einzelbilder, die mit dem LSM registriert werden können, ohne dass es zu einem zu schwachen Lichtsignal kommt. Zum anderen stellt die Verrechnung der Fluoreszenzintensitäten zur Ratio besondere Anforderungen an die Ausbleichcharakteristika der Farbstoffmoleküle. Wiesen die Farbstoffe unterschiedliche Halbwertszeiten in ihrer Fluoreszenz auf, würde der Quotient aus den Intensitäten über die Zeit eine Veränderung im Offset erfahren, ohne dass ein Anstieg oder Abfall der Calciumkonzentration eingetreten wäre.

Der Kontrolltransient braucht im arithmetischen Mittel mehr als 25 min, um wieder auf Werte nahe des Ausgangsniveaus zu kommen (vergl. Abschnitt 3.2). Werden noch weitere zehn bis fünfzehn Minuten hinzuzugediert, um zunächst das Ruhelevel zu bestimmen und das Ende des Transienten abzuwarten, dann muss das System in der Lage sein, über 40 min valide Werte zu messen.

Um nachzuweisen, dass CG-1 und FR den aufgeführten Anforderungen genügen, wurden Kontrollaufnahmen angefertigt, in welchen keine Applikation von ATP oder anderen Substanzen vorgenommen wurde (vergl. Abschnitt 3.1). In den Experimenten mit Gabe von ATP oder anderen Substanzen war zuvor deutlich geworden, dass die Ratio in den Kontrollmessungen auf fast ein vierfaches ansteigen kann. Registriert man die Fluoreszenzen, passt den Verlauf an eine adäquate Funktion an und errechnet aus diesen Funktionen den Quotienten, so weicht diese Ratio um wenige Prozent vom Ausgangswert ab. Damit liegt dieser systematische Fehler in einer Größenordnung, welche so gering ist, dass der Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ hinreichend genau dargestellt wird, ohne dass durch weitere Verrechnungen – etwa eine Korrektur mittels einer linearen Funktion – eingegriffen werden müsste.

4.2.3. Verwendung relativer Maße

Die in den vorgestellten Experimenten verwendete Methode liefert lediglich ein relatives Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration.

Auch bei der Verwendung von CG-1 und FR ist es möglich, statt einer relativen Maßzahl absolute Werte zu ermitteln. Hierfür wäre es jedoch für jedes FluoroDish® notwendig, im Anschluss an die Zeitserie mit Hilfe einer Calciumionophore (z.B. Ionomycin) und einer Anzahl an unterschiedlich konzentrierten Calciumlösungen eine Normkurve zu erstellen.

Berücksichtigt man in diesem Zusammenhang den Umstand, dass es bei der Fragestellung dieser Arbeit nicht um absolute Calciumkonzentrationen ging, sondern um die Art des Einflusses des hK1-Kanals auf Form und Dauer der Calciumtransienten, dann erscheint es gerechtfertigt, dass sich die vorliegende Arbeit auf ein relatives Maß der Calciumkonzentration beschränkt. Die Verwendung relativer und normierter Verlaufskurven ist auch in der jüngeren Literatur anerkannt (Koegel *et al.* 2003). Die Kenntnis der absoluten Werte für $[Ca^{2+}]_o$ hätte – bei erheblich höherem Aufwand an Zeit und Kosten – keinen relevanten Vorteil geboten, zumal der Bereich, in welchem sich $[Ca^{2+}]_i$ bewegt, bekannt ist (Bootman und Berridge 1995; Csernoch *et al.* 2000; Koegel *et al.* 2003; Mauro *et al.* 1997; Pillai und Bikle 1992). In Ruhe handelt es sich um Werte für $[Ca^{2+}]_i$ von 100 nM (60 nM bei Csernoch *et al.*, 200 nM bei Mauro *et al.*). Bei Aktivierung, z.B. durch Entspeicherung des ER nach Applikation von Thapsigargin oder durch das Hinzufügen von ATP zur Perfusionslösung, kann $[Ca^{2+}]_i$ Werte in der Größenordnung von einigen μ M annehmen (Bootman und Berridge 1995) (jedoch nur 0,35 μ M bei Csernoch *et al.*, etwa 0,8 μ M bei Mauro *et al.*).

Es ist sicherlich davon auszugehen, dass auch bei standardisierten Bedingungen die Farbstoffkonzentration in den Zellen nicht in jedem Fall identisch ist. Ist jedoch das Verhältnis der Konzentrationen von CG-1 und FR zueinander in engeren Grenzen konstant, dann lässt sich durch die Normierung auf den Durchschnittswert des Ruhenniveaus dieser systematische Fehler vernachlässigen (vergl. Abschnitt 2.5).

Das verwendete Laser-Scan-Mikroskop LSM 510 war durch den Hersteller umfangreich ausgestattet mit unterschiedlichen Laserlinien und einer größeren Anzahl an Band- und Hochpassfiltern. Mit dem Einsatz der beiden Fluoreszenzfarbstoffe CG1 und FR konnte in Verbindung mit den vorgenommenen Einstellungen an Filtern und Farbteilern der Verlauf von $[Ca^{2+}]_i$ sorgfältig dokumentiert werden. Die Trennung in die Bänder für CG-1 (505 nm - 545 nm) und FR (> 660 nm) erfolgte so, dass jeweils nur ein geringer Teil der detektierten Fluoreszenz im jeweils anderen Band detektiert wurde.

4.2.4. Die Farbstoffe als Störgröße

Bei dem Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen zur Messung intrazellulärer Parameter wie pH oder Ionenkonzentrationen ist zu berücksichtigen, dass diese Substanzen ihrerseits ebenfalls als Puffer wirken. Sie greifen mit dieser Eigenschaft in einen Prozess ein, zu dessen Messung bzw. Beschreibung sie eingesetzt sind. Es bleibt zu beantworten, in welchem Maße die Beladung des Zytosols mit den artefiziellen Puffern selber die Zellbiologie beeinflusst und die Farbstoffe in das Calciumsignaling eingreifen. In der Färbelösung betragen die Farbstoffkonzentrationen 6 μ M für CG1 bzw. 7 μ M für FR (vergl. Abschnitt 2.3.4). Im Vergleich zu den Pufferkapazitäten, welche sich nach Literaturangaben im Zytosol finden, dürften diese Konzentrationen im eher geringen Bereich liegen. Zellen einer subkonfluenten Kultur, welche im üblichen Protokoll mit den Farbstoffen beladen wurden, waren weiterhin in der Lage, etwa in vergleichbarem Ausmaß wie unbeladene Zellen zu proliferieren (eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt).

4.3. Dosiswirkungskurve

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass sich der ATP-induzierte Calciumtransient in verschiedenen Parametern dosisabhängig verändert. Um zu prüfen, ob – und falls ja, auf welche Weise – sich der Calciumtransient mit aufsteigender ATP-Konzentration verändert, wurde unter Standardbedingungen ATP in Konzentrationen von 1 nM bis 100 μ M appliziert. In den aufgezeichneten Konzentrationsverläufen wurde deutlich, dass es sich bei der untersuchten Reaktion der Zelle um einen Prozess handelt, welcher zunächst eine bestimmte Mindestdosis benötigt, um überhaupt zu entstehen. Ist diese Mindestdosis erreicht, dann verändert sich mit ansteigender ATP-Konzentration die Amplitude, die Dauer und die AUC des Calciumtransienten in typischer Weise (vergl. Abbildungen 10, 12, 11). Der Effekt scheint einen Maximalwert aufzuweisen: Bei einer Dosis von 100 μ M vergrößert sich die Amplitude nicht weiter, auch die Dauer des Transienten ändert sich nicht mehr. Pillai et al. notieren für primäre Keratinozyten („human natural keratinocytes“), dass Konzentrationen über 100 μ M toxisch wirken (Pillai und Bikle 1992).

Die ATP-Transienten wurden unter verschiedenen Aspekten untersucht und ausgewertet. Gemessene Parameter waren $t_{0,5}$, $t_{0,1}$, die Amplitude und die „Area under the curve“. Die herausragende Bedeutung von Calciumsignalen in der Zellbiologie ist unumstritten (Berridge *et al.* 1999; Berridge *et al.* 2000; Bootman und Berridge 1995; Clapham 2007). Dagegen ist es Gegenstand aktueller Forschung, welche biologische Relevanz den einzelnen Parametern des Transienten zukommt. Die Arbeitsgruppe um Pillai ermittelte 1992 eine Beziehung zwischen applizierter ATP-Dosis und resultierendem $[Ca^{2+}]_i$ (Pillai und Bikle 1992). Es handelte sich bei den von Pillai et al. verwendeten Zellen – anders als in dieser Arbeit – um primäre Keratinozyten. Jedoch vergleichbar zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen, schien es sich bei geringen Dosen um eine Alles-oder-nichts-Antwort zu handeln. Die von Pillai et al. ermittelten Mindestdosen lagen in einer Größenordnung mit den Untersuchungsergebnissen aus dieser Arbeit (100 nM). Der halbmaximale Wert lag jedoch mit etwa 10 μ M um zwei Größenordnungen über den von uns an HaCaT-Zellen gemessenen Werten (vergl. Abbildung 11). Der Grund für diese Differenz mag zum einen an den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen liegen (Pillai et al. verwendeten Indo-1 AM). Zum anderen ist es möglich, dass die Differenz in der Verschiedenheit der Zellkulturen begründet ist. Stellt man $[Ca^{2+}]_i$ in Zusammenhang mit der ATP-Dosis, ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der Bindung des ATP an seinen Rezeptor bis zum Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ um eine ganze Kaskade von Reaktionen handelt (Csernoch *et al.* 2000; Tu *et al.* 2005). Pillai et al. vermuten, dass der Purinozeptor das limitierende Element in dieser Kaskade darstellt und dass die Dosis für den halbmaximalen Effekt im wesentlichen durch den Anteil der besetzten Rezeptoren bestimmt wird (Pillai und Bikle 1992). Koegel et al. zeigten, dass sich die Anzahl der P2Y2-Rezeptoren mit dem Differenzierungsgrad ändert. Trifft die Annahme von Pillai et al. zu, dann erscheint es plausibel, dass bei der Amplitude ebenfalls das Ausmaß der Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (Koegel *et al.* 2003). Der Umstand, dass die vorliegenden Untersuchungen an subkonfluenten HaCaT-Kulturen mit einer hohen

4.3. Dosiswirkungskurve

Proliferationsrate vorgenommen wurden, mag zusätzlich den um eine Größenordnung geringeren EC_{50} -Wert erklären.

Calciumtransienten besitzen eine Anzahl von Merkmalen wie Dauer, Frequenz, räumliche Verteilung sowie An- und Abstiegsgeschwindigkeit. Es bleibt fraglich, ob es sich bei der Calciumkonzentration um die bestimmende Komponente handelt, wenn es um die Steuerung von zellulären Prozessen geht. Es stimmen die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse mit den Daten von Pillai *et al.* überein, dass es sich bei dem Ca^{2+} -Transienten nach einem ATP-Stimulus zumindest in geringen Dosen um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt. Folgt die Amplitude wenigstens bei geringen ATP-Konzentrationen einer Alles-oder-Nichts-Charakteristik, dann ist anzunehmen, dass lediglich ein eher geringer Teil der Information eines Ca^{2+} -Transienten über die Amplitude kodiert wird. Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, sich bei der Auswertung der Calciumsignale nicht auf den Maximalwert der Calciumkonzentration zu beschränken.

In der Pharmakologie wird zur Beschreibung einer Pharmakokinetik die AUC angegeben (Lüllmann *et al.* 2006). Die AUC ist das Resultat aller Prozesse, welche an der Erhöhung bzw. Elimination von Wirkstoffen aus einem Kompartiment beteiligt sind. Sie ist ein deskriptiver Wert, welcher auch ohne detaillierte Kenntnis aller teilhabenden Prozesse zu messen bzw. zu errechnen ist.

Freilich ist nicht erwiesen, welche biologische Bedeutung die AUC im Rahmen des Calciumsignaling hat. Im Gegensatz zur maximalen Calciumkonzentration erfasst sie als zusätzliche Komponente die Zeit, über welche eine Calciumkonzentration in der Zelle herrscht. Ebenso wie Konzentration und Dauer des Transienten mag ebenfalls die Frequenz von Bedeutung für zelluläre Prozesse sein. Die Frequenz lässt sich jedoch nur schwierig – zumindest bei geringen Werten – mit den hier verfügbaren Mitteln hinreichend genau erfassen.

Die Berechnung der AUC trägt der Beobachtung Rechnung, nach welcher im weiteren Verlauf des Transienten gelegentlich Calciumoszillationen auftreten, welche sich ihm mit unregelmäßiger Frequenz und Amplitude auflagern. Die meisten der messbaren Parameter dieser Oszillationen (Frequenz, Dauer) berücksichtigt auch die Berechnung der AUC nicht. Jedoch findet in der AUC zumindest das Ausmaß der Oszillationen Berücksichtigung.

4.4. Extrazelluläres Ca^{2+} und sein Effekt auf die Form des Transienten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Effekt extrazelluläres Ca^{2+} auf den Calciumtransienten hat und welche Kanäle diesen Influx vermitteln.

Es ist in der Literatur anerkannt, dass der initiale Stimulus für den Calciumtransienten das ATP ist, welches an einen P2Y2-Rezeptor bindet und in der Folge über die Aktivierung einer Phospholipase C zur Generierung von

DAG und InsP₃ führt (Dixon *et al.* 1999; Greig *et al.* 2003; Tu *et al.* 2005). Das InsP₃ wiederum aktiviert den InsP₃-Rezeptor und setzt große Mengen an Ca²⁺ aus dem ER frei. Das Leeren der intrazellulären Calciumspeicher aktiviert den I_{CRAC}, wodurch Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum einströmen kann. Der Mechanismus, welcher zur Aktivierung des I_{CRAC} führt, ist erst seit kurzem bekannt. Es handelt sich um einen löslichen Faktor STIM1, welcher eine geringe [Ca²⁺]_{ER} registriert und über iPLA2β dann den Calciumeinwärtsstrom aktiviert (vergl. Abschnitt 1.3.2). In einer Reihe von Experimenten habe ich untersucht, welchen Einfluss der Calciumeinstrom von extrazellulär auf die Form des Transienten hat und welche Blocker in der Lage sind, diesen Strom zu unterbinden.

Ist extrazellulär kein Ca²⁺ vorhanden, verändert sich der Transient im Vergleich zu den Standardbedingungen in charakteristischer Weise: Der Abfall der [Ca²⁺]_i erfolgt rasch ($t_{0,5} = 156$ s), $t_{0,1}$ ist zehn mal schneller erreicht als bei [Ca²⁺]_i = 1,8 mM. Da bei einer EGTA-Konzentration von 5 mM in der Badlösung sämtliches extrazelluläres Ca²⁺ komplexiert wird, besteht zu jedem Zeitpunkt ein Gradient von intra- nach extrazellulär.

Für die starke Verlängerung des Transienten bei physiologischer [Ca²⁺]_o kommen im wesentlichen zwei Gründe in Frage: auf der einen Seite kann es zu einem Netto-Einstrom in die Zelle kommen, welcher die Clearing-Kapazitäten der Zelle übersteigt und [Ca²⁺]_i über einen längeren Zeitraum bei hohen Werten lässt. Auf der anderen Seite kann der lange Transient auch in dem großen Gradienten begründet sein, gegen welchen am Clearingprozess beteiligte Calciumpumpen im Plasmalemm anpumpen müssen. Der Energiebedarf dürfte hier – unabhängig davon, ob es sich um einen primär oder sekundär aktiven Transport handelt – beträchtlich sein. Es lässt sich mit den durchgeführten Experimenten nicht auszuschließen, dass auch das aufwändige Anpumpen gegen den Gradienten eine Rolle spielt.

Es sprechen jedoch mehrere Gründe dafür, dass es sich um einen Netto-Einstrom von Ca²⁺ handelt, welcher für den verlängerten Transienten sorgt. Ein wesentlicher Teil des Calciums wird nicht über das Plasmalemm nach extrazellulär transportiert, sondern in die intrazellulären Speicher aufgenommen, namentlich in das Endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien (Glitsch *et al.* 2002). Bei den Transporten von Ca²⁺ über innerzelluläre Membranen mag der Calciumgradient über das Plasmalemm keine Rolle spielen. Wird ATP gleichzeitig mit Thapsigargin, einem Blocker der SERCA, appliziert, zeigt sich, dass bei physiologischer [Ca²⁺]_o die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nach dem initialen Anstieg nur unwesentlich abfällt (eigene Beobachtung, Messung nicht gezeigt). Diese plateauartige Erhöhung von [Ca²⁺]_i mag darin begründet sein, dass die SERCA, welche unter Aufwand von ATP Ca²⁺ in das ER pumpt, blockiert ist und das depletierte ER einen Calciumeinstrom vermittelt, mit welchem die verbliebenen Clearing-Mechanismen der Zelle überfordert sind.

4.5. Der Effekt von ZnCl₂ auf transmembranale Calciumflüsse

In der nächsten Serie von Experimenten habe ich getestet, ob der Calciumeinstrom zu blockieren ist und ob anhand eines pharmakologischen Profils ein Kanal zu identifizieren ist, über welchen der Ca²⁺-Einstrom erfolgt. In den Versuchen zeigte sich, dass von den Substanzen, von denen die Literatur berichtet, sie seien in der Lage, den kapazitiven Calciumeinstrom zu blockieren (vergl. Abschnitt 3.5.2), ZnCl₂ den größten Effekt hatte. Zuverlässig und in Konzentrationen, welche im physiologischen Bereich liegen, imitierte die Anwesenheit von ZnCl₂ (100µM) die Form des Transienten, welcher in calciumfreier Badlösung gemessen wird (vergl. Abbildung 14). t_{0,5}, t_{0,1} und AUC sind auf 0,05-Ebene nicht signifikant verschieden von den Ergebnissen der Versuche, die in EGTA-gepufferter Extrazellulärlösung gewonnen wurden (vergl. Abbildung 16, Tabelle 6).

Bei physiologischer [Ca²⁺]_o und gleichzeitiger Blockade der Calciumkanäle bleibt der hohe Gradient für dieses Ion bestehen. Die Kongruenz der beiden ATP-induzierten Transienten in ZnCl₂ und EGTA legt den Schluss nahe, dass es der Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär die Länge des ATP-induzierten Transienten bestimmt und nicht der große Gradient, gegen den das Ca²⁺ herausgepumpt werden müsste.

4.6. Die Bedeutung des hIK1 für die transmembranalen Calciumflüsse

Koegel et al. beschrieben die weitgreifenden Auswirkungen eines Fehlens des hIK1-Kanals auf die Zellbiologie von HaCaT-Keratinocyten (vergl. Abschnitt 1.4.7)

Nach der mehrstündigen Inkubation mit 1-EBIO (1 mM) waren die HaCaT-Zellen in Patch-Clamp-Versuchen nicht mehr fähig zu hyperpolarisieren, zudem war eine abnehmende Proliferationsrate und eine vermindertes Differenzierungsvermögen zu messen (Koegel *et al.* 2003).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Versuchsergebnisse unterstreichen die Bedeutung calciumabhängig gesteuerter Kaliumströme für die Ca²⁺-Homöostase in Keratinocyten, insbesondere für die Dauer des Calciumtransienten nach der Applikation von ATP in mikromolarer Konzentration.

Diese Schlussfolgerung beruht auf drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen, in denen jeweils die Aktivität des hIK1-Kanals bzw. die von ihm vermittelte Membranhyperpolarisation ausgeschaltet wurden. In der ersten Serie wurde die paradoxe Wirkung von 1-EBIO genutzt, um die Expression von hIK1 zu unterdrücken. Dies führte zu einer signifikanten Verkürzung des ATP-induzierten Transienten (vergl. Abschnitt 3.6.1). Neben der Tatsache, dass der Transient bereits nach 450,8 s (28,0% des Kontrollwertes) wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt ist, war auch die Form des Calciumtransienten verändert. Die erste Schulter, welche in den Versuchen in calciumfreier Badlösung nicht auftrat, war nun zu erkennen, jedoch zarter und spitzer geformt als in den

Kontrollexperimenten mit dem hIK1. Bei diesem Versuch ist nicht auszuschließen, dass durch den langen Kontakt zu 1-EBIO neben der Aktivität des hIK1 auch andere Komponenten des Ca^{2+} -Signaling verändert wurden.

In einer zweiten Serie wurde der hIK1 daher durch TRAM-34, einen hochselektiven und potenten Blocker ausgeschaltet (Wulff *et al.* 2000). Auch in den vorgestellten Experimenten hatte die Applikation von TRAM-34 einen profunden Effekt auf die Dauer und Form des ATP-induzierten Calciumtransienten. Vergleichbar und auf 0,05-Ebene nicht signifikant verschieden vom $t_{0,1}$ -Wert des Transienten aus der 1-EBIO-Gruppe, erreicht $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bereits nach 510,9 s wieder das Ausgangsniveau. Auch wenn die biologische Bedeutung der AUC nicht gesichert ist, erscheint es bemerkenswert, dass sich dieser Wert (hier: 373,8) wiederum nicht signifikant vom dem Wert der 1-EBIO-behandelten Keratinozyten (397,3) unterscheidet, wohl aber sehr deutlich von dem der Kontrollgruppe (968,0).

Da die Dauer des Calciumtransienten nach ATP-Gabe offensichtlich vom Einstrom extrazellulären Calciums abhängt, galt es als nächstes, den Mechanismus zu verstehen, mit welchem der hIK1-Kanal diesen Einstrom verstärkt, bzw. mit welchem das Fehlen des hIK1 den Einstrom abschwächt.

Es sind unterschiedliche Mechanismen beobachtet worden, über die Kanäle aufeinander einwirken können. Besteht eventuell eine direkte Wirkung von hIK1 auf I_{CRAC} -Kanäle, analog etwa der Wirkung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals auf den RyR im quergestreiften Muskel? Oder ist es die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation, welche die treibende Kraft für den Calciumeinstrom verstärkt?

Um diese Frage zu beantworten, habe ich in einer dritten Versuchsreihe die Hyperpolarisation verhindert, ohne jedoch wie zuvor die Aktivität des hIK1 zu beeinträchtigen. Da eine Spannungsklemme mit der Patch-Clamp-Methode angesichts der ausgeprägten junctionalen Koppelung der HaCaT-Zellen untereinander äußerst problematisch ist (Koegel *et al.* 2003), wurde die Membranspannung durch Erhöhung der $[\text{K}^+]_o$ auf den mittleren Wert des Ruhemembranpotentials (-40 mV) „geklemmt“. Dadurch sind K^+ -Gleichgewichtspotential und Ruhemembranpotential annähernd identisch. Die Aktivierung von hIK1 führt zu keiner nennenswerten Verschiebung des Membranpotentials

Wurde die hIK1-induzierte Hyperpolarisation durch die K^+ -Klemme verhindert, unterschieden sich die Parameter des Calciumtransienten nicht signifikant von denen, welche unter der Downregulation (vergl. Abschnitt 3.6.1) oder der Behandlung mit TRAM-34 (vergl. Abschnitt 3.6.2) ermittelt wurden. Dies zeigt die zentrale Bedeutung, die der Hyperpolarisation als treibende Kraft des Ca^{2+} -Einstroms zukommt. Zugleich legen diese Befunde die Vermutung nahe, dass die Kanäle, über die Ca^{2+} einströmt, eine nicht-lineare Strom-Spannungsbeziehung aufweisen, die einen überproportionalen Ca^{2+} -Influx bei zunehmender Negativierung des Membranpotentials

4.6. Die Bedeutung des hIK1 für die transmembranalen Calciumflüsse

erlaubt. Elektrophysiologische Befunde an Keratinozyten, die diese Hypothese untermauern, stehen jedoch noch aus.

Tatsächlich unterscheiden sich die Parameter des Calciumtransienten unter der K^+ -Klemme nicht signifikant von denen, welche unter der Downregulation und der Behandlung mit TRAM-34 ermittelt wurden (vergl. Abbildung 22).

Die Bindung von ATP an den Keratinozyten und die nachfolgende Signalkaskade, welche zu der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ führt, ist möglicherweise nur einer von einer Reihe weiteren Prozessen, für welche Ca^{2+} eine entscheidende Bedeutung spielt. Wenn in die Zelle durch die Unfähigkeit, während des Calciumtransienten zu hyperpolarisieren, bei jeder Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nicht in ausreichender Menge Ca^{2+} nachströmt, dann mag über die Zeit der Gehalt der Zelle an Ca^{2+} geringer werden. Die Folge kann – wie von Koegel et al. an HaCaT-Keratinozyten gezeigt – sein, dass die Proliferationsrate abnimmt und die Zelle nicht weiter differenzieren kann (Koegel *et al.* 2003). Auf die Bedeutung eines ausreichend großen K^+ -Gradienten war vorher schon hingewiesen worden (Hennings *et al.* 1983b; Lee *et al.* 1994).

In Abschnitt 1.4.2 sind Literaturbefunde notiert, nach welchen eine hohe $[Ca^{2+}]_o$ die Expression von Differenzierungsmarkern von Keratinozyten unterstützt. Zugleich scheint für diesen Prozess auch eine ausreichend hohe $[K^+]_i$ – mithin ein großer transmembranaler K^+ -Gradient - notwendig zu sein. Die Befunde von Lee et al. sowie Denda et al. legen nahe, dass die Wiederherstellung der Hautbarriere durch eine hohe $[Ca^{2+}]_o$ oder hohe $[K^+]_i$ gehemmt wird.

Auch wenn eine funktionierende Diffusionsbarriere Merkmal einer gesunden Haut ist, ist die Wiederherstellung der epidermalen Barrierefunktion offenbar weniger als Differenzierungsprozess zu verstehen, sondern geschieht vielmehr unter Bedingungen, die die Proliferation der Hautzellen unterstützen. Wenn Denda et al. davon ausgehen, dass $[K^+]_i$ eine entscheidende Rolle einnimmt, weil K^+ -Kanal-Öffner wie 1-EBIO oder Diazoxid die zellulären K^+ -Gehalt senken, sollte kritisch überprüft werden, ob es nicht vielmehr der K^+ -Gradient über die Zellmembran ist, welcher den Effekt vermittelt. Denn geringe Werte für $[K^+]_i$ bedeuten auch einen geringeren Gradienten und eine geringere treibende Kraft für den Ca^{2+} -Influx. Zudem bleibt es fraglich, ob es offenen K^+ -Kanälen tatsächlich gelingt, den Kaliumgehalt einer Zelle signifikant zu senken.

4.7. Effekt der Hyperpolarisation ohne den ATP-induzierten Transienten

Im vorhergehenden Abschnitt wurde erörtert, welchen profunden Effekt die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation der Membran während eines Ca^{2+} -Transienten besitzt. Die Tatsache, dass die Änderung der Membranspannung den Transienten um das dreifache verlängert, fordert auf, zu überprüfen, ob die Hyperpolarisation alleine bereits einen Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$ hat. Zuvor zeigten Koegel et al. in Patch-Clamp-Experimenten, dass die Applikation von

1-EBIO auf HaCaT-Keratinocyten zu einer starken hIK1-abhängigen Hyperpolarisation führt (vergl. Abbildung 4). Um - ergänzend zu diesen Befunden – zu testen, welchen Einfluss die Aktivierung von hIK1 auf $[Ca^{2+}]_i$ hat, perfundierten wir HaCaT-Keratinocyten, welche zuvor nach dem Standardprotokoll mit CG-1 und FR beladen wurden, mit 1-EBIO (1 mM).

Ohne vorangehende Applikation von ATP und die damit verbundene Generierung von $InsP_3$, Depletion des ER und Aktivierung des I_{CRAC} kommt es nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einem leichten Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ und der Ausbildung einer Senke (vergl. Abbildung 20, „Kontrolle“). Bei Zellen, welche nach einer 24stündigen Behandlung mit 1-EBIO (1 mM) den hIK1-Kanal herunter regulierten, ließ sich dieser Effekt nicht zeigen (vergl. Abbildung 20, „24h 1-EBIO“). Dieser Umstand weist darauf hin, dass das leichte Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ hIK1-vermittelt ist. Es ist jedoch denkbar, dass das leichte Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ auf einen 1-EBIO-spezifischen Effekt und nicht auf die Membranhyperpolarisation zurückzuführen ist. Daher wird es erforderlich sein, wie für andere Fragestellungen auch, das Membranpotential während der Fluoreszenzmessung mit der Patch-Clamp-Methode zu klemmen. Vor dem Versuch, die Hyperpolarisation durch 1-EBIO mit TRAM-34 zu blockieren, wäre es nötig, in einer Reihe von Experimenten die Interaktion von 1-EBIO mit TRAM-34 zu untersuchen.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob der in der Kontrollmessung beobachtete Effekt auf eine Interaktion von 1-EBIO mit dem ER und einer möglichen Aktivierung des I_{CRAC} zurückzuführen ist. Hierfür wurden die Zellen Minuten vor dem Versuch mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin hemmt den Transport von Ca^{2+} in das ER, dieses entleert sich auf diese Weise passiv und es kommt nun zur Aktivierung der SOC-Kanäle (vergl. Abschnitte 1.3.2 sowie 3.6.4). Das depletierte Endoplasmatische Retikulum, die dadurch aktivierten SOC-Kanäle sowie die calciumfreie Extrazellulärlösung haben jedoch keinen Einfluss auf den Effekt, den die Applikation von 1-EBIO auf $[Ca^{2+}]_i$ zeigt.

Der Verlauf von $[Ca^{2+}]_i$ ist gegensinnig: Beim Einwaschen von 1-EBIO sinkt $[Ca^{2+}]_i$ ab, während direkt nach dem Auswaschen $[Ca^{2+}]_i$ für kurze Zeit auf höhere Werte ansteigt. Bei der Erwägung, ob es sich hierbei um einen Ein- und Auswascheffekt handelt, muss berücksichtigt werden, dass dieser Effekt hIK1-abhängig zu sein scheint. Zusammen mit der Beobachtung, dass der Effekt unabhängig von $[Ca^{2+}]_o$ ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass hier ein Artefakt vorliegt, welches durch das Lösungsmittel DMSO oder das An- und Abfluten des Perfusates erzeugt wird.

Die erhobenen Befunde geben Anlass zur Annahme, dass die 1-EBIO induzierte Hyperpolarisation einen Mechanismus unterstützt, der zu einer Absenkung von $[Ca^{2+}]_i$ führt. Da 1-EBIO keine intrazellulären Prozesse anzusprechen scheint, mag der Grund für das leichte Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ in der Verstärkung eines transmembranalen OFF-Mechanismus zu suchen sein. Während mit viel Nachdruck mögliche Wege des Ca^{2+} in die Zelle untersucht wurden, ist nicht viel über die Clearing-Mechanismen für Ca^{2+} in Keratinocyten bekannt. Der $Ca^{2+}/3-Na^+$ -Austauscher (NXC, vergl. Abschnitt 1.3.4) ist möglicherweise Grund für den leichten Abfall der $[Ca^{2+}]_i$.

4.7. Effekt der Hyperpolarisation ohne den ATP-induzierten Transienten

Seine Eigenschaft als Vermittler eines elektrogenen Transports lässt es plausibel erscheinen, dass sein Umsatz durch die Hyperpolarisation verstärkt wird. Mit jedem Arbeitsschritt transportiert NCX netto eine positive Ladung in das Zellinnere, dieser Vorgang – und damit auch der Ca^{2+} -Transport nach extrazellulär – wird durch ein innen stärker negatives Membranpotential unterstützt.

Verstärkt jedoch die Hyperpolarisation den Export von Ca^{2+} aus der Zelle, dann würde dies auch für den Moment während des Ca^{2+} -Transienten gelten, zumal der Ca^{2+} -Gradient hier um zwei Größenordnungen geringer ist. Abbildung 20 macht jedoch deutlich, dass es sich lediglich um ein geringes Absinken von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ handelt. Während des ATP-induzierten Transienten ist die Fluoreszenz-Ratio bis auf um das 2,5-fache erhöht, für die Form des Transienten mag das Absinken um 10 % von untergeordneter Bedeutung sein.

Die Ergebnisse dieser Versuche, bei denen die Zellmembran hyperpolarisiert wurde, ohne dass zuvor durch Entleerung InsP_3 -sensitiver Speicher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anstieg und der I_{CRAC} aktiviert wurde, machen zudem deutlich, dass es weder die Signalkaskade noch die Hyperpolarisation alleine sind, die für den starken Calciumeinstrom verantwortlich sind. In HaCaT-Keratinocyten ist die Aktivierung des I_{CRAC} eine Prämisse für den Calciuminflux, die Hyperpolarisation nimmt die Rolle eines massiven Verstärkers ein.

4.8. Die Form des Calciumtransienten

Die Form des Calciumtransienten ist in dieser Arbeit nicht quantitativ untersucht worden. Sie weist trotzdem eine Reihe an Merkmalen auf, die es wert sind, auf ihre Ursachen hin untersucht zu werden.

In dieser Arbeit sind sechs Versuchsprotokolle angewandt worden. Neben der Kontrollgruppe gab es zwei Protokolle, in welchen die Ca^{2+} -Ströme unterbunden wurden (Ca^{2+} -freie, EGTA-supplementierte Badlösung und ZnCl_2) und drei Protokolle, in welchen die Kaliumströme modifiziert wurden (24h Inkubation mit 1-EBIO, TRAM-34 und hohes $[\text{K}^+]_o$).

4.8.1. Der initiale Aufstrich

Allen sechs untersuchten Transienten ist gemein, dass sie direkt am Beginn der ATP-Applikation mit einem steilen Aufstrich beginnen, welcher in jedem einzelnen Fall im Maximalwert des Transienten gipfelt. Die Maximalwerte unterscheiden sich in keinem Fall signifikant voneinander, unabhängig vom Versuchsprotokoll (vergl. Abbildung 21). Der Umstand, dass der Aufstrich zum Maximalwert unabhängig sowohl von den transmembranalen Calciumflüssen als auch von der Aktivität des hK1 ist, legt nahe, dass es sich bei diesem Prozess um eine rein intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung handelt.

Das Modell, nach welchem die Bindung von ATP an membranständige P2Y2-Rezeptoren zur Aktivierung einer Isoform der Phospholipase C führt, welche ihrerseits die Spaltung von PIP₂ in DAG und InsP₃ katalysiert, welches wiederum seinerseits nun zur Freisetzung großer Mengen an Ca²⁺ aus dem ER ermöglicht, steht mit diesem Befund in Einklang.

Direkt im Anschluss an diese erste Flanke kommt es – wiederum bei allen Transienten – zu einem spitzen Abfall von [Ca²⁺]_i. Ist jegliches extrazelluläres Ca²⁺ komplexiert oder ist der kapazitive Calciumeinstrom mit ZnCl₂ suffizient geblockt, dann fällt [Ca²⁺]_i stetig und ohne die Ausbildung einer weiteren „Schulter“ auf den Ausgangswert ab (vergl. Abbildungen 14, 15).

4.8.2. Die erste Schulter

Sobald von extrazellulär Ca²⁺ einströmt, wird dieser erste Abfall nach nur wenigen Sekunden unterbrochen, um eine erste Schulter im Transienten auszubilden. Die Ausprägung dieses zweiten Maximalwertes der [Ca²⁺]_i unterscheidet sich jedoch abhängig von den Versuchsbedingungen. Während diese Schulter in den Kontrollzellen einen längeren Verlauf nimmt, um sich dann erneut in Richtung der Baseline zuzuwenden, ist diese Schulter unter jenen Bedingungen, in welchen der hK1 in seiner Aktivität gehemmt ist, immer noch deutlich wahrzunehmen, jedoch nun zeitlich kürzer.

Tabelle 7: Ausprägung der einzelnen Merkmale abhängig von den Messbedingungen

	<i>1. Aufstrich</i>	<i>1. Abfall</i>	<i>1. Schulter</i>	<i>2. Abfall</i>	<i>2. Schulter</i>
Kontrolle	+	+	++	+	+
EGTA	+	+	-	-	-
ZnCl ₂	+	+	-	-	-
TRAM-34	+	+	(+)	(+)	(+)
24h 1-EBIO	+	+	(+)	(+)	(+)
Hohes [K ⁺] _o	+	+	(+)	(+)	(+)

In Abschnitt 3.5 konnte beobachtet werden, dass unter Bedingungen, unter denen kein Ca²⁺ von extrazellulär einströmen kann, die erste Schulter ausbleibt. Geht man vom Modell des Store-operated-Calcium-Influx aus,

4.8. Die Form des Calciumtransienten

sollte die erste Schulter durch einströmendes Ca^{2+} ausgebildet werden. Da die hIK1-induzierte Hyperpolarisation den Calciumeinstrom massiv verstärkt, sollte die unterschiedlich starke Ausprägung dieser Schulter eine Funktion der Aktivität des hIK1 sein. Tatsächlich ist diese erste Schulter in allen Transienten, bei welchen die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation beeinträchtigt ist, deutlich schwächer ausgeprägt (vergl. Abbildung 23).

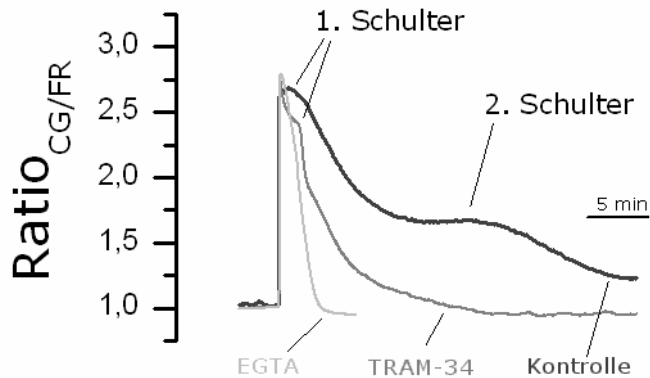


Abbildung 23: Ca^{2+} -Transienten und ihre qualitativen Merkmale. Die 1. Schulter, welche in der Kontrolle deutlich ausgeprägt war, findet sich schwächer auch im Ca^{2+} -Transienten der Zellen mit blockierten hIK1-Kanal, jedoch nicht bei Zellen in calciumfreier Badlösung.

Nach der ersten Schulter und dem nachfolgenden zweiten Abfall tritt bei dem Transienten der Kontrollzellen ein weiteres schulterförmiges Plateau auf, nach welchem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dann endgültig auf den Ausgangswert zurückfällt. Bei allen Transienten mit unterdrückter hIK1-Aktivität (24h 1-EBIO-, hohes $[\text{K}^+]_o$ - und TRAM34-Gruppe) ist diese zweite Schulter in dieser Form nicht zu erkennen. Stattdessen findet sich ein zeitlicher Bereich, in dem die Abfallgeschwindigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stark abnimmt und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nun viel langsamer zum Ausgangswert zurückkehrt.

Ohne weitergehende Versuche können die Ca^{2+} -Verschiebungen, die für den Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der ersten Schulter verantwortlich sind, nicht aufgeklärt werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass die Mitochondrien in der Lage sind, abhängig von ihrem Transmembranpotential schnell große Mengen an Ca^{2+} zu sequestrieren und zeitlich versetzt wieder in das Zytosol zu abzugeben.

In T-Lymphozyten wurde beispielsweise untersucht, wie zellmembran-nah gelegene Mitochondrien den kapazitiven Calciumeinstrom durch temporäre Abpufferung unterstützen können (Glitsch *et al.* 2002). Mit Blick auf diese Versuche liegt die Spekulation nahe, dass die Aufnahme von eingeströmtem Ca^{2+} in ein „tiefer gelegenes“ Kompartiment und die verzögerte Freisetzung nach einer Latenz die zweite Schulter erklären können. Die hIK1-vermittelte Verstärkung dieses Calciuminflux wäre mit diesem Modell vereinbar, zumal die hIK1-defizienten Zellen keine zweite Schulter ausbilden, sondern lediglich eine Verlangsamung im Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufweisen. Durch die mitochondriale Abpufferung des einströmenden Ca^{2+} würde die Ca^{2+} -induzierte Hemmung des weiteren Ca^{2+} -Influx verhindert und die hinreichende Auffüllung der Speicher sichergestellt.

4.9. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen zum einen, dass konfokale Laserscanmikroskopie mit den calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green-1 und Fura Red sinnvoll für die Untersuchung der intrazellulären Calciumkonzentration von adhären wachsenden Keratinozyten einzusetzen sind.

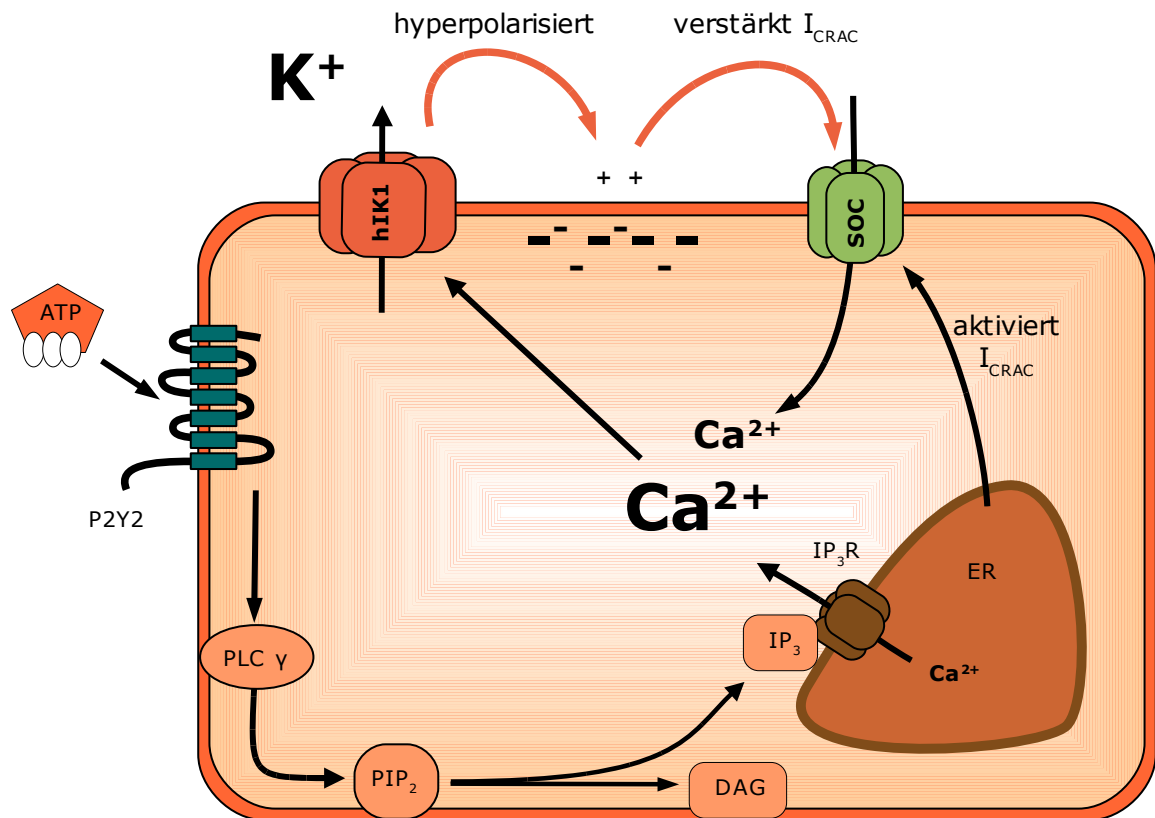


Abbildung 24: **Reduziertes Schema eines Keratinozyten.** ATP bindet an einen P2Y2-Rezeptor. Eine Untereinheit des G-Proteins aktiviert die Phospholipase C γ , welche ihrerseits die Spaltung von Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) katalysiert. IP₃ bindet an seinen Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies führt zur Freisetzung von großen Mengen Ca²⁺ in das Zytosol und aktiviert den I_{CRAC}. Die Erhöhung der [Ca²⁺]_i aktiviert den hIK1 und der K⁺-Ausstrom hyperpolarisiert die Zellmembran. Die treibende Kraft für den I_{CRAC}, welcher durch die Depletion des ER aktiviert worden war, wird verstärkt und mehr Ca²⁺ fließt in die Zelle. Dieser verstärkte I_{CRAC} füllt den Ca²⁺-Bestand der Zelle auf. Außerdem unterhält er die Aktivierung des hIK1-Kanals. Zu beachten ist, dass das Schema lediglich einen Teil der Organellen, welche Bestandteil der Signaltransduktion sind, berücksichtigt.

Abbildung 24 gibt einen Überblick über die Folge an Reaktionen, die die Bindung von ATP an seinen Rezeptor an der Keratinozytenmembran auslöst. Besondere Beachtung verdient die Tatsache, dass die den Calciumtransienten begleitende Hyperpolarisation und der nachfolgend verstärkte Calciumeinstrom die Aktivierung des hIK1 unterstützen (vergl. vorangehenden Abschnitt 4.8.2). Da der hIK1-Kanal und seine Aktivierung Teil dieser Kette

4.9. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

sind, entsteht eine Form eines sich selbst erhaltenden Regelkreises. Freilich machen die gewonnenen Daten und die Erwägungen, zu denen sie auffordern, auch deutlich, dass es sich bei der Hyperpolarisation lediglich um ein unterstützendes Element in diesem Gefüge handelt. Trotzdem macht der Umstand, dass ein Mangel des hIK1 zu solch profunden Änderungen der Zellbiologie führt (vergl. Abschnitt 1.4.7), auch deutlich, wie wichtig Calciumsignale und ihre Merkmale für die Biologie des Keratinozyten sind.

Abbildung 2 skizziert verschiedene zelluläre Prozesse, geordnet nach der Länge der Calciumsignale, welche zu ihrer Regulation notwendig sind. Die kürzesten Ca^{2+} -Transienten regulieren Prozesse der Exozytose von Transmittervesikeln, die längsten sind an der Steuerung von Fertilisationsprozessen in der Oozyte beteiligt. Ca^{2+} -Signale einer Dauer von Sekunden bis Minuten, wie sie auch in dieser Arbeit beschrieben sind, werden am ehesten mit metabolischen Vorgängen bzw. Transkriptionsprozessen assoziiert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, dass physiologische Werte für $[\text{Ca}^{2+}]_o$ den ATP-induzierten Transienten um das achtfache verlängern (vergl. Abschnitt 3.5). Dagegen verlängert die Fähigkeit zur Hyperpolarisation während des Calciumtransienten diesen auf die dreifache Dauer (vergl. Abschnitt 3.6 und Abbildung 23). In der Zusammenschau mit den Befunden aus der Literatur unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Fähigkeit zur begleitenden Hyperpolarisation während einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung das Verhalten einer Zelle auf profunde Weise verändern kann. Die Folgen, die eine Herunterregulation des hIK1 für die Zelle hat, sind von Koegel et al. beschrieben worden (Koegel *et al.* 2003). Diese Effekte (geringe Proliferation, mangelnde Differenzierung) können nun durch einen oder beide der folgenden Punkte erklärt werden:

- Das veränderte Verhalten der Zelle wird durch die erhobenen Befunde erklärbar: die begleitende hIK1-vermittelte Hyperpolarisation verlängert das Calciumsignal soweit, dass sich die Balance zwischen zellulären Programmen verschiebt.
- Durch die Verstärkung der treibenden Kraft für den Ca^{2+} -Influx mag der Verlust an Ca^{2+} während einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geringer ausfallen als ohne die Hyperpolarisation. Auf diese Weise trägt die Hyperpolarisation dazu bei, dass der Calciumgehalt der Zelle nicht abnimmt und der Keratinozyt seine Fähigkeit zur Generierung von Calciumtransienten behält.

4.10. Weiterführende Fragestellungen

Die ermittelten Daten und ihre Bewertung geben Anlass zu weiteren Fragestellungen, denen es wert ist, nachzugehen.

Bislang ist wenig bekannt über die Mechanismen, welche an der Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu basalen Werten beteiligt sind. Hat man spezifische Blocker für die Calciumpumpen und -austauscher zur Hand, dann mag es gelingen, die am Clearing beteiligten Prozesse zu identifizieren. Welcher Anteil des zytosolischen Ca^{2+} wird in intrazelluläre

Speicher wie Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien sequestriert? Wie viel Ca^{2+} verliert die Zelle während eines Calciumtransienten?

In vielen Arbeitsgruppen sind große Anstrengungen unternommen worden für ein besseres Verständnis des kapazitiven Calciumeinstroms. Seit kurzer Zeit ist bekannt, wie der I_{CRAC} aktiviert wird (Übersicht bei Bolotina 2008). Lassen sich diese Erkenntnisse oder Teile davon an Keratinozyten bestätigen? Handelt es sich auch bei dem Kanal für den kapazitiven Calciumeinstrom in HaCaT-Keratinozyten um mehr als eine Entität, welcher den I_{CRAC} leitet?

In dieser Arbeit konnte mittels der guten zeitlichen Auflösung des LSM einzelne Komponenten des Calciumtransienten darstellen. Die aus der Literatur bekannten Erklärungen (Csernoch *et al.* 2000) konnten zum einen bestätigt werden, zum anderen konnte mit dieser Arbeit die Beteiligung der hIK1-vermittelten Hyperpolarisation für das Ausmaß dieser Schulter gezeigt werden. Es ist zunächst offen geblieben, aus welchen Kompartimenten sich die zweite Schulter speist. Handelt es sich um einen Calciumeinstrom, welcher aufgrund seiner Art der Aktivierung verspätet einsetzt? Ist es die Abnahme der Aktivität der am Clearing beteiligten Prozesse? Spielt eventuell die Entleerung der Mitochondrien oder weiterer intrazellulärer Calciumspeicher eine Rolle? Die Bedeutung von Mitochondrien beim Calciumsignaling in T-Lymphozyten ist an verschiedenen Stellen eindrucksvoll gezeigt worden (Babcock *et al.* 1997; Glitsch *et al.* 2002; Hoth *et al.* 1997). Möglicherweise nehmen Mitochondrien mit ihrer großen Speicherkapazität für Calcium teil an der Signaltransduktion in Keratinozyten.

5. Zusammenfassung

Die Haut des Menschen erfüllt eine Vielzahl an Aufgaben, dabei ist die ausgewogene Balance von Proliferation und Differenzierung ihrer Zellen wesentliches Element einer intakten Funktion. Durch die hohe Zellteilungsrate im Stratum basale gelangen die Keratinozyten in oberflächlich gelegene Schichten der Haut, wobei sie einen Differenzierungsprozess durchlaufen. Wie in vielen Geweben, wird Ca^{2+} in seiner Eigenschaft als Second Messenger auch in diesem Zusammenhang eine wichtige Bedeutung zugemessen. Eine Reihe von Untersuchungen hat in der Vergangenheit gezeigt, dass jedoch nicht nur Calciumsignale, sondern auch die intra- und extrazellulären K^+ -Konzentrationen ein wichtiges Regulativ epidermaler Differenzierung darstellen. Darüber hinaus ist bekannt, dass 5-Adenosintriphosphat (ATP) einen Effekt auf die Keratinozytenbiologie hat. Die Bindung von ATP an seinen P2Y2-Rezeptor führt zur Phospholipase $\text{C}\gamma$ -abhängigen Generierung von Inositoltriphosphat (InsP_3). InsP_3 seinerseits führt zur Entleerung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytosol. Die geringe Ca^{2+} -Konzentration im ER aktiviert den „Store-Operated- Ca^{2+} -Entry“.

Vorarbeiten zeigten anhand von RNase-Protection-Assays und elektrophysiologischen Messungen, dass HaCaT-Zellen, eine spontan immortalisierte Keratinozytenlinie, über den Ca^{2+} -aktivierten intermediär leitenden K^+ -Kanal hIK1 verfügen. Paradoerweise kam es nach verlängerter Inkubation (> 3 h) mit dem pharmakologischen Aktivator dieses Kanals 1-EBIO zu einer Herunterregulation des hIK1. Dies hatte weitgreifende Auswirkungen auf die Biologie dieser

Zellen: sowohl die Proliferationsrate als auch die Expression von Differenzierungsmarkern sanken. Zudem war die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation, die sonst nach der Applikation von ATP zu messen war, nicht weiter nachweisbar. Auch der charakteristische Verlauf des Ca^{2+} -Transienten nach ATP-Applikation war ohne den hIK1-Kanal deutlich verändert.

In der vorliegenden Arbeit standen zwei Punkte im Vordergrund: Lassen sich mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie die verschiedenen Komponenten der ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten darstellen? Aus welchen Kompartimenten wird das Ca^{2+} für den Transienten rekrutiert und inwieweit tragen hIK1 und andere Kanäle zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei? Darüber hinaus interessierte, inwieweit durch die Langzeitapplikation des hIK1-Öffners 1-EBIO, der zur paradoxen Herunterregulation des hIK1 führt, die Ca^{2+} -Homöostase der Hautzellen beeinträchtigt. Kann dies die Langzeiteffekte von 1-EBIO auf Proliferation und Differenzierung der HaCaT-Keratinozyten erklären?

Hierfür wurden HaCaT-Keratinozyten mit den calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green-1 und Fura Red beladen. Die mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden zu einem Quotienten verrechnet und auf den Ruhewert normiert. Für die ATP-induzierten Transienten wurden Amplitude, $t_{0,1}$, $t_{0,5}$ und die „Area under the curve“ (AUC) bestimmt. Dieses ratiometrische Maß für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nahm in Kontrollzellen einen charakteristischen Verlauf: mit Beginn der ATP-Applikation stieg $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stetig und direkt auf einen Maximalwert an, um dann innerhalb von durchschnittlich 21 min wieder auf den Ruhewert abzufallen. Das Absinken

von $[Ca^{2+}]_i$ auf den Ruhewert war durch zwei typische Schultern gekennzeichnet. Der Amplitude wie auch die AUC dieses Transienten waren dabei dosisabhängig, wobei bei geringen Werten für ATP eine Alles-oder-Nichts-Reaktion zu beobachten war.

Um zu ermitteln, aus welchen Kompartimenten die Zelle das Ca^{2+} für den Transienten rekrutiert, wurde der Versuch in Ca^{2+} -freier Badlösung sowie in Anwesenheit von $ZnCl_2$ – einem Blocker für Ca^{2+} -Influx – wiederholt. Während die Amplitude im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieb, kehrte $[Ca^{2+}]_i$ in beiden Fällen bereits in weniger als zwei Minuten wieder auf basale Werte zurück (8,5 % bzw. 9,5 % der Kontrolle).

In einer zweiten Reihe von Experimenten untersuchten wir den Effekt des hIK1 auf Gestalt und Dauer des Ca^{2+} -Transienten. In Zellen, in denen der hIK1-Kanal durch Langzeit-Inkubation mit 1-EBIO (1 mM) herunter reguliert war, kehrte der Transient in weniger als sechs Minuten (26 % der Kontrolle) auf den Ruhewert zurück. Nun wurde der Versuch in Anwesenheit des selektiven hIK1-Blockers TRAM-34 wiederholt. Der ATP-induzierte Ca^{2+} -Transient unterschied sich in Verlauf und gemessenen Parametern nicht von dem der 1-EBIO-behandelten Zellen. Um zu prüfen, ob es die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation ist, die dem Transienten seine Form verleiht, wurde ATP bei hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration appliziert. Wiederum war der Transient in der Dauer auf 34 % verkürzt, im Verlauf glich er wiederum dem Transienten in Zellen, deren hIK1-Aktivität pharmakologisch oder durch Herunterregulation geblockt war.

Es ist bekannt, dass durch einfache Zugabe von 1-EBIO (1 mM) die Membran von Hautzellen hyperpolarisiert. Unsere Experimente zeigten, dass ohne vorangehende Applikation von ATP $[Ca^{2+}]_i$ lediglich leicht sinkt und für die Dauer der Perfusion mit 1-EBIO einen stabilen Wert annahm. Möglicherweise werden durch das stärker negative Membranpotential $[Ca^{2+}]_i$ -senkende Prozesse unterstützt, die während des ATP-induzierten Transienten maskiert sind.

In der Zusammenschau der Befunde wird deutlich, dass sich das Ca^{2+} für der ersten Teil des Transienten nach der ATP-Applikation aus intrazellulären Kompartimenten rekrutiert. Der weitere Verlauf des Transienten ist abhängig vom Ca^{2+} -Einstrom. In den Versuchen mit herunter reguliertem bzw. geblocktem hIK1-Kanal wurde zudem deutlich, dass es die hIK1-vermittelte Hyperpolarisation ist, die den Verlauf von $[Ca^{2+}]_i$ entscheidend prägt. Die Verstärkung der treibenden Kraft unterstützt den Ca^{2+} -Influx und zusätzlich eingeströmtes Ca^{2+} unterhält die Aktivierung des hIK1-Kanals im Sinne eines sich selbst erhaltenden Regelkreises. Der Umstand, dass durch die Anwesenheit intakter hIK1-Kanäle der Ca^{2+} -Influx verstärkt und die Dauer von Calciumsignalen verlängert wird, ist eine mögliche Erklärung für die veränderte Biologie der 1-EBIO behandelten Keratinozyten, wie sie zuvor beschrieben wurde. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit geben zudem eine mögliche Erklärung für die Beobachtung verschiedener Autoren, nach denen nicht nur Ca^{2+} , sondern auch K^+ weitgreifende Bedeutung für die Biologie von Keratinozyten besitzt.

6. Anhang und Verzeichnisse

6.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Merkmale proliferierender und ausdifferenzierender Keratinozyten.....	10
Tab. 2: Synopsis der bislang an Keratinozyten beschriebenen Ionenkanäle.....	14
Tab. 3: Übersicht der Eigenschaften calciumaktivierter Kaliumkanäle.....	19
Tab. 4: Übersicht über verwendete Materialien und Bezugsquellen.....	22
Tab. 5: Hebes Buffered Saline (HBS) und ihre Zusammensetzung.....	23
Tab. 6: Synopsis der gemessenen Werte.....	49
Tab. 7: Ausprägung der einzelnen Merkmale abhängig von den Messbedingungen.....	63

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht von calciumgesteuerten Zellprozessen und die Dauer der Ca^{2+} -Transienten.....	2
Abb. 2: Die Komponenten des Calcium-Signaling.....	3
Abb. 3: Applikation von ATP und die resultierende Hyperpolarisation.....	16
Abb. 4: Effekt einer Akuten Applikation von 1-EBIO nach Herunterregulation des hIK1.....	17
Abb. 5: Absorptions- und Emissionsspektren von Fura Red.....	27
Abb. 6: Absorptions- und Emissionsspektrum von Calcium Green-1.....	28
Abb. 7: Die konfokalen Funktion in einem Laser-Scan-Mikroskop von Zeiss.....	31
Abb. 8: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von CG1 und FR sowie ihr Quotient.....	35
Abb. 9: Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von ATP (30 μ M) über eine Dauer von 90 sek.	36
Abb. 10: Aufsteigende Dosen von ATP und die durch sie induzierten Transienten.....	37
Abb. 11: Dosisabhängiger Effekt von ATP auf die AUC.....	38
Abb. 12: Die Dosiswirkungskurve für ATP, gemessen an der maximalen Amplitude des Transienten.....	38
Abb. 13: Effekt einer fortgesetzten Applikation von ATP im Vergleich zur kurzen Applikation.....	39
Abb. 14: Applikation von ATP in calciumfreier, EGTA-supplementierter Extrazellulärlösung.....	40
Abb. 15: Der Effekt von ATP in Anwesenheit von $ZnCl_2$ in der Badlösung.....	41
Abb. 16: Zusammenstellung der $t_{0,5}$, $t_{0,1}$ und AUC-Werte für die Kontrolle sowie der Transienten mit beeinträchtigttem Calciumfluss.....	42
Abb. 17: Der ATP-induzierte Calciumtransient nach vorhergegangener Inkubation mit 1-EBIO.....	43
Abb. 18: Der Calciumtransient nach ATP-Applikation in Anwesenheit von TRAM-34 (300 nM).....	44
Abb. 19: Der ATP-induzierte Ca^{2+} -Transient bei einer $[K^+]_o = 31$ mM.....	45
Abb. 20: Effekte der Hyperpolarisation durch 1-EBIO ohne vorhergehende Applikation von ATP.....	47
Abb. 21: Maxima der Calciumtransienten.....	49

Abb. 22: Übersicht über die $t_{0,5}$, $t_{0,1}$ - und AUC-Werte der Zellen mit beeinträchtigten Kaliumflüssen.....	50
Abb. 23: Ca^{2+} -Transienten und ihre qualitativen Merkmale.....	64
Abb. 24: Vereinfachtes Schema eines Keratinozyten.....	65

6.3. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A und Walter P (2003): *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, Wiley-VCH
- Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A, Mugnai G, De Filippi P, Tarone G, Del Bene MR, Barletta E, Wanke E und Olivotto M (1993): Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J. Cell Biol.*, 122, 1131-1143
- Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB und Hille B (1997): Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J. Cell Biol.*, 136, 833-844
- Berridge M, Lipp P und Bootman M (1999): Calcium signalling. *Curr. Biol.*, 9, R157-9
- Berridge MJ, Bootman MD und Roderick HL (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 517-529
- Berridge MJ, Lipp P und Bootman MD (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 11-21
- Bíró T, Szabó I, Kovács L, Hunyadi J und Csernoch L (1998): Distinct subpopulations in hacat cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch Dermatol Res*, 290, 270-276
- Bolotina VM (2008): Orai, stim1 and ipla2beta: a view from a different perspective. *J. Physiol. (Lond.)*, 586, 3035-3042
- Bootman MD und Berridge MJ (1995): The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, 83, 675-678
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A und Fusenig NE (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, 106, 761-771
- Braun F, Aziz O und Putney JWJ (2003): 2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel. *Mol. Pharmacol.*, 63, 1304-1311

6.3. Literaturverzeichnis

Breitkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M und Fusenig NE (1993): Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (hacat) and tumorigenic human skin keratinocytes (hacat-ras) by retinoic acid and extracellular Ca^{2+} . *Differentiation*, 54, 201-217

Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y und Farman N (1999): Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *J. Cell. Sci.*, 112 (Pt 19), 3343-3352

Burgstahler R, Koegel H, Rucker F, Tracey D, Grafe P und Alzheimer C (2003): Confocal ratiometric voltage imaging of cultured human keratinocytes reveals layer-specific responses to atp. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 284, C944-52

Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM und Izutsu KT (2005): Trpc channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, 40, 21-28

Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Roberts FA, Goodwin PC, Schubert MM und Izutsu KT (2006): Evidence that trpc1 contributes to calcium-induced differentiation of human keratinocytes. *Pflugers Arch.*, 452, 43-52

Clapham DE (2007): Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-1058

Csernoch L, Hunyadi J und Kovács L (2000): Calcium release activated calcium entry in a human skin derived cell line (hacat). *Exp. Dermatol.*, 9, 200-205

Csutora P, Peter K, Kilic H, Park KM, Zarayskiy V, Gwozdz T und Bolotina VM (2008): Novel role for stim1 as a trigger for calcium influx factor production. *J. Biol. Chem.*, 283, 14524-14531

Csutora P, Zarayskiy V, Peter K, Monje F, Smani T, Zakharov SI, Litvinov D und Bolotina VM (2006): Activation mechanism for crac current and store-operated Ca^{2+} entry: calcium influx factor and Ca^{2+} -independent phospholipase a2beta-mediated pathway. *J. Biol. Chem.*, 281, 34926-34935

Deitmer JW und Schild D (2000): Ca^{2+} und ph: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Denda M, Tsutsumi M, Inoue K, Crumrine D, Feingold KR und Elias PM (2007): Potassium channel openers accelerate epidermal barrier recovery. *Br. J. Dermatol.*, 157, 888-893

- Dixon CJ, Bowler WB, Littlewood-Evans A, Dillon JP, Bilbe G, Sharpe GR und Gallagher JA (1999): Regulation of epidermal homeostasis through p2y2 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 127, 1680-1686
- Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG und Cahalan MD (2001): Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in t lymphocytes. selective blockers and manipulated channel expression levels. *J. Biol. Chem.*, 276, 12249-12256
- Franzius D, Hoth M und Penner R (1994): Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflugers Arch.*, 428, 433-438
- Galiotta LJ, Barone V, De Luca M und Romeo G (1991): Characterization of chloride and cation channels in cultured human keratinocytes. *Pflugers Arch.*, 418, 18-25
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ und Garcia ML (1990): Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion buthus tamulus. *J. Biol. Chem.*, 265, 11083-11090
- Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD und Chandy KG (2000): Up-regulation of the ikca1 potassium channel during t-cell activation. molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.*, 275, 37137-37149
- Glitsch MD, Bakowski D und Parekh AB (2002): Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *EMBO J.*, 21, 6744-6754
- Gore A, Moran A, Hershinkel M und Sekler I (2004): Inhibitory mechanism of store-operated Ca²⁺ channels by zinc. *J. Biol. Chem.*, 279, 11106-11111
- Greig AVH, Linge C, Cambrey A und Burnstock G (2003): Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 121, 1145-1149
- Grissmer S, Nguyen AN und Cahalan MD (1993): Calcium-activated potassium channels in resting and activated human t lymphocytes. expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.*, 102, 601-630
- Grubauer G, Elias PM und Feingold KR (1989): Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J. Lipid Res.*, 30, 323-333

6.3. Literaturverzeichnis

Hennings H, Holbrook K, Steinert P und Yuspa S (1980): Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium. *Curr. Probl. Dermatol.*, 10, 3-25

Hennings H, Holbrook KA und Yuspa SH (1983a): Factors influencing calcium-induced terminal differentiation in cultured mouse epidermal cells. *J. Cell. Physiol.*, 116, 265-281

Hennings H, Holbrook KA und Yuspa SH (1983b): Potassium mediation of calcium-induced terminal differentiation of epidermal cells in culture. *J. Invest. Dermatol.*, 81, 50-5s

Hoth M und Penner R (1992): Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355, 353-356

Hoth M, Fanger CM und Lewis RS (1997): Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in t lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 137, 633-648

Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T, Takezawa R, Ichikawa A, Kubota H und Yamada T (2003): A pyrazole derivative, ym-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and il-2 production in t lymphocytes. *J. Immunol.*, 170, 4441-4449

Ivanchenko E und Markwardt F (2005): Characterization of large-conductance Ca^{2+} -dependent and -independent K^{+} channels in hacat keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol*, 18, 115-122

Jensen BS, Odum N, Jorgensen NK, Christophersen P und Olesen SP (1999): Inhibition of t cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 10917-10921

Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahatoglu A, Olesen SP und Ahring PK (1998): Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Am. J. Physiol.*, 275, C848-56

Kandel E, Schwarz JH und Jessel TM (2000): Principles of neural science. 4. Auflage, Elsevier, New York

Koegel H und Alzheimer C (2001): Expression and biological significance of Ca^{2+} -activated ion channels in human keratinocytes. *FASEB J.*, 15, 145-154

Koegel H, Kaesler S, Burgstahler R, Werner S und Alzheimer C (2003): Unexpected down-regulation of the hkl Ca^{2+} -activated K^{+} channel by its opener 1-ethyl-2-benzimidazolinone in hacat keratinocytes. inverse effects on cell growth and proliferation. *J. Biol. Chem.*, 278, 3323-3330

- Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J und Adelman JP (1996): Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, 273, 1709-1714
- Lee SH, Elias PM, Feingold KR und Mauro T (1994): A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J. Invest. Dermatol.*, 102, 976-979
- Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Quiang M und Feingold KR (1992): Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J. Clin. Invest.*, 89, 530-538
- Lehen'kyi V, Beck B, Polakowska R, Charveron M, Bordat P, Skryma R und Prevarskaya N (2007): Trpv6 is a Ca^{2+} entry channel essential for Ca^{2+} -induced differentiation of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 282, 22582-22591
- Limón A, Pérez C, Vega R und Soto E (2005): Ca^{2+} -activated K^{+} -current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. *J. Neurophysiol.*, 94, 3751-3761
- Lüllmann H, Mohr K und Wehling M (2006): Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 16. Auflage, Thieme, Stuttgart
- Lüllmann-Rauch R (2003): Histologie. 1. Auflage, Thieme, Stuttgart
- Lytton J, Westlin M und Hanley MR (1991): Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -atpase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.*, 266, 17067-17071
- Magnier-Gaubil C, Herbert JM, Quarck R, Papp B, Corvazier E, Wuytack F, Lévy-Tolédano S und Enouf J (1996): Smooth muscle cell cycle and proliferation. relationship between calcium influx and sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -atpase regulation. *J. Biol. Chem.*, 271, 27788-27794
- Mauro T, Dixon DB, Hanley K, Isseroff RR und Pappone PA (1995): Amiloride blocks a keratinocyte nonspecific cation channel and inhibits Ca^{2+} -induced keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 105, 203-208
- Mauro T, Dixon DB, Komuves L, Hanley K und Pappone PA (1997): Keratinocyte K^{+} channels mediate Ca^{2+} -induced differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 108, 864-870
- Mauro TM, Pappone PA und Isseroff RR (1990): Extracellular calcium affects the membrane currents of cultured human keratinocytes. *J. Cell. Physiol.*, 143, 13-20

6.3. Literaturverzeichnis

Menon GK, Grayson S und Elias PM (1985): Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.*, 84, 508-512

Menon GK, Price LF, Bommannan B, Elias PM und Feingold KR (1994): Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J. Invest. Dermatol.*, 102, 789-795

Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh BK, McCarthy SA, Moores KE und Rink TJ (1990): Sk&f 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.*, 271, 515-522

Nguyen VH und Markwardt F (2002): A large conductance $[Ca^{2+}]_i$ -independent K^+ channel expressed in hacat keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, 11, 319-326

Paddock S (2008): Over the rainbow: 25 years of confocal imaging. *BioTechniques*, 44, 643-4, 646, 648

Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S und Patapoutian A (2002): A heat-sensitive trp channel expressed in keratinocytes. *Science*, 296, 2046-2049

Peppiatt CM, Collins TJ, Mackenzie L, Conway SJ, Holmes AB, Bootman MD, Berridge MJ, Seo JT und Roderick HL (2003): 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-apb) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, 34, 97-108

Petersen CC und Berridge MJ (1996): Capacitative calcium entry is colocalised with calcium release in xenopus oocytes: evidence against a highly diffusible calcium influx factor. *Pflugers Arch.*, 432, 286-292

Pillai S und Bikle DD (1992): Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, 90, 42-51

Price M, Lee SC und Deutsch C (1989): Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 10171-10175

Proksch E, Fölster-Holst R und Jensen J (2006): Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol. Sci.*, 43, 159-169

- Read J und Watt FM (1988): A model for in vitro studies of epidermal homeostasis: proliferation and involucrin synthesis by cultured human keratinocytes during recovery after stripping off the suprabasal layers. *J. Invest. Dermatol.*, 90, 739-743
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Veliçelebi G und Stauderman KA (2005): Stim1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J. Cell Biol.*, 169, 435-445
- Rosado JA und Sage SO (2001): Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type ii and human transient receptor potential (htrp1) channels in human platelets. *Biochem. J.*, 356, 191-198
- Ryle CM, Breitzkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D und Fusenig NE (1989): Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line hacat and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*, 40, 42-54
- Schmidt RF und Lang F (2007): Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 30. Auflage, Springer, Berlin
- Sharpe GR, Fisher C, Gillespie JI und Greenwell JR (1993): Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increases in intracellular free calcium in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 284, 445-450
- Sharpe GR, Gillespie JI und Greenwell JR (1989): An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.*, 254, 25-28
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppinolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F, Legrand G, Humez S, Boilly B und Prevarskaya N (2000): Store depletion and store-operated ca^{2+} current in human prostate cancer Incap cells: involvement in apoptosis. *J. Physiol. (Lond.)*, 527 Pt 1, 71-83
- Thompson-Vest N, Shimizu Y, Hunne B und Furness JB (2006): The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (ik) channels in epithelial cells. *J. Anat.*, 208, 219-229
- Tu C, Chang W und Bikle DD (2005): Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 187-197
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV und Adelman JP (1998): Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8, 321-329

6.3. Literaturverzeichnis

Vicanová J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten HK und Ponc M (1998): Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J. Invest. Dermatol.*, 111, 97-106

Watt FM und Green H (1981): Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J. Cell Biol.*, 90, 738-742

Wohlrab D, Wohlrab J und Markwardt F (2000): Electrophysiological characterization of human keratinocytes using the patch-clamp technique. *Exp. Dermatol.*, 9, 219-223

Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD und Chandy KG (2000): Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} activated K^{+} channel, *ikca1*: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 8151-8156

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM und Roop DR (1989): Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J. Cell Biol.*, 109, 1207-1217

Zeiss: Konfokales Prinzip (2008), teilweise werblicher Charakter

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA und Cahalan MD (2005): Stim1 is a Ca^{2+} sensor that activates crac channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature*, 437, 902-905

Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A und Hoth M (2004): Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and t-lymphocyte activation by the pyrazole derivative *btp2*. *J. Biol. Chem.*, 279, 12427-12437

6.4. Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Alzheimer, der mir für meine Arbeit an der Dissertation die allerbesten Bedingungen geboten hat. Er begleitete meine Arbeit an diesem spannenden Thema mit viel Geduld und wertvollen Anregungen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir meine lange Ausbildung ermöglichten und ganz wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben. Meiner Frau Stefanie danke ich für das ganze Glück, mit welchem ich an dieser Dissertation arbeiten konnte.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Dr. Elke Edelmann, die mich geduldig in das Thema und den Umgang mit der spannenden Technik der Fluoreszenzmikroskopie einführte und Dr. Tobias Huth, der mir mit viel Sachverstand und Erfahrung bei allen Fragen zur Seite stand. Ohne die Hilfe der beiden wären die Dissertation nicht möglich gewesen.

Didier Gremelle, Kerstin Kronbitter, Martin Müller, Werner Kosellek, Dieter Schnell, Ingo Klein und Bernd Müller unterstützten meine Arbeit mit Sorgfalt und viel Geschick in allen technischen Belangen.

Besonders verbunden bin ich Dr. Harald Wiese, der mich mit seiner Freundschaft in meinem Studium und meiner Dissertation unterstützt hat. Prof. Dr. Werner Ulbricht, Prof. Dr. Markus Bleich und Dr. Fang Zheng danke ich für ihre freundliche und interessierte Begleitung meiner Arbeit. Meinen Mitdoktoranden Kathi Chammas, Meike Völkel, Angelika Klose, Matthias Nissen, Katja Lammert, Nils Jansen und Karoline Schmidt-Neuenfeldt danke ich für den ganzen Spaß, den ich bei der Arbeit hatte.

6.5. Lebenslauf

Philipp Bergmann

Esmarchstraße 57

24105 Kiel

Geboren am 08. Februar 1977 in Itzehoe

07.1983 - 06.1987	Besuch der Grundschule Münsterdorf
08.1987 - 06.1996	Besuch der Auguste-Viktoria-Schule in Itzehoe, Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
08.1996 - 08.1997	Zivildienst im Städtischen Pflegeheim „Timmannhaus“ in Itzehoe
09.1997 - 03.1998	Tätigkeit als Pflegehelfer im „Timmannhaus“ in Itzehoe
04.1998 - 03.2001	Ausbildung zum Krankenpfleger an der Krankenpflegeschule am Kreis- krankenhaus Rendsburg, Abschluss als Krankenpfleger
04.2001 - 09.2001	Tätigkeit als Krankenpfleger im Kreiskrankenhaus Rendsburg
10.2001 - 11.2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Staatsexamen und Approbation als Arzt am 07.11.2007
10.2004	Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
Seit 12.2007	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie der Christian-Albrechts-Universität in der Arbeitsgruppe von Professor Chris- tian Alzheimer