Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakologie

Die Rolle des „*Calcium Homeostasis Endoplasmatic Reticulum*“- Proteins (CHERP) bei der Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Randi Katrin Manegold
aus Iserlohn

- 2007 -

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Jöckel

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. M. Kirsch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2008

Veröffentlichungen

Abstracts:

Meyer zu Heringdorf D, Manegold R, Schwindenhammer Y, Danneberg K, Wang D.-a, Tigyi G, Jakobs KH (2005) Role of CHERP in inositol-1,4,5-trisphosphate-independent calcium mobilization.
Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 371 Suppl R56

Danneberg K, Lipinski M, Vincent M, Schwindenhammer Y, Manegold R, Stropp U, Jakobs KH and Meyer zu Heringdorf D (2002) Inhibitory calcium signalling by overexpressed S1P/Edg-1 receptor in HEK-293 cells.
Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 365 Suppl R21

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6
1.1. Bedeutung des Ca^{2+}-*Signalling* 6
1.2. Ca^{2+}-Mobilisierung durch Sphingolipide 8
1.3. Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Mobilisierung 10
2. Material und Methoden 13
2.1. Material 13
2.1.1. Chemikalien 13
2.1.2. Zellkulturmaterialien 14
2.1.3. DNA-Konstrukte und Antikörper 14
2.1.4. Radiochemikalien 14
2.1.5. Sonstige Materialien 15
2.1.6. Kits 15
2.1.7. Häufig verwendete Pufferlösung 15
2.2. Methoden 16
2.2.1. Zellkultur 16
2.2.2. Transfektion 16
2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford 18
2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung und subzelluläre Lokalisierung von CHERP 18
2.2.5 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ 19
2.2.6. Messung von gespeichertem $^{45}Ca^{2+}$ an permeabilisierten Zellen 22
2.2.7. Präsentation und statistische Auswertung der Messwerte 24
3. Ergebnisse 25
3.1. Die Subzelluläre Lokalisation von CHERP 25
3.2. Die Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Mobilisierung in intakten Zellen 27
3.2.1. Einfluss von CHERP auf die $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch verschiedene Agonisten 27
3.2.2. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Mobilisierung im Vergleich zum Ca^{2+}-Einstrom 31

3.2.3. Einfluss der Expression von CHERP-*antisense* auf S1P-induzierte Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ 33
3.3. Die Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Freisetzung an permeabilisierten Zellen 34
3.3.1. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Speicherung 34
4.3.2. Einfluss von CHERP auf die durch IP_3 und SPC induzierte Freisetzung von $^{45}Ca^{2+}$ 37
4.3.3. Einfluss von CHERP auf die $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung an HEK-293-Zellen, welche nicht durch SPC stimulierbar waren 40
4. Diskussion 41
4.1. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Speicherung 41
4.2. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Mobilisierung durch verschiedene extrazelluläre Agonisten an intakten Zellen 43
4.3. Wirkung von CHERP auf die Ca^{2+}-Freisetzung durch *second messenger* an permeabilisierten Zellen 44
4.4. Intrazellulärer Angriffspunkt der Sphingolipide und die mögliche Rolle von CHERP 46
5. Zusammenfassung 50
6. Literaturverzeichnis 51
Anhang 54
Abkürzungen 54
Danksagung 56
Lebenslauf 57

1. Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des kürzlich entdeckten Proteins CHERP (*Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein*) bei der Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu untersuchen. Im Folgenden sollen die klassischen Wege der Ca^{2+}-Mobilisierung, die aktuell immer mehr an Bedeutung gewinnenden Wege der Ca^{2+}-Mobilisierung über die neueren Transmitter aus der Gruppe der Sphingolipide sowie die bisherigen Erkenntnisse über CHERP kurz dargestellt werden.

1.1. Bedeutung des Ca^{2+}-*Signalling*

Die Ca^{2+}-Homöostase bzw. deren Beeinflussung spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung verschiedenster zellulärer Prozesse. Dabei wird die Konzentration an freiem ionisierten Ca^{2+} im Cytosol durch ATP-verbrauchende Mechanismen im Ruhezustand niedrig gehalten (etwa 100 nM). Im Extrazellulärraum, im Endoplasmatischen Reticulum (ER), welches als der wichtigste intrazelluläre Ca^{2+}-Speicher dient, und in den lysosomalen Speichern herrschen dagegen deutlich höhere Konzentrationen vor (1-2 mM).

Eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch Einstrom von Außen oder Freisetzung von Ionen aus dem ER führt in der Zelle zur Stimulation sog. Ca^{2+}-sensitiver Prozesse. Eine Vielzahl spezieller Proteine reagiert auf die räumlich und zeitlich hoch differenzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und überträgt die Signale in die entsprechenden Antworten der Zelle.

Dazu gehören neben den klassischen Reaktionen wie Muskelkontraktion und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen zahlreiche weitere Vorgänge von Fertilisation und Entwicklung über Zell-Migration, Lernen und Gedächtnis bis hin zu Apoptose und Zelltod, so dass man das ubiquitär vorkommende Ca^{2+} zu den wichtigsten intrazellulären Botenstoffen zählen kann. Hierbei stellt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ die Endstrecke verschiedenster Signaltransduktionswege dar (Berridge *et al*., 2000).

Zur Generierung fein abgestimmter Ca^{2+}-Signale ebenso wie für deren rasche Beendigung verfügt die Zelle über ein aus zahlreichen Komponenten bestehendes

„*Calcium-Signalling-Toolkit*“ (Berrige *et al*., 2000). Die Öffnung von Ca^{2+}-Kanälen kann über drei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden:
1. spannungsgesteuert über Veränderungen des Membranpotentials (sog. *voltage-operated channel, VOC*), 2. getriggert durch den Füllungszustand der Speicher (sog. *store-operated channel, SOC*) oder 3. ligandengesteuert über die Bindung eines spezifischen Agonisten, der die für die Öffnung erforderliche Konformationsänderung des Kanalproteins induziert (sog. *receptor-operated channel, ROC*).
Die ligandengesteuerte Ca^{2+}-Mobilisierung geschieht üblicher Weise in einer Signalkaskade, die mit der Bindung eines Botenstoffes an einen Rezeptor der Plasmamembran beginnt. Vermittelt über G-Proteine, die an der Innenseite der Membran gelegen sind, kommt es zur Aktivierung von Enzymen, die ihrerseits einen zweiten, intrazellulären Botenstoff, einen sog. *second messenger* bilden. Dieser bindet an einen rezeptorgesteurten Ca^{2+}-Kanal und generiert so zunächst über die Ausschüttung von Ionen aus intrazellulären Speichern einen impulsartigen, transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dieser triggert meist noch einen Einstrom von Ca^{2+}-Ionen von Extrazellulär (Clapham, D. E., 1995).

Der etablierteste Signalweg, bei dem ein von einem extrazellulären Agonisten ausgelöstes Signal über Feisetzung von Ionen aus dem ER zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt, ist derjenige über die Phospholipase C (PLC): Die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (*G-protein-coupled receptor*, GPCR) aktiviert die PLC. Wie allgemein bekannt ist, führt die Aktivierung dieses Enzyms zur Bildung von Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). Ersteres bindet an einen ER-ständigen Rezeptor mit Ionenkanalfunktion und setzt so Ca^{2+} ins Cytosol frei (Nahorski *et* Potter, 1989; Berridge, 1993; Wilcox *et al*., 1998).
Während dies lange der einzige detailliert charakterisierte und allgemein akzeptierte Signaltransduktionsweg dieser Art war, sind in den letzten 15 Jahren zunehmend alternative Wege der Ca^{2+}-Mobilisierung über *second messenger* in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt. Inzwischen weiß man auch von zyklischer ADP-Ribose (cADPR) (Cancela *et* Petersen, 1998) und Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAADP) (Genazzini *et* Galione, 1997;

Cancela *et al.*, 1999), dass sie intrazellulär Ca^{2+} freisetzen, cADPR aus dem ER und NAADP aus lysosomalen Speichern.
Unabhängig von seinem Auslösemechanismus ist für den Signalcharakter eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nicht zuletzt seine räumliche und vor allem zeitliche Begrenzung ausschlaggebend. Die schnelle Rückkehr der Zelle in den Ruhezustand wird durch verschiedene ATP-verbrauchende Ionenpumpen gewährleistet: Die Plasma-Membran-Ca^{2+}-ATPase (PMCA) und Na^+/Ca^{2+}-Austauscher schleusen Ca^{2+} nach Extrazellulär, während die Sarco-Endoplasmatisches-Reticulum-ATPase (SERCA) die intrazellulären Speicher wieder auffüllt (Pozzan *et al*., 1994; Blaustein *et* Lederer, 1999).
Auch die Mitochondrien scheinen eine wichtige Rolle bei der vorübergehenden Aufnahme von Ca^{2+} zu spielen und so vor allem an der räumlich-zeitlichen Organisation der Ca^{2+}-Signale entscheidend beteiligt zu sein (Jouaville *et al.*, 1995; Budd *et* Nicholls, 1996; Collins *et al.*, 2000).

1.2. Ca^{2+}-Mobilisierung durch Sphingolipide

Eine besondere Stellung nimmt im Rahmen des Ca^{2+}-*Signalling* die derzeit intensiv beforschte Gruppe der Sphingolipide oder auch Lysophospholipide ein. Hierzu zählen Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Lysophosphatidsäure (LPA). Als Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Plasmamembran generieren sie in verschiedensten menschlichen Zelllinien Ca^{2+}-Signale (Tigyi, 2001; Spiegel *et* Milstien 2003).
Dabei aktivieren sie über ihre verschiedenen Rezeptoren $S1P_{1-5}$ und LPA_{1-3}, die Rezeptoren der sog. EDG-Familie (Fukushima *et al.*, 2001), sowohl den PLC-abhängigen Signalweg als auch einen erst kürzlich beschriebenen PLC-unabhängigen Signalweg über das Enzym Sphingosinkinase (SphK). Dieses erhöht bei Stimulation schnell und vorübergehend die Konzentration von intrazellulärem S1P durch Synthese aus Sphingosin. Dieses wiederum kann ähnlich dem IP_3 Ca^{2+} aus dem ER mobilisieren (s. u.). In den letzten zehn Jahren konnte für eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren eine Aktivierung der SphK nachgewiesen werden: Neben den GPCRs für S1P (Meyer zu Heringdorf *et al.*,

2001) und LPA (Young *et al.*, 2000) steuern z. B. Antigenrezeptoren (Melendez und Khaw, 2002) und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Olivera *et al.*, 1993 und 1999) die SphK an. Dabei ist die Zuordnung von Rezeptor und Signalweg keinesfalls exklusiv: Manche Rezeptoren steuern sowohl die PLC als auch die SphK in einer Zelle an oder je nach Zelltyp das eine oder das andere Enzym.

Die Vielfältigkeit der Sphingolipide wird darüber hinaus durch das inhibitorische Ca^{2+}-*Signalling* über den $S1P_1$-Rezeptor unterstrichen: dieser hemmt bei Aktivierung die durch andere Rezeptoren ausgelösten Ca^{2+}-Anstiege (Meyer zu Heringdorf *et al.,* 2003).

Folgende Abbildung soll die für die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen geltenden Signalwege zusammenfassen:

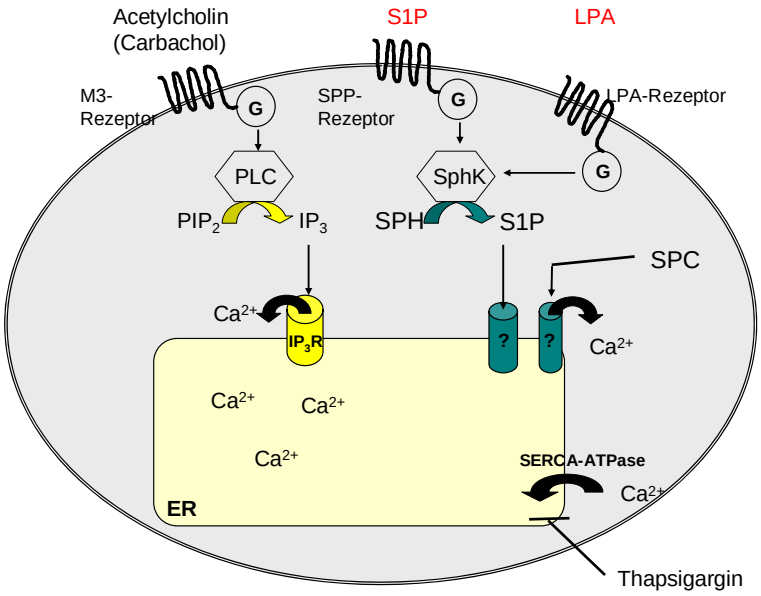


Abb.1: Übersicht zur Signaltransduktion in HEK-293-Zellen

Für HEK-293-Zellen konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres S1P und LPA über GPCRs die SphK aktivieren. Diese bildet S1P, welches wie SPC über einen unklaren Angriffspunkt Ca^{2+} aus dem ER mobilisiert. Dies geschieht unabhängig von der u. a. durch Carbachol aktivierten Kaskade über die PLC.

Ghosh und seine Mitarbeiter konnten an permeabilisierten glatten Muskelzellen als erste zeigen, dass die Lysophospholipide S1P und SPC, auch unabhängig von

Rezeptoren der Plasmamembran, gespeichertes $^{45}Ca^{2+}$ freisetzen und dass dies über einen intrazellulären Angriffspunkt geschehen muss. Hierbei konnte es sich nicht um die IP_3-Bindungsstelle des IP_3-gesteuerten Ca^{2+}-Kanals handeln, da der Effekt auch bei Blockade mit Heparin zu beobachten war (Ghosh *et al.*, 1990, 1994).

Für SPC konnten diese Ergebnisse an verschiedenen Zellen wie Pankreas-Azinus-Zellen, Schilddrüsenzellen, Endothelzellen und embryonale Nierenzellen bestätigt werden (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002). Für S1P konnte die Ca^{2+}-Mobilisierung an permeabilisierten Zellen dagegen von anderen Arbeitsgruppen lange Zeit nicht reproduziert werden. Dass auch S1P intrazellulär und unabhängig von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wirksam ist, wurde jedoch u. a. durch Mikroinjektion an intakten HEK-293-Zellen unter vollständiger Blockade der GPCRs mit Pertussistoxin (PTX) gezeigt (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998). Die Mikroinjektion stellt allerdings u. a. durch die dabei notwendigen hohen Konzentrationen einen nicht unerheblichen Engriff in die Integrität der Zelle dar. Daher war es wichtig, dass es 2003 gelang, zu zeigen, dass intrazellulär durch Photolyse generiertes S1P in der Lage ist, Ca^{2+} zu mobilisieren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003a). Man weiß, dass die Ca^{2+}-Freisetzung, sowohl durch SPC als auch durch S1P aus Thapsigargin-sensitiven Speichern, also dem ER, erfolgt. Die Frage nach dem intrazellulären Angriffspunkt der Sphingolipide und auch danach, ob es sich für SPC und S1P um ein und denselben Rezeptor handelt, ist zurzeit noch nicht beantwortet und Gegenstand intensiver Forschung.

1.3. Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Mobilisierung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des kürzlich entdeckten *Calcium Homeostasis Endoplasmatic Reticulum Protein* (CHERP) bei der Calcium-Mobilisierung zu untersuchen.

CHERP, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 100 kD und zwei Transmembrandomänen, wurde im Jahr 2000 mittels eines Antikörpers aus einer Expressionsbibliothek von humanen Erythroleukämiezellen (HEL-Zellen) isoliert (La Plante *et al.*, 2000). In diesen Zellen wurde mittels Immunzytochemie

nachgewiesen, dass CHERP mit dem IP_3-Rezeptor der ER-Membranen kolokalisiert (La Plante *et al*., 2000; O`Rourke *et al.*, 2003). Die 4,0 kb-mRNA des CHERPs ließ sich in allen menschlichen Zelllinien nachweisen. Herz- und Skelettmuskelzellen, die durch die Spezialisierung auf die Kontraktion einen hoch differenzierten Calciumstoffwechsel besitzen, verfügen über ein zusätzliches 6,4 kb –Transkipt (La Plante *et al*., 2000; O`Rourke *et al.*, 2003).
Transfiziert man HEL-Zellen mit einem CHERP-*antisense*-Konstrukt, reduziert also die Expression des Proteins, so kommt es zu einer massiven Proliferationshemmung sowie zu einer deutlichen Verminderung der Thrombin-induzierten Ca^{2+}-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern (La Plante *et al*., 2000; O`Rourke *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass CHERP einen Einfluss auf das Rezeptor-vermittelte Ca^{2+}-*Signalling* ausübt. Über seine genaue Funktion in diesem Zusammenhang war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Daher untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen der CHERP-Überexpression auf

1. die Ca^{2+}-Speicherung
2. die Ca^{2+}-Mobilisierung durch verschiedene Agonisten
3. die Ca^{2+}-Freisetzung durch intrazelluläre Stimuli

Hierzu wurden HEK-293-Zellen verwendet, die auch endogen CHERP exprimieren, was mittels PCR nachgewiesen wurde. Die gewählte HEK-Zell-Linie HEK-293 exprimiert außerdem endogen stabil den M_3-Rezeptor, einen muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor, sowie G-Protein-gekoppelte S1P- und LPA-Rezeptoren. Dementsprechend untersuchten wir die Wirkung der CHERP-Überexpression (bzw. der reduzierten CHERP-Expression durch Transfektion mit CHERP-*antisense*) auf die Stimulation mit den extrazellulären Botenstoffen Carbachol, Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA).
Im nächsten Schritt galt es, festzustellen, inwieweit die Ca^{2+}-Mobilisierung durch *second messenger* von CHERP beeinflusst wurde. Hierbei wurde zunächst der Einfluss von CHERP auf die Wirkung von IP_3 untersucht, welches über ein Rezeptorprotein mit Ionenkanalfunktion Ca^{2+} aus dem ER freisetzt. Als nächstes sollte dann der Einfluss von CHERP auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung durch

„neuere“ Substanzen mit *second messenger*-Funktion, die Sphingolipide S1P und SPC untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien	Hersteller/Lieferfirma
ATP	Boehringer Mannheim
BSA, fettsäurefrei	Sigma
Chloroquin	Sigma
Carbachol	Sigma
Digitonin	Sigma
EGTA	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Fura-2/AM	Molecular Probes
Glycerol	Sigma
HEPES	Serva
IP_3	Biomol
Kreatinkinase	Sigma
Kreatinphosphat	Sigma
LPA	Sigma
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	Merck
Mowiol	Calbiochem
Saponin	Sigma
S1P	Biomol
SPC	Biomol

2.1.2. Zellkulturmaterialien

	Hersteller/Lieferfirma
DMEM/F12 (Kulturmedium)	Gibco
FKS	Gibco/Biochrom
G418	Gibco-BRL
P/S-Lösung (10 000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin)	Gibco/Seromed
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius
Trypanblau	Seromed, Biochrom
Zellkulturschalen (ø 145 mm)	Greiner
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

2.1.3. DNA-Konstrukte und Antikörper

	Hersteller/Lieferfirma
pcDNA3.1-Vektor	Invitrogen
humanes CHERP in pcDNA3.1-Vektor	De-an Wang, Memphis
CHERP-*antisense* in pcDNA3.1-Vektor	Kerstin Danneberg, Essen
pECFP-ER	Clontech
pECFP-Golgi	Clontech
Anti-FLAG-Antikörper (Maus)	Stratagene
Anti-Maus IgG/FITC-Konjugat	Sigma

2.1.4. Radiochemikalien

	Hersteller/Lieferfirma
$^{45}CaCl_2$ Spezifische Aktivität: ca. 50 mCi/mg	NEN Life Science products

2.1.5. Sonstige Materialien

	Hersteller/Lieferfirma
Glasfaserfilter (GF/C)	Whatman
Emulsifier Scintillator Plus/299	Packard
Kunststoff-Einmalküvetten	Sarstedt
Pasteurpipetten	Brand
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 3,5 ml, 6,5 ml)	Sarstedt
Szintillationsgefäße	Packard

2.1.6. Kits

	Hersteller/Lieferfirma
Plasmid-Reinigungs-Kit: „Plasmid-Mega-Kit“	Qiagen

2.1.7. Häufig verwendete Pufferlösung

HBSS-Puffer (pH 7,4):

NaCl	118 mM
KCl	5 mM
$CaCl_2$	1 mM
$MgCl_2$	1 mM
Hepes	15 mM
Glucose	5 mM

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

HEK-293-Zellen wurden in DMEM/F12-Medium mit Zusatz von 10 % FKS, 1 % P/S-Lösung und 0,5 mg/ml G418 bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Bei 70-90 % Konfluenz wurden die Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom abgelöst, zur Subkultivierung auf weitere Kulturschalen aufgeteilt und mit frischem Kulturmedium versorgt. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen serumdepletiert, d. h. mit Serum-freiem Medium einmal gewaschen und anschließend mit diesem unter sonst gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Mindestens 24 h vor dem Experiment wurde außerdem die G418-Exposition beendet.

Alle der folgenden Untersuchungen wurden an HEK-293-Zellen in Suspension vorgenommen. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 4°C kaltem HBSS abgelöst, 5 min bei 500 x g zentrifugiert, einmal in HBSS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in HBSS wurden die Zellen bis zum Beginn des Experiments auf Eis gelagert.

Zur Einstellung der für das jeweilige Experiment gewünschten Zellzahl wurde entweder eine Proteinbestimmung (s. u.) oder eine Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

2.2.2. Transfektion

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden nach der Calciumphosphatmethode transient transfiziert. Das CHERP-Konstrukt (NCBI Accession-Nr. NM006387) wurde freundlicher Weise von De-an Wang (University of Tennessee, Memphis, USA) zur Verfügung gestellt. Bei dem Vektor handelte es sich um ein pcDNA3.1-Plasmid. Zur DNA-Gewinnung wurde dieses in Bakterienkultur (E. coli in LB-Medium) vervielfacht und mit Hilfe des „Plasmid-Mega-Kits“ der Firma Qiagen isoliert. Das CHERP-Konstrukt war N-terminal FLAG-*tag*-gekoppelt, so dass das exprimierte Protein durch Immunfärbung

darstellbar war, was man sich u. a. bei der Kontrolle der Transfektionseffizienz zu Nutze machte.
Die in dieser Arbeit als Kontrollen verwendeten Zellen wurden der gleichen Behandlung unterzogen wie die CHERP-Zellen, nur dass an Stelle des CHERP-Gens mit dem entsprechenden „leeren“ pcDNA3.1-Plasmid transfiziert wurde. Der gesamte Transfektionsvorgang fand unter sterilen Bedingungen statt.

Es wurden 100 µg DNA pro zu transfizierender Zellkultur-Schale verwendet, die zunächst mit 25 µl 3 M Na-Acetat-Lösung und 250 µl 100%-igem Ethanol ausgefällt wurden. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 13000 U/min wurde der Überstand abgenommen und es wurde mit 500 µl 70%-igem Ethanol einmal gewaschen. Nach Entfernen des Alkohols wurden je 100 µg DNA in 700 µl sterilem Wasser resuspendiert und mit 300 µl 2M $CaCl_2$ versetzt. Phosphat zur Kristallbildung wurde in Form von 1 ml kaltem HeBS 2x-Puffer (s. u.) tröpfchenweise zugegeben. Nach 10 min wurde die auskristallisierte DNA auf die mit einer Endkonzentration von 0,1 mM Chloroquin vorbehandelten Zellen gegeben.
Nach vierstündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt und für 2 min 5 ml mit 15 % Glycerol versetzter HeBS-Puffer zur Steigerung der Transfektionseffizienz auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit Serum-freiem Medium gewaschen und anschließend unter o. g. Bedingungen weiterkultiviert. Die Versuche fanden am 2. oder 3. Tag nach Transfektion statt.

HeBS 2x-Puffer (pH 7,05):
280 mM NaCl
50 mM HEPES
1,48 mM Na_2HPO_4

2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte photometrisch mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie-Blue, der in Proteinbindung ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweist. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Proteinstandardlösung (γ-Globulin-Lyophilisat vom Rind) verwendet. Die Bestimmungen erfolgten in Doppelwerten. Je 0, 10, 20, 30 und 40 µl der Standardlösung wurden genauso wie die zu untersuchenden Proben in Küvetten pipettiert und mit H_2O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt. Frühestens 5 min, spätestens 60 min nach Zugabe von 200 µl Bradford-Farbreagenz wurde die Extinktion bei 595 nm im Spektrophotometer (LKB Biochrom Ultraspec II, Pharmacia) gemessen. Aus den Standardwerten wurde durch lineare Regression eine Eichgerade erstellt, an Hand derer mit dem eingesetzten Probenvolumen und der gemessenen Extinktion die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden konnte.

2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung und subzelluläre Lokalisierung von CHERP

Die CHERP-DNA im pcDNA3.1-Vektor ist an ein FLAG-*tag* gekoppelt. Somit lässt sich das exprimierte Protein mit einem Anti-FLAG-Antikörper markieren. Bindet hieran wiederum ein Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter zweiter Antikörper, so wird CHERP unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Für die Färbung wurden die transfizierten Zellen auf speziellen, zur Zellkultur geeigneten Objekträgern (*culture slides,* Falcon) kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden sie 4 min mit Methanol auf Eis fixiert und nochmals gewaschen. Eine einstündige Inkubation mit HBSS/Milchpulver-Suspension bei 37° C diente der Verminderung der Hintergrundfärbung. Nach Entfernung des Milchpulvers wurde für eine Stunde mit Anti-FLAG-Mäuseantikörper (Verdünnung in HBSS/BSA 1 % gemäß Herstellerangaben) bei weiterhin 37° C inkubiert. Den gewaschenen Zellen wurde nochmals für eine halbe Stunde Milchpulver zugesetzt, bevor dann für eine Stunde die Inkubation mit dem FITC-konjugierten

Anti-Maus-Antikörper (Verdünnung in HBSS/BSA 1 % gemäß den Herstellerangaben) stattfand. Nach erneutem Waschen wurde der *culture slide*-Aufsatz mit Hilfe von Ethanol entfernt. Nach Aufpipettieren des Klebstoffes Mowiol auf die angetrockneten Zellen konnte das Ganze mit einem Deckgläschen versehen werden. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, die bei den für die Experimente verwendeten Zellen bei ca. 30 % lag, wurden die gefärbten Zellen mit dem FITC-Filter eines Zeiss Axiovert 100-Fluorezenzmikroskops betrachtet. Zur genaueren Analyse der subzellulären Lokalisation von CHERP wurden die Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Zeiss, Objektiv Plan-Apochromat 63x / 1.4 oil / DIC) analysiert. Die Exzitation erfolgte mit Laserlicht der Wellenlänge 514 nm, die Emission wurde bei Wellenlängen über 530 nm gemessen. Durch zusätzliche Transfektion der Zellen mit kommerziell erhältlichen, organell-spezifischen Markerproteinen wurde die Zuordnung der CHERP-Lokalisation zu definierten Zellorganellen ermöglicht. Bei den verwendeten Markerproteinen handelte es sich um *cyan-fluorescent-protein* (CFP), ein fluoreszierendes Protein, welches je nach Erkennungssequenz spezifisch im Endoplasmatischen Reticulum (ER-CFP) oder im Golgi-Apparat (Golgi-CFP) exprimiert wird. Am zweiten oder dritten Tag nach Transfektion wurden die Zellen nach oben beschriebener Vorgehensweise mit anti-FLAG und FITC-konjugiertem anti-Maus-Antikörper gefärbt. Zusätzlich zu FITC-spezifischen Wellenlängen (s. o.) wurden die CFP-spezifischen Wellenlängen eingesetzt (Exitation: 458 nm, Emission: LP 475 nm). In der überlagernden Darstellung beider Anregungswellenlängen lässt sich dann eine räumliche Beziehung von CHERP zum markierten Zelllorganell ableiten. Die Betrachtung erfolgte wie oben beschrieben unter einem Laser-Scanning-Mikroskop und die Ergebnisse wurden mit einer Pixeldichte von 1024 x 1024 pixel dokumentiert.

2.2.5. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

Die Konzentration von freiem intrazellulärem Ca^{2+} wurde fluoreszenzspektrometrisch nach der Methode von Grynkiewicz *et al.* (1985) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2/AM und eines Spektrofluorometers (Hitachi F-2000) bestimmt.

Hierbei wird der membrangängige Pentaacetomethoxyester (AM-Ester) des Fura-2 den intakten Zellen zugegeben, wobei er ins Zytoplasma diffundiert. Hier wird er durch unspezifische Esterasen hydrolysiert. Für freies apolares Fura-2 ist die Membran impermeabel, was dazu führt, dass es in der Zelle akkumuliert. Es bindet nun cytosolisches Ca^{2+}, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen der freien und der Ca^{2+}-gebundenen Form einstellt. Da sich die beiden Formen in ihren Anregungsspektren unterscheiden, ist es nun möglich, anhand der Fluorezenzmessung bei Kenntnis der Dissoziationskonstante Fura-2/Ca^{2+} die aktuelle $[Ca^{2+}]_i$ zu berechnen (siehe unten).

Beladen der Zellen

Den wie oben beschrieben in HBSS gewaschenen und nun in Suspension befindlichen Zellen wurde Fura-2/AM in einer Endkonzentration von 1 µM zugesetzt. Sie wurden eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert, erneut zweimal in HBSS gewaschen und dann mit einer Zellzahl von $1x10^6$ auf Küvetten verteilt.

Messung

Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. Unter kontinuierlich wechselnden Anregungswellenlängen von 340 nm (Ca^{2+}-gebundenes Fura-2) und 380 nm (Ca^{2+}-freies Fura-2) wurde die Emission bei 510 nm gemessen.
Die beiden Emissionskurven wurden während des ganzen Experiments am Bildschirm des Fluoreszenzspektrometers verfolgt. Nach Einstellung einer ruhigen Basislinie wurde nach 30 s bis 60 s der in der jeweiligen Untersuchung zur Stimulation verwendete Agonist zugesetzt. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führte zur Verschiebung zu Gunsten der Ca^{2+}-gebundenen Form von Fura-2.
Nach Abklingen des Stimulationsmaximums wurde die maximale Emission von Fura-2 in der Ca^{2+}-gebundenen Form (F_{digi} oder F_{max}) durch Permeabilisierung der Zelle mit 0,02 % Digitonin bestimmt.
Nach Behandlung der Zellen mit dem Komplexbildner EGTA (10 mM), wurde das Emissionsmaximum der Ca^{2+}-freien Form von Fura-2 (F_{EGTA} bzw. F_{min}) ermittelt.

Zur genaueren Differenzierung von Ca^{2+}-Anstiegen wurden außerdem Messungen in funktionell Ca^{2+}-freiem Medium durchgeführt. Der hierfür verwendete Puffer enthielt 50 µM EGTA, um zunächst eine subnanomolare $[Ca^{2+}]$ zu gewährleisten, die durch Fura-2 nicht detektiert werden konnte. Im Verlauf des Experiments wurden 1 mM $CaCl_2$ zugesetzt und weitere Messwerte erhoben. Die Lyse der Zellen und die abschließende Komplexierung wurden anschließend wie gewohnt durchgeführt.

Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde aus den Werten der Fluoreszenzmessung nach der Ratio-Methode von Grynkievicz (Grynkievicz *et al*., 1985) nach folgender Gleichung berechnet:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R_t - R_{min}) / (R_{max} - R_t) \times F_{min380} / F_{max380}$$

$[Ca^{2+}]_i$ = intrazelluläre Calciumkonzentration zum Zeitpunkt t

K_d = Dissoziationskonstante Fura-2 /Ca^{2+} bei 37°C (224 nM)

R_t = F_{max} / F_{min} zum Zeitpunkt t

R_{max} = F_{max340} / F_{max380} nach Permeabilisierung in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+}

R_{min} = F_{max340} / F_{max380} nach Permeabilisierung und Zugabe von 4 nM EGTA

F_{max380} = Intensität der Emission bei l=380 nm nach Permeabilisierung

$F_{min\ 380}$ = Intensität der Emission bei l= 380 nm nach Permeabilisierung und Zugabe von 10 mM EGTA

2.2.6. Messung von gespeichertem $^{45}Ca^{2+}$ an permeabilisierten Zellen

Das Prinzip dieses Experiments besteht darin, die Ca^{2+}-Speicher der Zelle mit radioaktivem $^{45}Ca^{2+}$ aufzufüllen, welches sich anschließend anhand der Szintillationsmessung quantifizieren lässt. Dadurch kann man sowohl das Speicherungsverhalten der Zellen untersuchen, als auch das Ausmaß der Ca^{2+}-Freisetzung nach Stimulation.

Die Zellen wurden hierzu zunächst mit der Substanz Saponin behandelt, welche selektiv die Plasmamembran permeabilisiert, während die Membranen des ERs intakt bleiben. Den Zellen wurde nun $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben, welches durch energieverbrauchende Prozesse ins ER aufgenommen wird. Die Anwesenheit von Kreatinphosphat und Kreatinkinase ermöglichte die Regeneration des verbrauchten ATPs, so dass dies keinen limitierenden Faktor der Ca^{2+}-Speicherung darstellte.

Da die Plasmamembran als Barriere wegfällt, konnten zur Stimulation Substanzen mit intrazellulärem Angriffspunkt zugegeben werden, deren Wirkung sich an intakten Zellen kaum untersuchen ließe.

Nach Abstoppen der Reaktion blieben im Filter die intakten Membranen des ERs und somit das darin befindliche $^{45}Ca^{2+}$ zurück, während der bei einer Stimulation ins Cytosol freigesetzte Anteil den Filter passierte und verworfen wurde.

Permeabilisierung und Inkubation mit $^{45}Ca^{2+}$

Die Zellen wurden in HBSS abgelöst, gewaschen und nach Resuspension in Assay-Puffer (siehe unten) bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Währenddessen wurde eine Proteinbestimmung wie oben beschrieben durchgeführt und anschließend die Zellsuspension auf 4 mg Protein pro ml eingestellt. Der Reaktionsmix wurde ebenfalls auf Eis angesetzt, indem dem 2x- Perm-Puffer (siehe unten) Kreatinphosphat, Kreatinkinase, Saponin und $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben wurden. Die Experimente fanden im Wasserbad bei 37°C statt, wo die Zellen ebenso wie der Reaktionsmix nach Zugabe von ATP vor Beginn 5 min akklimatisiert wurden. Mit Zugabe von Zellsuspension zum Reaktionsmix startete die Permeabilisierung und Speicherung bei folgenden Endkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 100 µl: 135 mM KCl, 2,5 mM MgCl, 0,05 mM EGTA,

0,02 mM CaCl, 20 mM HEPES, 30 µg/ml Saponin, 10 mM Kreatinphosphat, 10 U/ml Kreatinkinase, 1 mM ATP und 0,2 µCi /Reaktionsgefäß $^{45}Ca^{2+}$.

Messung des Zeitverlaufs der $^{45}Ca^{2+}$-Speicherung

Die Reaktionsgefäße, in denen Zellen in Reaktionsmix jeweils in An- oder Abwesenheit von ATP inkubiert wurden, wurden einem strengen Zeittakt folgend nach exakt 30 s, 1 min, 3 min oder 10 min aus dem Wasserbad entnommen und die Reaktion mittels Zugabe 2,5 ml eiskalten Stopp-Puffers (siehe unten) beendet.

Stimulation mit intrazellulären Botenstoffen

Die zur Stimulation verwendeten intrazellulären Botenstoffe waren IP_3 und SPC, die in verschiedenen Endkonzentrationen nach einer Speicherungszeit von 5 min dem Reaktionsansatz beigemischt wurden. Für Kontrollmessungen wurde das gleiche Volumen (10 µl) in Form der Lösungsmittel H_2O bzw. BSA zugeben. Nach einer Stimulationszeit von 5 min wurde ebenfalls mit 2,5 ml eiskaltem Stopp-Puffer abgestoppt.

Filtration und Radioaktivitätsbestimmung

Die mit Stopp-Puffer behandelte Zellsuspension wurde über einen Glasfaserfilter abfiltriert. Nach zweimaligem Waschen mit je 2,5 ml Stopp-Puffer wurde die im Filter zurückgebliebene Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Das Filtermaterial wurde hierzu in Szintillationsgefäße gegeben und mit 5 ml Szintillatoremulsion aufgefüllt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Assay-Puffer

KCl	135 mM
MgCl	2,5 mM
EGTA	1 mM
Hepes pH 7,1	20 mM

Stopp-Puffer

KCl	150 mM
MgCl	5 mM
EGTA	1 mM
Hepes pH 7,1	20 mM

2x-Perm-Puffer

KCl	270 mM
MgCl	5 mM
EGTA	2 mM
Hepes pH 7,1	40 mM

2.2.7. Präsentation und statistische Auswertung der Messwerte

Die Graphiken wurden mit dem Programm Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt. Die statistische Auswertung der Daten zur Ca^{2+}-Messung erfolgte mit Hilfe des *one-sample t-test*.

3. Ergebnisse

3.1. Die Subzelluläre Lokalisation von CHERP

Die Lokalisation von CHERP in der Zelle wurde in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dazu wurden die Zellen jeweils mit einem bekannten, organellspezifischen Marker transfiziert. Geeignet waren hierfür Konstrukte des *cyan fluorescent proteins* (CFP), die mit Erkennungssequenzen entweder für das ER oder den Golgi-Apparat gekoppelt waren. Die Überexpression von ER-CFP oder Golgi-CFP markierte folglich die genannten Organellen durch Fluoreszenz des CFP.

Die Zellen wurden außerdem mit CHERP transfiziert. Dieses ließ sich durch einen Antikörper gegen sein FLAG-*tag* und einen wiederum daran bindenden, fluoreszierenden Antikörper ebenfalls spezifisch markieren.

Abbildung 2 zeigt mit CHERP transfizierte HEK-293-Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Im ersten Bild der oberen Reihe erfolgte die Anregung mit Licht der Wellenlänge 458 nm, was zur Fluoreszenz (blau) des Golgi-Markers CFP-Golgi führte. Im zweiten Bild fluoreszierte unter 514 nm das FLAG-gekoppelte CHERP (gelb). Die überlagernde Darstellung durch Anregung mit Licht beider Wellenlängen im dritten Bild zeigte die räumliche Unabhängigkeit von Golgi-Apparat und CHERP, d. h. CHERP kommt in den Membranen des Golgi nicht vor.

In der zweiten Reihe wurde ebenso verfahren. CFP (blau) markierte hier jedoch spezifisch das ER. In der Überlagerung war die blaue ER- von der gelben CHERP-Fluoreszenz räumlich nicht zu trennen, was in einem grünen Farbeindruck resultierte.

Das Ergebnis dieser Immunfärbung bestätigt für die hier verwendeten HEK-293-Zellen das, was La Plante *et al*. bereits durch Co-Lokalisierung mit dem IP_3-Rezeptor für HEL-Zellen gezeigt hatten: CHERP ist Bestandteil der ER-Membranen (La Plante *et al*., 2000).

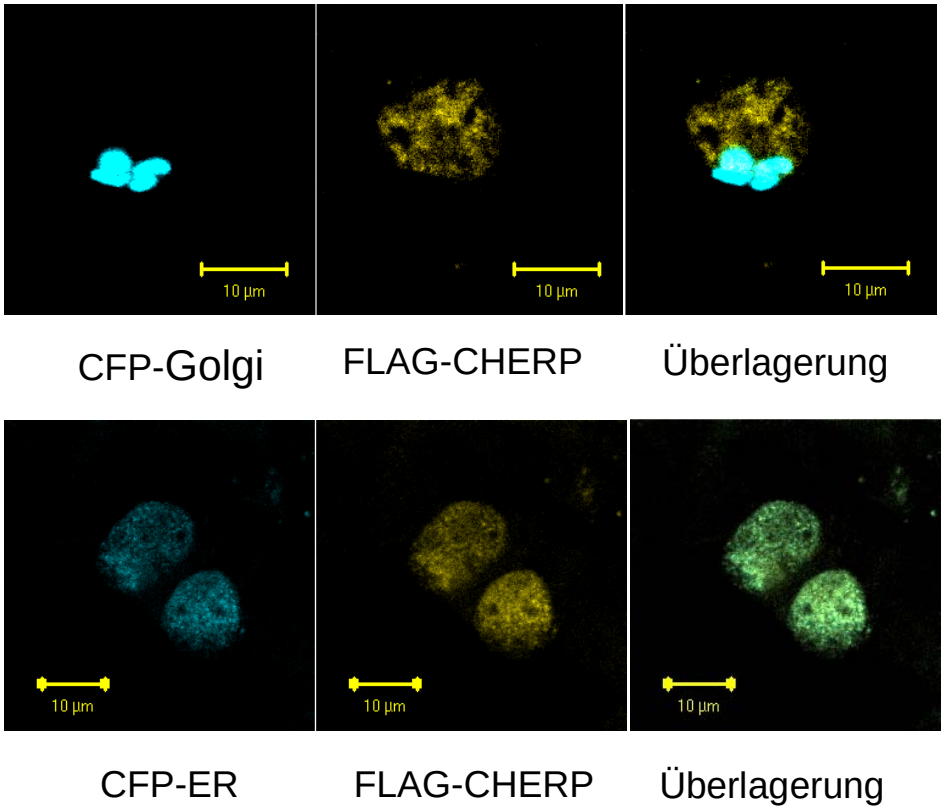


Abb. 2: Immunfärbung von FLAG-gekoppeltem CHERP in CFP-Golgi und CFP-ER transfizierten Zellen

Die Zellen wurden mit CHERP und entweder CFP-Golgi oder CFP-ER transfiziert. Am zweiten oder dritten Tag nach Transfektion wurde CHERP mit einem anti-FLAG und einem FITC-konjugierten Antikörper gefärbt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

3.2. Die Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Mobilisierung in intakten Zellen

3.2.1. Einfluss von CHERP auf die $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch verschiedene Agonisten

Die Arbeitsgruppe um La Plante hatte bereits gezeigt, dass die Transfektion von HEL-Zellen mit CHERP-*antisense* die Thrombin-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung vermindert (La Plante *et al*., 2000). Über den dafür verantwortlichen Mechanismus und vor allem den Einfluss von CHERP auf andere Ca^{2+}-mobilisierende Agonisten war nichts bekannt. In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der CHERP-Überexpression auf $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch Carbachol, S1P, LPA und Thapsigargin gemessen.

Carbachol induziert in den hier verwendeten HEK-293-Zellen $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege über den stabil transfizierten M_3-Muskarinrezeptor, welcher stark an den PLC/IP_3-Signalweg koppelt (Sandmann *et al.*, 1991). S1P und LPA sind Agonisten an G-Protein-gekoppelten Lysophospholipid-Rezeptoren (Ishii *et al*., 2004). S1P induziert in HEK-293-Zellen $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege ohne dabei eine messbare PLC-Aktivierung auszulösen (Meyer zu Heringdorf *et al*., 2001). Dagegen spielt der SphK/S1P-Signalweg eine entscheidende Rolle für S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege in diesen Zellen (Meyer zu Heringdorf *et al*., 2001). Auch LPA-Rezeptoren können diesen Signalweg zur Induktion von $[Ca^{2+}]_i$-Anstiegen verwenden (Young *et al*., 2000).

CHERP-Überexpression übte keinen Effekt auf die Carbachol-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung aus. Weder bei Stimulation im Bereich submaximal wirksamer Konzentrationen von 0,3 µM, noch bei maximal wirksamen Konzentrationen von 100 µM Carbachol zeigte sich ein signifikanter Unterschied im $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg zwischen CHERP- und Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu fielen die Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ bei Stimulation mit S1P in CHERP-transfizierten Zellen um ca. 40 % höher aus als in den Kontrollen (Abb. 3).

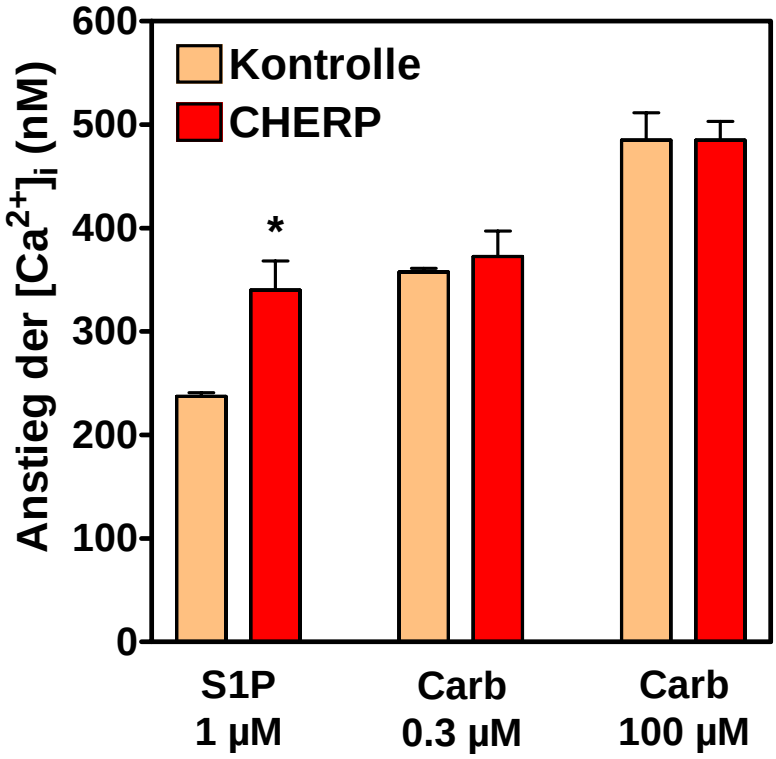


Abb. 3: Einfluss von CHERP-Überexpression auf den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Carbachol und S1P

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Die mit Fura-2 beladenen HEK-293-Zellen wurden mit den Agonisten Carbachol und S1P in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die im Hitachi-Fluoreszenzspektrometer gemessenen Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ sind in nM angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- S.D. aus einem repräsentativen Experiment, das in 3 -fach Bestimmung durchgeführt wurde. * $p < 0,05$

Weiterhin wurde der Einfluss von CHERP-Überexpression auf Thapsigargin-induziert $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege überprüft. Die Substanz Thapsigargin ist ein Hemmstoff der *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+} *ATPase* (SERCA), einer Ionenpumpe, die ATP-abhängig Ca^{2+}-Ionen aus dem Cytosol ins ER rücktransportiert. Bei ihrer Hemmung läuft der Ca^{2+}-Gehalt der Speicher aus, so dass Thapsigargin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege abhängig sind vom Füllungszustand des ER.

In CHERP-transfizierten HEK-293-Zellen unterschied sich die basale $[Ca^{2+}]_i$ mit Werten von 50 bis 60 nM nicht von der der vektortransfizierten Kontrollzellen (Abb.

4). Auf Stimulation mit S1P reagierten die CHERP überexprimierenden Zellen mit einer Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ um ca. 300 % des Ausgangswertes, während dieser Anstieg in Kontrollzellen ungefähr 100 % des Ausgangswertes betrug.

Im Gegensatz dazu zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem durch Thapsigargin ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg, er betrug in beiden Zelltypen mehr als 300 % des Basalwertes (Abb. 4).

CHERP scheint also keinen Einfluss auf die Ca^{2+}- Speicherung auszuüben. Man könnte auch sagen, die deutlich verstärkte Reaktion auf S1P lässt sich weder durch eine höhere Basalkonzentration noch durch einen höheren Füllungsgrad der Speicher erklären.

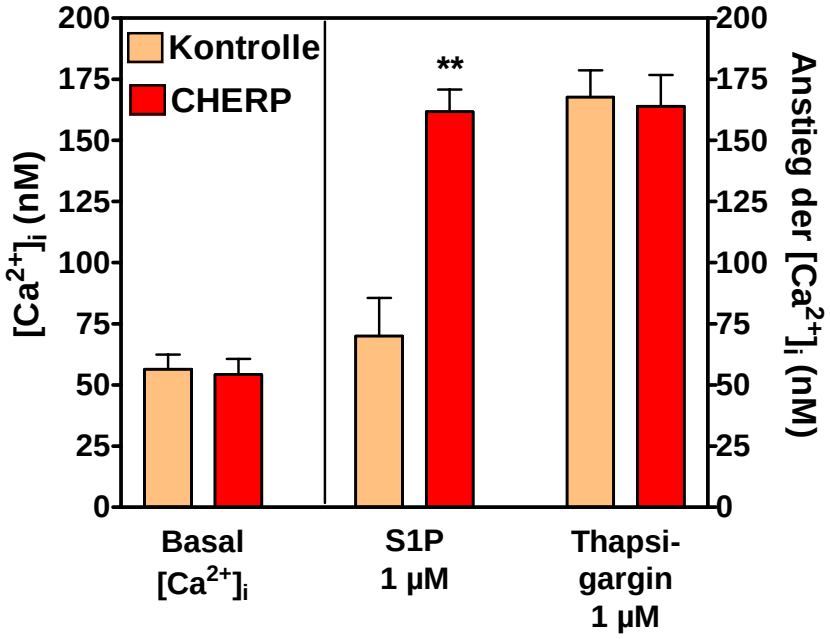


Abb. 4 : Einfluss von CHERP-Überexpression auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ und Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ durch S1P und Thapsigargin

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. In den mit Fura-2 beladenen HEK-293-Zellen wurde zunächst die basale $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt (angegeben in nM). Dann wurde mit den Agonisten S1P und der SERCA-Hemmstoff Thapsigargin in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. In der linken Hälfte der Abb. ist die basale $[Ca^{2+}]_i$ dargestellt, in der rechten der Stimulus-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg. Die Daten sind Mittelwerte +/- S.D. aus einem repräsentativen Experiment, das in 3 -fach Bestimmung durchgeführt wurde. ** $p < 0,01$

Die folgende Abbildung 5 fasst den Effekt der CHERP-Überexpression auf Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ an intakten HEK-293-Zellen durch verschiedene Stimulantien zusammen.

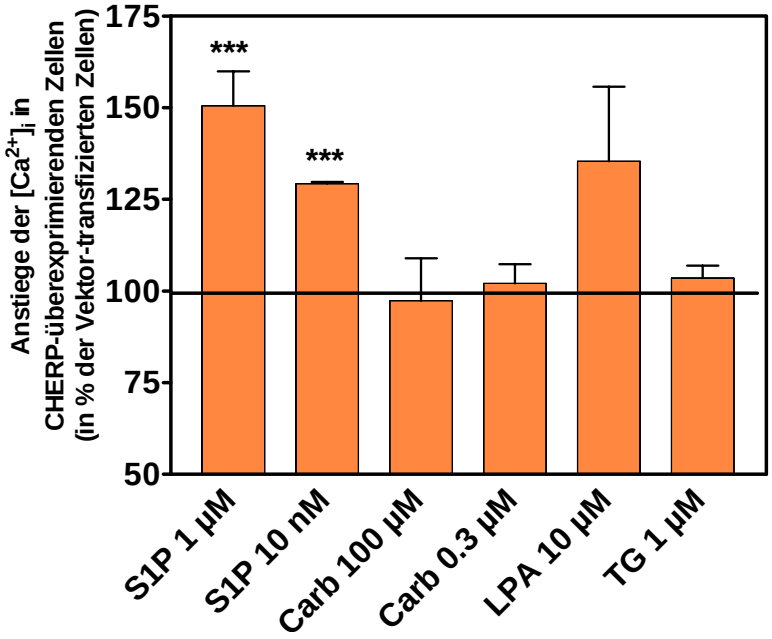


Abb. 5: Zusammenfassung des Einflusses von CHERP-Überexpression auf die Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ durch verschiedene Substanzen

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Die Messung erfolgte am zweiten oder dritten Tag nach Transfektion. Die mit Fura-2 beladenen HEK-293-Zellen wurden mit den Ca^{2+}-mobilisierenden Substanzen nach etwa 60 s in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ werden angegeben in % des Anstieges in Kontroll-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- S.E.M.) aus einer verschiedenen Anzahl unabhängiger Experimente, (S1P 1 µM n = 16, S1P 10 nM n = 3, Carb 100 µM n = 3, Carb 0,3 µM n = 5, LPA 10 µM n = 2, TG 1 µM n = 4, *** $p < 0,001$)

Die Überexpession von CHERP steigerte S1P-induzierte Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ auf im Mittel 129,3 +/- 0,5 % des Anstieges in Kontrollzellen bei Stimulation mit 10 nM und auf im Mittel 150,5 +/- 9,3 % bei Stimulation mit 1 µM S1P. Die durch Carbachol ausgelösten Anstiege wurden mit 97,3 +/-11,6 % bei 100 µM bzw. 102 +/- 5,3 % bei 0,3 µM nicht beeinflusst. Eben sowenig wie die Thapsigargin induzierten Anstiege mit 103,5 +/- 3,4 %. Die Daten für das Sphingolipid LPA scheinen auf eine Steigerung der Ca^{2+}-Freisetzung unter CHERP-Einfluss

hinzuweisen, sind jedoch nicht signifikant. Für sichere Aussagen sind hier weitere Experimente erforderlich.

3.2.2. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Mobilisierung im Vergleich zum Ca^{2+}-Einstrom

Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ können prinzipiell sowohl durch Freisetzung der Ionen aus intrazellulären Speichern, als auch durch deren Einstrom von Extrazellulär bedingt sein. Bei vielen Signalen findet man eine Kombination beider Wege: die Liganden setzen durch spezifische Bindung an einen Rezeptor zunächst Ca^{2+} aus dem ER frei, woraufhin der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bzw. die Entleerung der Ca^{2+}-Speicher einen weiteren Einstrom von außen auslöst (Berridge *et al*. 2000).
Wird die Messung in Ca^{2+}-freiem Medium durchgeführt, so ist letzterer Teil des Signals solange nicht möglich, bis Ca^{2+} wieder zugesetzt wird. Auf diese Weise kann man beide Komponenten getrennt darstellen. Werden CHERP- und Kontrollzellen vergleichend untersucht, so erhält man weiteren Aufschluss darüber, welche Teile des Signals durch die Überexpresssion beeinflusst werden.

Abbildung 6a zeigt die $[Ca^{2+}]_i$ in intakten HEK-293-Zellen nach Beladung mit Fura-2/AM. Zu sehen ist die Kurve der $[Ca^{2+}]_i$ über der Zeit, in der Form, wie sie bei allen hier durchgeführten Ca^{2+}-Messungen auf dem Monitor des *Hitachi*-Fluoreszenzspektrometers verfolgt werden konnte. Wie man sieht, betrug die $[Ca^{2+}]_i$ im Ruhezustand (Baseline, Phase 1) unabhängig von der CHERP-Transfektion ca. 50 nM. Nach Stimulation mit 1 µM S1P kam es zum raschen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. In vektortransfizierten Zellen erreichte er maximal Bereiche von 100 nM. In CHERP-Zellen lag der Spitzenwert mit über 140 nM deutlich darüber (Phase 2). In beiden Zelltypen wurde die Baseline etwa 60 s nach Stimulation wieder erreicht (Phase 3). Auf Zugabe von 1 mM $CaCl_2$ zum Medium reagierten sie nun mit einem erneuten Anstieg. Diesmal zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CHERP- und Kontrollzellen.

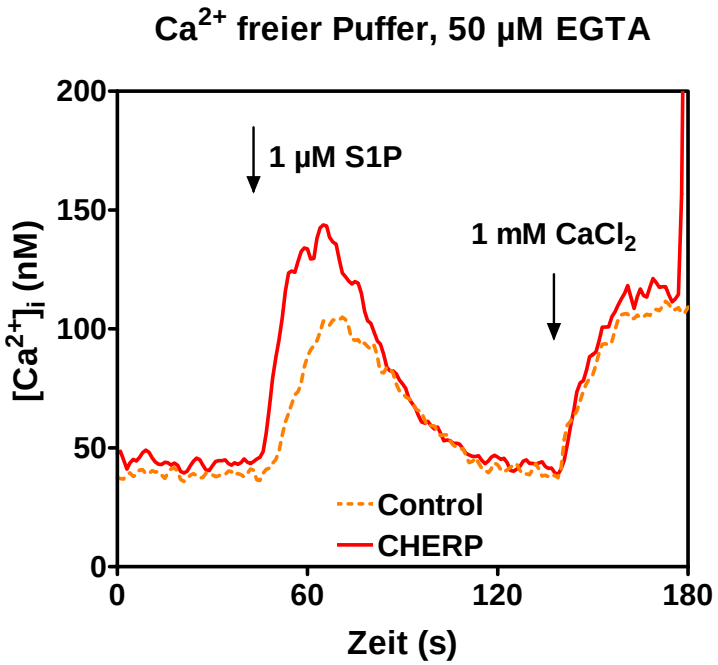


Abb. 6a: Einfluss von CHERP auf Ca^{2+}-Mobilisierung und Ca^{2+}-Einstrom

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Mit Fura-2/AM beladene HEK-293-Zellen wurden in Ca^{2+}-freiem Medium in Anwesenheit von 50 µM EGTA nach Einstellung einer stabilen Baseline nach etwa 60 s mit 1 µM S1P stimuliert. Nach Rückkehr in den Ruhezustand wurden dem Medium 1 mM $CaCl_2$ zugesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Einzelexperiment.

Besonders deutlich wird der Einfluss von CHERP auf die Mobilisierung bzw. sein fehlender Einfluss auf Baseline und Einstrom, wenn der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als Prozent des Anstiegs in Kontrollzellen dargestellt wird (Abb. 6b).

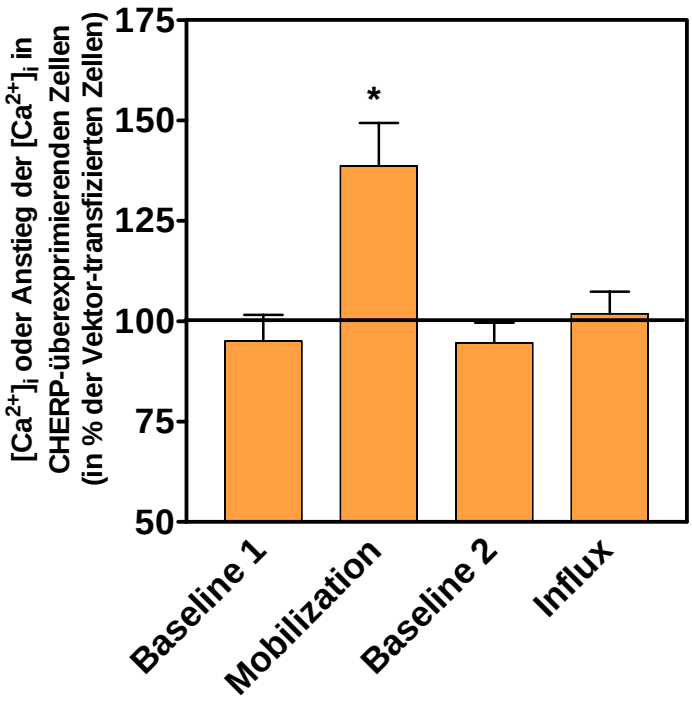


Abb. 6b: Einfluss von CHERP auf Ca^{2+}-Mobilisierung und Ca^{2+}-Einstrom

Durchführung der Experimente wie unter Abb. 5a beschrieben. Die Mittelwerte der Kontrollen sind als 100 % gesetzt und die Werte der CHERP-Zellen in % der Werte der Vektor-transfizierten Zellen angegeben. Es handelt sich um Mittelwerte +/- S.E.M. aus 3 Experimenten. * $p < 0,05$

Die Ergebnisse dieses Experiments sind ein weiterer Hinweis dafür, dass CHERP seinen Effekt an einem bestimmten Punkt im Verlauf des spezifischen Signaltransduktionsweges des S1P ausübt.

3.2.3. Einfluss der Expression von CHERP-*antisense* auf S1P-induzierte Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$

Nachdem die Überexpression von CHERP in HEK-293-Zellen eine Steigerung der S1P-, nicht jedoch der Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Mobilisierung bewirkt hatte, sollten die folgenden Experimente zeigen, zu welchem Effekt umgekehrt die Reduktion des physiologischer Weise in HEK-293-Zellen vorhandenen CHERP führte.

Der durch Carbachol ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ blieb durch die Transfektion von CHERP-*antisense* genauso unbeeinflusst wie durch Überexpression des CHERP-Proteins: der Anstieg betrug in CHERP-*antisense* Zellen im Mittel 95,8 % +/- 4,9 % des Ca^{2+}-Anstieges in Kontrollzellen (n = 7).

Auf den S1P-induzierten Ca^{2+}-Anstieg wirkte sich CHERP-*antisense* hingegen deutlich hemmend aus. Der durch 1 µM S1P ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ betrug hier im Mittel nur 77 % +/- 5,3 % von dem in Kontrollzellen (n = 8, ** $p < 0,01$, Daten nicht abgebildet).

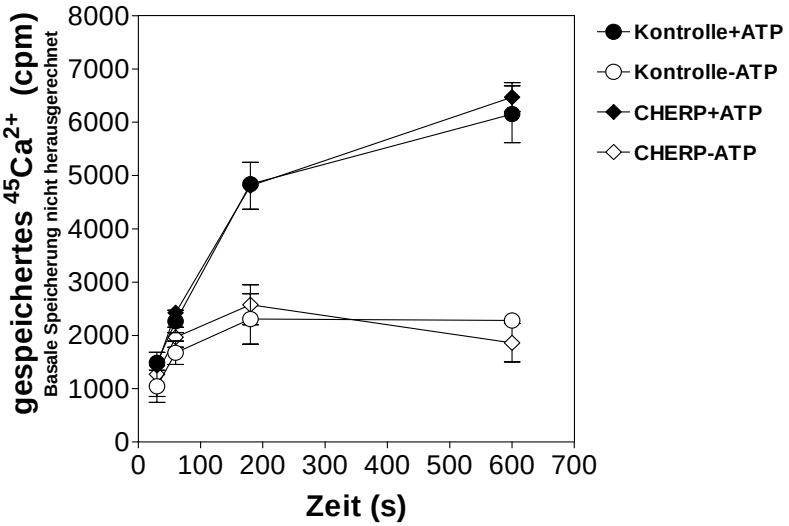
Während CHERP bei der Carbachol vermittelten Signaltransduktion keine Rolle spielt, scheint es auf dem S1P-Weg eine wichtige Komponente darzustellen, bei deren Fehlen es zu Funktionseinbußen bei der Signaltransduktion kommt.

3.3. Die Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Freisetzung an permeabilisierten Zellen

3.3.1. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Speicherung

Eine verstärkte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als Antwort auf bestimmte Stimuli ließe sich u. a. durch einen besseren Füllungszustand eben dieser Speicher erklären. Der fehlende Unterschied zwischen Thapsigargin-induzierten Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ in CHERP überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen machte dies als Angriffspunkt von CHERP bereits weniger wahrscheinlich. Das folgende Experiment stellte den genauen Zeitverlauf der Speicherung bei Inkubation mit $^{45}Ca^{2+}$ dar (Abb. 7).

Da die aktive Aufnahme von Ca^{2+} ins ER ein ATP-abhängiger Prozess ist (sog. spezifische Speicherung), wurde der Versuch in An- und Abwesenheit des Energieäquivalents durchgeführt (Abb. 7a). Die Speicherung, die auch ohne ATP messbar ist, ist als ein unspezifischer Vorgang zu werten. Zur Ermittlung der spezifischen Speicherung wurde die unspezifische von der Gesamtspeicherung subtrahiert, und man erhielt die im zweiten Teil der Abbildung gezeigte Kurve (Abb. 7b).



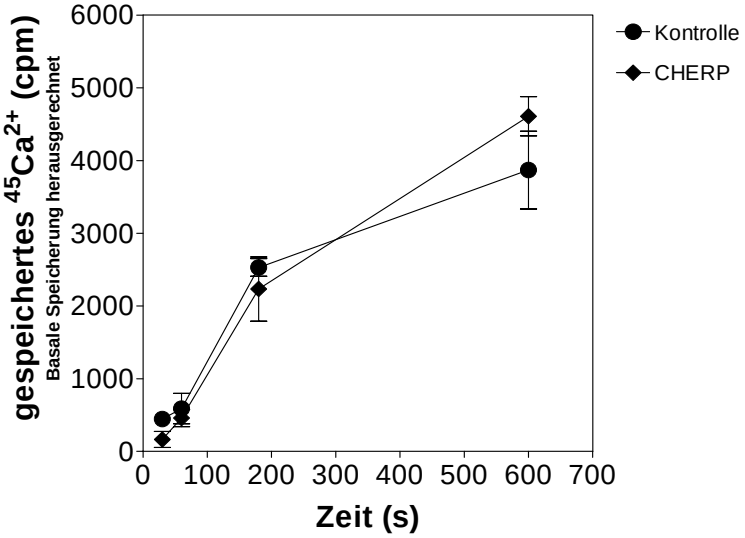


Abbildung 7a und b : Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Speicherung in permeabilisierten HEK-283-Zellen

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Nach Permeabilisierung der Plasmamembran mittels Saponin wurde den Zellen bei 37°C in An- und Abwesenheit von ATP $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben. Die Reaktion wurde nach 30 s, 60 s, 3 min und 10 min durch Zugabe von Stopp-Puffer unterbrochen und die Zellsuspension über einen Glasfaserfilter abfiltriert. Dargestellt ist die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität des $^{45}Ca^{2+}$ in cpm +/- S. D., welche dem im ER gespeicherten $^{45}Ca^{2+}$ entspricht. Es handelt sich um ein repräsentatives Experiment. Den Werten liegen 4-fach Bestimmungen zu Grunde.

Im zweiten Teil der Abb. Wurde die in Abwesenheit von ATP stattfindende unspezifische Speicherung von der Gesamtspeicherung subtrahiert. Dargestellt ist folglich die spezifische, d.h. durch aktiven Transport entstandene Speicherung in CHERP- und Kontrollzellen.

Man sieht, dass sich die Ca^{2+}-Speicherung in eine frühe, schnelle (die ersten 3 min nach Inkubationsbeginn) und eine späte, langsame Phase, unterteilen ließ. Während die Kurve im ersten Teil sehr steil verläuft, wird im zweiten Teil annähernd ein Plateau erreicht. In beiden Abschnitten laufen die Kontroll- und die CHERP-Kurve parallel.

Sowohl bei den gemessenen Werten als auch bei der berechneten spezifischen Speicherung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Speicherungsverhalten von Kontroll- und CHERP-Zellen. Dies gilt für die Geschwindigkeit genauso wie für den erreichten Endzustand. Auf der Basis der hier gewonnen Erkenntnisse zur Speicherung von $^{45}Ca^{2+}$ konnten im weiteren Verlauf die Stimulationsexperimente an permeabilisierten Zellen durchgeführt werden. Dabei wurde von dem nach Zugabe eines Botenstoffes im Speicher verbliebenen $^{45}Ca^{2+}$ auf die ausgelöste Ca^{2+}-Ausschüttung rückgeschlossen.

4.3.2. Einfluss von CHERP auf die durch IP_3 und SPC induzierte Freisetzung von $^{45}Ca^{2+}$

An intakten HEK-293-Zellen verstärkte die CHERP-Überexpression selektiv die über den S1P/SphK-Weg vermittelten Signale membranständiger Rezeptoren. Der Ligand Carbachol, der über IP_3 seine Wirkung vermittelt, blieb unbeeinflusst von CHERP. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit Substanzen, die direkt am ER angreifen, zu dazu passenden Ergebnissen führte; in dem Sinne, dass der zu dem jeweiligen extrazellulären Botenstoff gehörende *second messenger* einem gleichsinnigen Einfluss von CHERP unterliegt.
Dazu wurden permeabilisierte, mit $^{45}Ca^{2+}$ beladene Zellen mit SPC und IP_3 stimuliert. Von letzterem weiß man, dass es über einen spezifischen Rezeptor mit der Funktion eines Ionenkanals Ca^{2+}-Ionen aus dem ER freisetzt (Berridge *et al.* 2000).
Das weiterhin verwendete Sphingolipid SPC ist ein dem S1P verwandter Mediator, von dem bekannt ist, dass es in permeabilisierten Zellen Ca^{2+} freisetzt. Es wurde ein durch SPC direkt aktivierbarer Ionenkanal postuliert (zur Übersicht und Diskussion, siehe Meyer zu Heringdorf *et al*., 2002).

Wie erwartet, setzte IP_3 konzentrationsabhängig gespeichertes $^{45}Ca^{2+}$ frei. Die exemplarische Abbildung zeigt, dass hierbei die Überexpression von CHERP weder einen Einfluss auf das gespeicherte $^{45}Ca^{2+}$, noch auf die $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung durch 3 µM oder 10 µM IP_3 ausübte (Abb. 8)

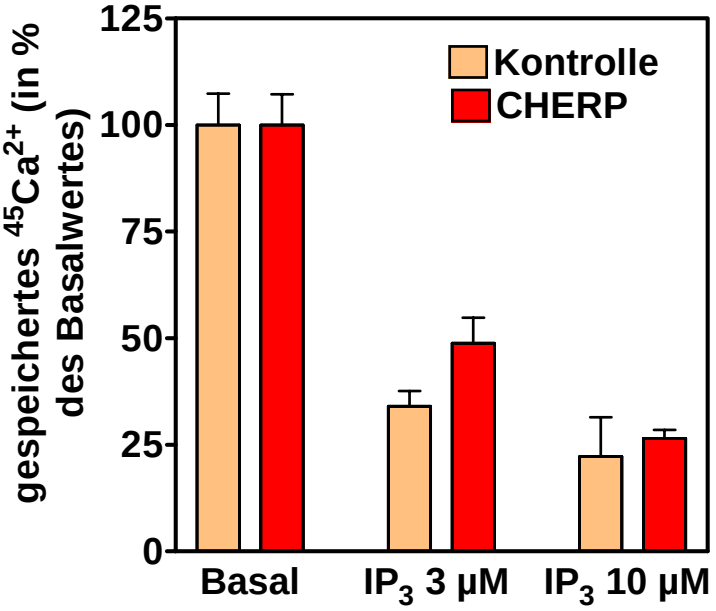


Abb. 8a: Freisetzung von $^{45}Ca^{2+}$ nach Stimulation permeabilisierter HEK-293-Zellen mit IP_3

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Saponin-permeabilisierten Zellen wurde in Anwesenheit von ATP $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben. Nach 5 min Speicherzeit bei 37° C wurde mit IP_3 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Abgestoppt wurde nach 5 min Stimulationszeit mit eiskaltem Stopp-Mix. Nach Filtration wurde das im Filter verbliebenen $^{45}Ca^{2+}$, welches dem noch im ER befindlichen $^{45}Ca^{2+}$ entspricht, im Counter gemessen und in cpm +/- S. D. dargestellt. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment, die Werte wurden in 3 -fach Bestimmung erhoben.

Auch die Stimulation mit 30 µM SPC führte zur Freisetzung des gespeicherten $^{45}Ca^{2+}$. Im Gegensatz zur Stimulation mit IP_3 wurde jedoch die Wirkung von SPC durch Transfektion von CHERP deutlich verstärkt (Abb. 8b).

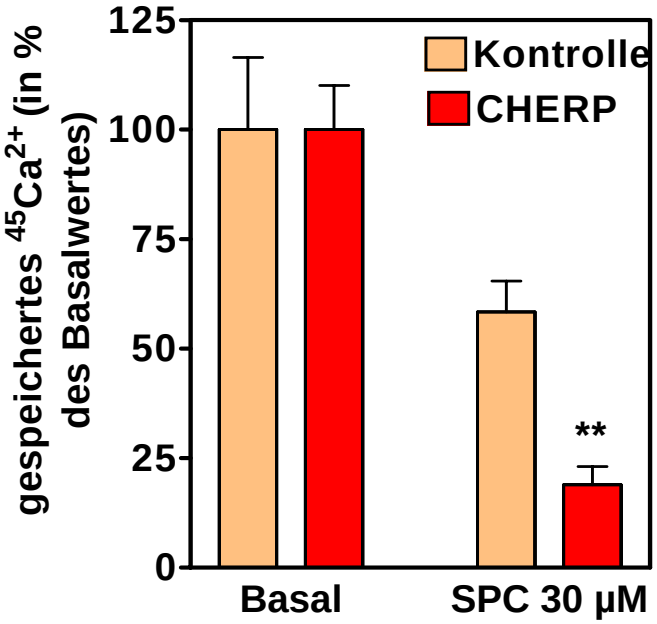


Abb. 8b: Freisetzung von $^{45}Ca^{2+}$ nach Stimulation permeabilisierter HEK-293-Zellen mit SPC

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Saponin-permeabilisierten Zellen wurde in Anwesenheit von ATP $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben. Nach 5 min Speicherzeit wurde mit SPC 30 µM stimuliert. Abgestoppt wurde nach 5 min Stimulationszeit mit eiskaltem Stopp-Puffer. Nach Filtration wurde das im Filter verbliebenen $^{45}Ca^{2+}$, welches dem noch im ER befindlichen $^{45}Ca^{2+}$ entspricht, im Counter bestimmt und in cpm +/- S. D. dargestellt. Es handelt sich um ein repräsentatives Einzelexperiment. Den Messwerten liegen 3-fach Bestimmungen zu Grunde. ** $p < 0,01$

Nach Stimulation von Kontrollzellen mit 10 µM IP_3 verblieben im Mittel 53 % +/- 7,5 % des $^{45}Ca^{2+}$ im Speicher (n = 5). Die Freisetzung wurde durch Überexpression von CHERP nicht gesteigert, hier waren nach Abstoppen der Reaktion im Mittel noch 50 % +/- 10 % des Speichergehalts nachweisbar (n = 6).

30 µM SPC führten in Kontrollzellen zu einer Reduktion des gespeicherten $^{45}Ca^{2+}$ auf 58,7 % +/- 5,8 % im Mittel (n=3). In CHERP-Zellen war die Antwort auf Stimulation mit SPC verstärkt. Hier verblieben im Mittel nur 35,3 % +/- 6,4 % $^{45}Ca^{2+}$ im Speicher (n = 4), was einer Steigerung der Freisetzung um ca. 50 % entspricht ($p < 0,05$).

4.3.3. Einfluss von CHERP auf die $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung an HEK-293-Zellen, welche nicht durch SPC stimulierbar waren

In einem Subklon der HEK-293-Zellen wurde keine Freisetzung von $^{45}Ca^{2+}$ auf Stimulation mit SPC in Konzentrationen bis 40 µM beobachtet. Interessanterweise führte in diesen Zellen die Überexpression von CHERP zu einem dosisabhängigen Wiederansprechen auf SPC (Abb. 9).

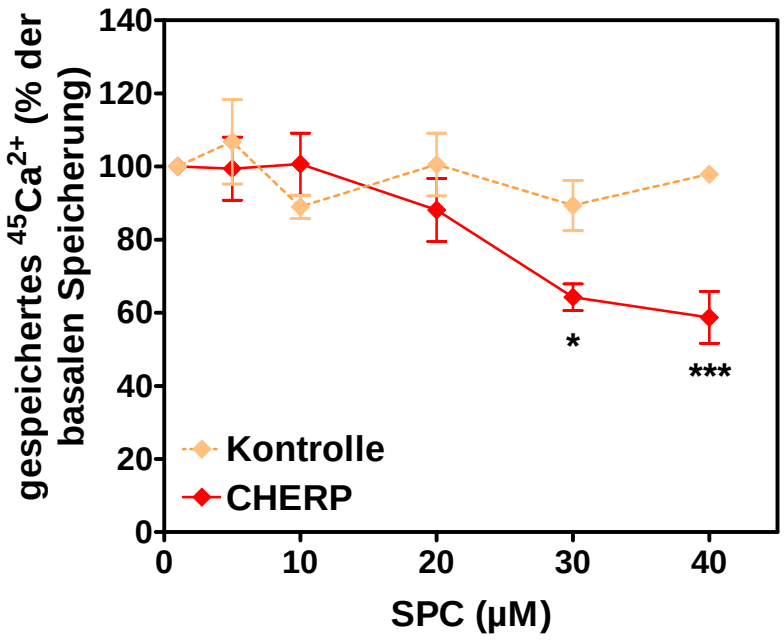


Abb. 9: Einfluss von CHERP auf Stimulation mit SPC in HEK-293-Zellen mit Verlust der SPC-Antwort

Die Zellen wurden mit CHERP oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Saponin-permeabilisierten Zellen wurde in Anwesenheit von ATP $^{45}Ca^{2+}$ zugegeben. Nach 5 min Speicherzeit wurde mit SPC 10 µM, 20 µM, 30 µM und 40 µM stimuliert. Abgestoppt wurde nach 5 min Stimulationszeit mit eiskaltem Stopp-Puffer. Nach Filtration wurde das im Filter verbliebenen $^{45}Ca^{2+}$, welches dem noch im ER befindlichen $^{45}Ca^{2+}$ entspricht, im Counter bestimmt und in cpm +/- S.E.M. dargestellt. Den Werten liegen 4 unabhängige Experimente zu Grunde.

4. Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wusste man über die Rolle des Proteins CHERP bei der zellulären Ca^{2+}-Mobilisierung wenig mehr, als dass es die Thrombin-induzierten Ca^{2+}-Signale in HEL-Zellen beeinflusst. Die Absenkung des CHERP-Gehalts in HEL-Zellen um ca. 80 % (durch Transfektion von CHERP-*antisense*) führte zu einer Abnahme der Thrombin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege bis auf 20 %. Damit einhergehend kam es zur Reduktion der DNA-Synthese und zum Wachstumsstillstand der Zellen (La Plante *et al*., 2000).

Bei dem Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Mobilisierung war unklar, ob es sich um einen unspezifischen oder rezeptorabhängigen Effekt handelte. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Einfluss einer Überexpression oder einer Ausschaltung von CHERP auf $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch verschiedene extrazellulär wirkenden Agonisten analysiert, welche in HEK-293-Zellen bekanntermaßen jeweils hauptsächlich über den PLC/IP_3-Signalweg oder über den SphK/S1P-Signalweg Ca^{2+} mobilisieren. Untersuchungen zum Einfluss von CHERP auf die Wirkung von IP_3 oder anderen intrazellulären Botenstoffen lagen ebenfalls nicht vor. Um einen möglichen unspezifischen Effekt auszuschließen, lag es nahe, zunächst zu untersuchen, ob eine Überexpression von CHERP einen Einfluss auf den Füllungszustand der Speicher haben könnte.

Das CHERP-Konstrukt, das für diese Arbeit zur Verfügung stand, war mit einem FLAG-*tag* versehen, was es ermöglichte, die Expression des Proteins mittels Immunzytochemie mit einem anti-FLAG-Antikörper zu überprüfen. Dabei konnte festgestellt werden, dass in HEK-293-Zellen überexprimiertes CHERP am ER lokalisiert war.

4.1. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Speicherung

Ein gutes Korrelat zum Füllungszustand der intrazellulären Speicher ist die Ca^{2+}-Freisetzung auf Stimulation mit dem Ionenpumpen-Inhibitor Thapsigargin. Dieser hemmt die sog. Ca^{2+}-ATPasen (SERCA) an den Membranen des ERs. Unter Verbrauch von ATP transportieren diese Ionenpumpen normalerweise Ca^{2+} aus

dem Cytosol ins ER und halten so den Ionengradienten aufrecht. Sie tragen auch dazu bei, dass nach einem Ca^{2+}-Signal die $[Ca^{2+}]_i$ schnell wieder sinkt und die Zelle so in den Ruhezustand zurückkehrt, bzw. durch den nächsten Reiz wieder stimulierbar wird.
Eine Hemmung dieses energieaufwändigen Transportes führt zum passiven Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER gemäß dem Ionengradienten über der Membran. Stimuliert man intakte Zellen mit Thapsigargin, so spiegelt der darauf folgende Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ den Ca^{2+}-Gehalt der intrazellulären Speicher wider.
Da die Überexpression von CHERP die Ca^{2+}-Mobilisierung durch den Ionenpumpeninhibitor nicht beeinflusste, kann man davon ausgehen, dass der Füllungszustand des ERs im Vergleich zu Kontrollzellen nicht verändert war gegenüber dem in den Kontrollzellen. Zu diesem Ergebnis kamen La Plante *et al.* auch für CHERP-depletierte HEL-Zellen.

Noch genaueren Aufschluss über die Ca^{2+}-Speicherung in Kontrollzellen und CHERP-transfizieten Zellen wurde in dieser Arbeit durch Betrachtung des Zeitverlaufs der Speicherung von radioaktivem $^{45}Ca^{2+}$ gewonnen. Bei der Ca^{2+}-Speicherung der HEK-293-Zellen lassen sich eine schnelle steile Phase in den ersten 3 Minuten nach Ca^{2+}-Zugabe und eine langsame Annäherung an ein Plateau unterscheiden. Weder Anstiegsgeschwindigkeit noch erreichter Endpunkt wurden durch die Überexpression von CHERP verändert.
Mit diesem Experiment konnte eine Beeinflussung der Ca^{2+}-Speicherung als möglichem Angriffspunkt von CHERP weitgehend ausgeschlossen werden. Es scheint sich daher bei diesem Protein nicht um ein unspezifisches *house-keeping*-Enzym der Ca^{2+}-Speicher zu handeln, sondern um den Bestandteil spezifischer Signaltransduktionsketten.

4.2. Einfluss von CHERP auf die Ca^{2+}-Mobilisierung durch verschiedene extrazelluläre Agonisten an intakten Zellen

Für die Untersuchung des CHERP-Effekts auf verschiedene Ca^{2+}-mobilisierende Rezeptor-Agonisten wurden HEK-293-Zellen, eine Zelllinie die endogen zahlreiche Membranrezeptoren exprimiert, verwendet. Unter anderem trägt sie den Muskarin-Rezeptor vom Subtyp M_3, von dem man weiß, dass er in diesen Zellen über Aktivierung der PLC und den *second messenger* IP_3 Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ auslöst (Sandmann *et al.*, 1991). Ein häufig verwendeter und gut charakterisierter Agonist an diesem Rezeptor ist Carbachol. Die durch Carbachol induzierten $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege zeigten sich unbeeinflusst von der Transfektion der Zellen mit CHERP. Im Rahmen dieses Signaltransduktionsweges scheint CHERP also keine Rolle zu spielen.

Im Gegensatz dazu waren die $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch das Sphingolipid S1P in CHERP-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkt. Die Daten legen nahe, dass CHERP auch die $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch LPA verstärkt. Von S1P und LPA ist inzwischen bekannt, dass sie in HEK-293-Zellen nicht (S1P; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2001) oder nur schwach (LPA; Young *et al.*, 1999) die PLC aktivieren, sondern sich eines alternativen Weges für die Ca^{2+}-Mobilisierung bedienen. Während der Weg über PLC und IP_3 lange der einzig vollständig beschriebene Mechanismus zur Generierung von intrazellulären Ca^{2+}-Signalen war, ist inzwischen auch der Weg über die SphK einigermaßen gut charakterisiert: In HEK-293-Zellen werden $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege durch S1P-und LPA- Rezeptoren hauptsächlich über den SphK/S1P-Weg vermittelt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass genau diese PLC-unabhängigen Signale bevorzugt durch Überexpression von CHERP verstärkt werden.

Die daraufhin durchgeführten Experimente mit CHERP-*antisense* zeigten dazu passend den umgekehrten Effekt: Während Carbachol-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege unbeeinflusst blieben, wurden die durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege deutlich unterdrückt, was dafür spricht, dass CHERP eine dominierende Komponente dieses Signalweges darstellt.

Die S1P-Stimulation von Zellen in Ca^{2+}-freiem Medium zeigte außerdem, dass die durch CHERP-Transfektion beeinflusste Komponente des Ca^{2+}-Signals die Freisetzung aus intrazellulären Speichern und nicht der nachfolgende kapazitative Ca^{2+}-Einstrom von außen ist. Diese Beobachtung passt zur Lokalisation von CHERP an der ER-Membran.

4.3. Wirkung von CHERP auf die Ca^{2+}-Freisetzung durch *second messenger* an permeabilisierten Zellen

Weitere wichtige Ergebnisse erhoffte man sich von der Stimulation mit den entsprechenden intrazellulären Botenstoffen der vorher beschriebenen Kaskaden, IP_3 und S1P.

Im Jahre 2002 stand man allerdings vor dem Problem, dass S1P an permeabilisierten Zellen keine Wirkung zeigte. Zur Erklärung dieses Phänomens wurden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Es war vorstellbar, dass intrazelluläres S1P zur Ca^{2+}-Freisetzung einen Cofaktor benötigte, der durch die Permeabilisierung austrat. Auch Veränderungen des zellulären Milieus oder eine Beschleunigung des Abbaus waren als Ursachen für den Wirkungsverlust denkbar.

Inzwischen konnte durch die Verwendung von *Caged* S1P in intakten Zellen dessen Ca^{2+}-mobilisierende Wirkung durch einen direkten Angriffspunkt an intrazellulären Speichern nachgewiesen werden (Meyer zu Heringdorf *et al*., 2003 a). Bei dieser Methode wurden die Zellen mit sog. *Caged* S1P beladen, d. h. mit S1P, welches sich wirkungslos im Innern eines photosensiblen, lipophilen Komplexes befand. Durch einen Lichtblitz wurde aktives S1P aus dem zerfallenden Komplex freigesetzt und mobilisierte mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Ca^{2+} aus dem ER. Der ganze Ablauf wurde unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet und konnte fotographisch dokumentiert werden. Es wäre sicherlich interessant, den Einfluss von CHERP in dieser Versuchsanordnung zu untersuchen.

2002, als diese Arbeit entstand, war diese Methode leider nicht zugänglich, so dass ein anderes Sphingolipid verwendet werden musste.

Eine Ersatzsubstanz, die auch an permeabilisierten Zellen in der Lage ist Ca^{2+}-Anstiege auszulösen, ist das dem S1P verwandte Sphingolipid SPC. SPC und S1P teilen viele ihrer biologischen Effekte wie z. B. den Einfluss auf Mitose und Zellmigration sowie die Fähigkeit, plötzliche Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ auszulösen. Andere Effekte sind für das jeweilige Sphingolipid spezifisch. Mit dem OGR1-Rezeptor wurde z. B. ein für SPC hochspezifischer GPCR beschrieben. Es hat sich jedoch gezeigt, dass SPC auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit auch ein Ligand an den G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren der EDG-Familie ist, seine Wirkung allerdings je nach Subtyp erst bei der drei- bis hundertfachen Konzentration messbar ist. Man geht hier von einer Bindung mit niedriger Affinität oder von partiellem Agonismus aus (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002).

Es ist anzunehmen, dass es mit niedriger Affinität ebenfalls an die bisher nicht identifizierte intrazelluläre Bindungsstelle von S1P bindet, auch wenn dies vermutlich nicht seiner physiologischen Funktion entspricht. Im Gegnsatz zu S1P, welches bei Aktivierung der SphK in der Zelle schnell und transient, d. h. mit Signalcharakter, freigesetzt werden kann, fehlt ein so regulierter Produktionsweg bislang für SPC, so dass unklar ist, ob dieses Lipid tatsächlich einen Stellenwert als *second messenger* besitzt.

Nichts desto trotz konnte für die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen gezeigt werden, dass SPC IP_3- und Ryanodin-Rezeptor unabhängig intrazellulär Ca^{2+} mobilisiert und dass dieser Effekt im Gegensatz zur extrazellulären Wirkung über GPCRs nicht stereospezifisch ist, also von diesen unabhängig vermittelt werden muss (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998).

Passend zu den vorhergegangenen Ergebnissen mit Carbachol hat diese Arbeit gezeigt, dass Überexpression von CHERP keinen Einfluss auf die Ca^{2+}-Mobilisierung durch IP_3 hat. Hingegen konnte nachgewiesen werden, dass durch SPC an permeabilisierten Zellen ausgelöste Signale durch Überexpression von CHERP verstärkt werden.

Unabhängig von der Ebene, auf der die Kaskade aktiviert wurde, blieb also der PLC/IP_3-Signalweg unbeeinflusst, während Sphingolipid-Transmitter in ihrer Wirkung verstärkt wurden. Da dieser Effekt von CHERP nicht nur bei extrazellulärer, sondern auch bei weiter *downstream* erfolgter Stimulation mit intrazellulären Substanzen nachzuweisen war, ist davon auszugehen, dass sein Angriffspunkt funktionell nach der Generierung des *second messengers* liegen

muss, also etwa im Bereich der Bindung an das ER, was sich im übrigen ja auch mit der subzellulären Lokalisation von CHERP deckt.

4.4. Intrazellulärer Angriffspunkt der Sphingolipide und die mögliche Rolle von CHERP

In diesem Zusammenhang soll erwähnt und diskutiert werden, dass der Angriffspunkt der Sphingolipide am ER weiterhin unbekannt ist:
1996 wurde von Mao *et al.* erstmalig das Protein SCaMPER als SPC-reagierender Ca^{2+}-Kanal aus MDCK-Zellen geklont und der ER-Membran zugeschrieben. Seine Rolle ist allerdings nicht abschließend geklärt: Während eine Untersuchung widerlegte, dass es in der ER-Membran lokalisiert und sensibel für SPC ist (Schnurbus *et al.*, 2002), zeigte eine andere Untersuchung an Herzmuskelzellen eine Co-Lokalisierung mit dem Dihydropyridin-Rezeptor und konnte durch extrazellulär zugefügtes SPC ausgelöste Ca^{2+}-Anstiege nachweisen (Cavalli *et al.*, 2003).
Festzuhalten bleibt jedoch, dass in HEK-293-Zellen, in denen intazelluläres S1P (und SPC) deutliche Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ auslöst, SCaMPER durch Reverse-Transkriptase-PCR nicht nachgewiesen werden konnte (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003a), so dass zumindest hier von einem anderen Angriffspunkt ausgegangen werden muss.
Eine Beteiligung des IP_3-Rezeptors ist in diesem Zusammenhang nach wie vor nicht ausgeschlossen. Die fehlende Hemmung der durch Sphingolipide induzierten Ca^{2+}-Anstiege durch den IP_3-Antagonisten Heparin schließt einzig die Bindung an selbiger Stelle aus, nicht jedoch die Wirkung an einer allosterischen Bindungsstelle dieses großen Kanalproteins.
Andererseits ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, dass noch andere Kanäle der ER-Membran existieren als IP_3- und Ryanodinrezeptoren.

Besonders interessant waren vor diesem Hintergrund die Experimente, in denen HEK-293-Zellen, die nicht mit Ca^{2+}-Freisetzung auf SPC-Stimulation ansprachen, nach Transfektion mit CHERP sensibel wurden, d.h. mit konzentrationsabhängiger

Ca^{2+}-Ausschüttung reagierten, während die Kontrollzellen SPC-unsensibel blieben. Es schien, als wurde mit CHERP eine dominierende Komponente des Signalweges in die Zellen eingeschleust.
Unter Zellkulturbedingungen kommt es vor, dass Zellen ihr Rezeptor-Profil verändern und bestimmte Rezeptoren nicht mehr exprimieren, was mit einem Wirkverlust des entsprechenden Agonisten einhergeht. Ein Erklärungsansatz für die wiedererlangte SPC-Sensibilität könnte in der Annahme bestehen, es handle sich bei CHERP um einen Spingolipidrezeptor des ERs. Natürlich könnte auch der Verlust jeder anderen dominierenden Komponente des Transduktionsweges bzw. ihre Rückkehr in die Zelle durch CHERP-Transfektion diesen Effekt erklären.

Die Proteinstruktur von CHERP ist mit einem Ionenkanal kompatibel: Sie weist zwei mögliche Transmembrandomänen auf sowie verschiedene Phosphorylierungsstellen. Diese werden von Proteinkinasen angesprochen und spielen bei der Regulation von Signaltransduktion eine große Rolle (La Plante *et al.,* 2000). Die Erstbeschreiber von CHERP haben daher unter anderem seine mögliche Funktion als K^+-Kanal des ERs diskutiert.
2003 erschien eine weitere Arbeit, die den Effekt von CHERP-*antisense* in Jurkat-T-Lymphozyten untersuchte und auch hier die Wichtigkeit von CHERP für die Ca^{2+}-Mobilisierung feststellen konnte: Die Reduktion des CHERP-Gehalts der Zellen führte zu verminderten $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege auf Stimulation mit Thrombin und Phytohämagglutinin (PHA) und verminderte auch den normalerweise darauf folgenden Ca^{2+}/Calcineurin -vermittelten Prozess der NFAT-(*nuclear factor of activated T-cells)* Translokation vom Plasma in den Zellkern. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen handelt es sich hier um Signalwege, die den IP_3-Rezeptor involvieren (O´Rourke *et al*., 2003).

Die Frage, worum es sich bei CHERP genau handelt, kann also mit den heute vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.
Gegenwärtiger Stand der Erkenntnis ist, dass es sich bei CHERP um ein Protein der ER-Membran handelt, das die Signaltransduktion einzelner Botenstoffe spezifisch beeinflusst, bzw. Grundvoraussetzung für das Zustandekommen dieser Signale ist.

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Überexpression von CHERP in HEK-293-Zellen extrazelluläre S1P- und intrazelluläre SPC-Signale deutlich verstärkt, während über PLC/IP_3 vermittelte $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege unbeeinflusst bleiben. Ein Einfluss auf die Ca^{2+}-Speicherung konnte ausgeschlossen werden. Experimente mit CHERP-*antisense* und Zellen, denen die Ansprechbarkeit auf SPC verloren gegangen war, haben die Wichtigkeit von CHERP für das Sphingolipid-*Signalling* unterstrichen. Anhand von Abb. 10 sollen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über den Einfluss von CHERP auf die Signaltransduktion in HEK-293-Zellen illustriert werden:

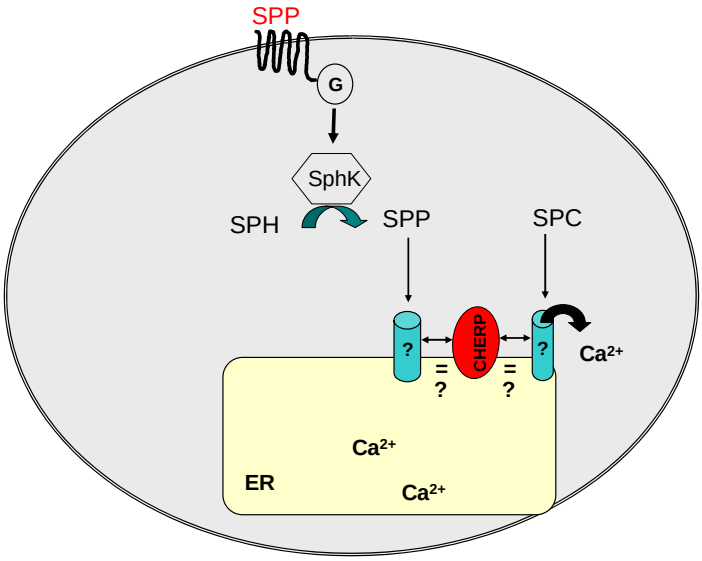


Abb. 10: Einfluss von CHERP auf die Signaltransduktion in HEK-293-Zellen

CHERP beeinflusst bevorzugt Sphingolipidtransmitter, die IP_3 unabhängig Ca^{2+} mobilisieren. Diese Arbeit weist die Verstärkung der Stimulation durch extrazelluläres S1P und intrazelluläres SPC nach.

Zur genauen Charakterisierung von CHERP und seinem Funktionsmechanismus werden in Zukunft noch vielfältige Experimente durchzuführen sein. An erster Stelle steht der Nachweis des CHERP-Einflusses auf die intrazelluläre S1P-Wirkung an intakten Zellen mit Hilfe von *Caged* S1P. Untersuchungen an anderen Zellentypen und die Überprüfung weiterer Transmitter könnten aufschlussreich sein. So könnte hoffentlich auch erklärt werden, wie der von La Plante und

O´Rourke beschriebene Einfluss auf Thrombin und PHA induzierte Signale zu werten ist und wie er mit der in dieser Arbeit gezeigten Präferenz für Sphingolipid-Signale zu vereinbaren ist.

5. Zusammenfassung

Bei CHERP (*Ca^{2+} homeostasis endoplasmic reticulum protein*) handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 100 kDa, von dem gezeigt worden ist, dass es mit dem Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) Rezeptor co-lokalisiert und eine Rolle bei der Thrombin- und T-Zell-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+}-Freisetzung spielt.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von CHERP bei der Ca^{2+}-Mobilisierung näher zu charakterisieren, unter besonderer Berücksichtigung von Sphingolipiden, die IP_3-unabhängig Ca^{2+} freisetzen, sowie von Membranrezeptoren, die eine sehr schwache oder keine IP_3-Bildung induzieren. In Saponin-permeabilisierten HEK-293-Zellen, die CHERP oder einen Kontrollvektor überexprimierten, war weder der Zeitverlauf der $^{45}Ca^{2+}$-Speicherung noch die Gesamtmenge des gespeicherten $^{45}Ca^{2+}$ durch die Überexpression von CHERP beeinflusst. Darüber hinaus hatte die Überexpression von CHERP keinen größeren Effekt auf die $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung durch 10 µM IP_3. Im Gegensatz dazu führte die CHERP-Überexpression zur Steigerung der durch Sphingosylphosphorylcholin (SPC) induzierten $^{45}Ca^{2+}$-Ausschüttung und induzierte sogar eine Stimulierbarkeit durch SPC in Zellen, die sonst nicht auf SPC reagierten (EC_{50} ~20 µM; Freisetzung von ~40 % des gespeicherten $^{45}Ca^{2+}$ bei 40 µM SPC). In intakten HEK-293-Zellen wurden durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P)- und Lysophosphatidsäure (LPA)-Rezeptoren ausgelöste Anstiege der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch Überexpression von CHERP deutlich verstärkt. Diese Rezeptoren aktivierten nicht (S1P) oder kaum (LPA) die Phospholipase C (PLC). Dahingegen hatte die CHERP-Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$, die durch maximale Aktivierung des muskarinischen M_3-Rezeptors induziert wurden. Dieser ist ein starker Aktivator der PLC. CHERP-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die durch den SERCA-Hemmstoff Thapsigargin (1 µM) ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege, was dafür spricht, dass CHERP keine Rolle bei der basalen Ca^{2+}-Speicherung spielt, wie es auch an den permeabilisierten Zellen beobachtet wurde. Aus diesen Daten kann man schließen, dass CHERP bevorzugt eine Rolle in Signal-Kaskaden, die IP_3-unabhängig Ca^{2+} mobilisieren, spielt.

6. Literaturverzeichnis

[1] Berridge, M. J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361, 315-325

[2] Berridge, M. J., Lipp, P., Bootmann, M.D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21

[3] Blaustein, M. P., Lederer, W. J. (1999): Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. Physiol. Rev. 79, 763-854

[4] Budd, S. L., Nicholls, D. G. (1996): A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca^{2+} homeostasis. Neurochem. 66, 403-411

[5] Cancela, J. M., Churchill, G.C., Galione, A. A. (1999): Coordination of agonist-induced Ca^{2+}-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. Nature 398, 74-76

[6] Cancela, J. M., Petersen, O. H. (1998): The cyclic ADP ribose antagonist 8-NH2-cADP-ribose blocks cholecystokinin-evoked cytosolic Ca^{2+} spiking in pancreatic acinar cells. Pfluger´s Arch. 435, 746-748

[7] Cavalli, A. L., O`Brian, N. W., Barlow, S. B., Betto, R., Glembotski, C. C., Palade, P. T., Sabbadini, R. A. (2003): Expression and functional characterization of SCaMPER: A sphingolipid-modulated calcium channel of cardiomyocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284, C780-C790

[8] Clapham, D.E. (1995): Calcium signaling. Cell 80, 259-268

[9] Collins, T. J., Lipp, P., Berridge, M. J., Li, W., Bootman, M. D. (2000): Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release is inhibited by mitochondrial depolarization. Biochem. J. 347, 593-600

[10] Fukushima N., Ishii, I., Contos J.J.A., Weiner J.A., Chun, J. (2001): Lysophospholipid receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41, 507-534

[11] Genazzini, A. A., Galione, A. A. (1997): Ca^{2+} release mechanisms gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. Trends Pharmacol. Sci. 18, 108-110

[12] Ghosh T.K., Bian, J., Gill, D.L. (1990): Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivates generated in cells. Science 284, 1653-1656.

[13] Ghosh T.K., Bian, J., Gill, D.L. (1994) Sphingosin-1-phosphate generated in the endoplasmatic reticulum membrane activates release of stored calcium. J. Biol. Chem. 269, 22628-22635

[14] Ishii I., Fukushima, N., Ye, X., Chun, J. (2004): Lysophospholipid receptors: signalling and biology. Annu. Rev. Biochem. 73, 321-354

[15] Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedor, E. L., Camacho, P., Lechleiter, J. D. (1995): Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. Nature 377, 438-441

[16] La Plante, J. M., O´Rourke, F., Lu, X., Fein, A., Olson, A., Feinstein, B. F. (2000) Cloning of human Ca^{2+} homoeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP): regulated expression of antisense cDNA depletes CHERP, inhibits intracellular Ca^{2+} mobilization and decreases cell proliferation. Biochem. J. 348, 189-199

[17] Mao, C., Kim, S.H., Almenoff, J.S., Rudner, X. L., Kearney, D. M., Kindman, L. A. (1996): Molecular cloning and characterization of SCaMPER, a sphingolipid Ca^{2+} release-mediating protein from endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1993-1996

[18] Meyer zu Heringdorf, D., Niederdräing, N., Neumann, E., Fröde, R., Lass, H., Van Koppen, C. J., Jakobs, K. H. (1998): Discrimination between plasma membrane and intracellular target sites of sphingophosphosylcholine. Eur. J. Pharmacol. 354, 113-122

[19] Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Lipinski, M., Alemany, R., Rümenapp, U., Jacobs, K. H. (2001): Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. Eur. J. Pharmacol. 414, 145-154

[20] Meyer zu Heringdorf, D., Himmel H.M., Jacobs, K.H. (2002): Sphingophosphosylcholine—Biological functions and mechanisms of action. Biochem. Biophys. Acta 1582, 178-189

[21] Meyer zu Heringdorf D., Vincent, M.E., Lipinski, M., Danneberg, K., Stropp, U., Wang, D., Tigyi, G., Jacobs, K.H. (2003b): Inhibition of Ca^{2+} signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor $S1P_1$. Cell Signal 15, 677-687

[22] Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, D., Jacobs, K. H. (2003a): Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca^{2+} mobilization independently of G-protein-coupled receptors. FEBS Lett. 554, 443-449

[23] Meyer zu Heringdorf, D. (2004): Lysophospholipid receptor-dependent and -indedendent calcium signalling. J. Cell. Biochem. 92, 937-948

[24] Nahorski, S. R., Potter, B. V. L. (1989): Molecular recognition of inositol polyphosphates by intracellular receptors and metabolic enzymes. Trends Pharmacol. Sci. 10, 139-143

[25] O´Rourke, F. A., LaPlante, J. M., Feinstein, M. B. (2003): Antisense-mediated loss of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP; ERPROT213-21) impairs Ca^{2+} mobilization, nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and cell proliferation in Jurkat T-lymphocytes. Biochem. J. 373, 133-143

[26] Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol. Rev. 74, 595-636

[27] Sandmann, J., Peralta, E. G., Wurtmann, R. J. (1991): Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to phospholipase D. J. Biol. Chem. 266, 6031-6034

[28] Schnurbus, R., de Pietri, T.D., Grohovaz, F., Zacchetti, D. (2002): Re-evaluation of primary structure, topology and localization of Scamper, a putative intracellular Ca^{2+} channel activated by sphingophosphorylcholine. Biochem. J. 362, 183-189

[29] Spiegel, S., Milstien S. (2003): Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 397-407

[30] Tigyi G. (2001): Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycero-phospholipids. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 64, 47-62

[31] Wilcox, R. A., Primrose, W. U., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. J. (1998): New developments in the molecular pharmacology of the *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. TiPS 19, 467-475

[32] Young, K. W., Challiss, R. A. J., Nahorski, S. R., Mackrill, J. J., (1999): Lysophosphatidic acid-mediated Ca^{2+} mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinisitide signalling, but dependent of sphingosinkinase activation. Biochem. J. 343, 45-52

[33] Young, K. W., Bootman, M. D., Channing, D. R., Lipp, P., Maycox, P. R., Meakin, J., Challiss, R. A. J., Nahorski, S. R. (2000): Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization requires intracellular sphingosine-1-phosphate production. Potential involvement of endogenous Edg-4 receptors. J. Biol. Chem. 275, 38523-38539

Anhang

Abkürzungen

ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre freie Calciumkonzentration
CFP	*Cyan fluorescent protein*
CHERP	*Calcium-Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein*
EGTA	Ethylenglycol-bis-(ß-aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
GPCR	*G-protein-coupled receptor*
HBSS	*Hank´s balanced salt solution*
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK-293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen, die stabil den M_3-Rezeptor exprimieren
HEL-Zellen	Humane Erythroleukämie-Zellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-2-ethansulfonsäure
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
LPA	Lysophosphatidsäure
PCR	p*olymerase chain reaction*
PLC	Phospholipase C
S.D.	Standardabweichung
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
SPC	Sphingosylphosphorylcholin

SphK	Sphingosinkinase
S1P	Sphingosin-1-Phosphat

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Univ.- Prof. Dr. med. Dagmar Meyer zu Heringdorf für die Überlassung des Themas und engagierte Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei Herrn Univ.- Prof. Karl H. Jakobs bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Beratung bei schwierigen Fragen.

Bei Frau Claudia Häusler und Frau Ellen Schäfer möchte ich mich für ihre Mitarbeit an den Versuchsreihen und die schöne Zeit, die ich im Labor des Instituts für Pharmakologie verbringen durfte, bedanken.

Nicht zu letzt gilt mein Dank auch Herrn De-an Wang aus Memphis, der das CHERP-Konstrukt zu Verfügung gestellt hat, und Frau Kerstin Danneberg für Erstellung des CHERP-*antisense*-Konstruktes.

Herrn Mike A. Rui danke ich für die geduldige Mitarbeit an Format und Layout.

Dafür, dass sie mich das ganze Studium über unterstützt haben und auch jetzt immer für mich da sind, bedanke ich mich bei meinen Eltern.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Randi Katrin Manegold, wohnhaft in Essen geboren am 05.04.1978 in Iserlohn
Schulausbildung	1984 – 1988 Grundschule Bömberg, Iserlohn 1988 – 1997 Gymnasium An der Stenner, Iserlohn
Studium	1997 – 1999 Vorklinischer Studienabschnitt an der Universität des Saarlandes, Homburg an der Saar 1999 – 2004 Klinischer Studienabschnitt an der Universität Duisburg-Essen, Essen
Promotion	2001 Beginn einer Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie der Universität Duisburg-Essen
Berufliche Tätigkeit	2004 Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Uniklinikums Essen