

# Potentiell Screening-Modell zur Testung von gewebsspezifischen Kalziumantagonisten

Claudia Seisenberger und Franz Hofmann

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, D-München

## Zusammenfassung

Herz-/Kreislaufkrankungen sind immer noch häufigste Todesursache in den Industriestaaten. Die zur Zeit verfügbaren Behandlungsstrategien bedürfen der Optimierung. Ein wirksames Therapieprinzip sind Substanzen, die den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanal gewebsspezifisch blockieren. Wir haben für Screening-Verfahren die cDNA der L-Typ Kalziumkanäle aus Herz und glatten Muskeln isoliert. Mit Hilfe von molekularbiologischen Verfahren und Zellkulturzellen haben wir stabile Zelllinien etabliert. Diese Zelllinien eignen sich zum Screenen von gewebsspezifischen Kalziumkanalblockern.

## Summary: Potential screening model for tissue specific calcium channel blockers

Cardiovascular diseases are still the major cause of death in industrialized countries. The available therapies need improvement and specially tissue specific drugs. We have tested the possibility to establish cell lines expressing tissue specific cardiac muscular or smooth muscle L-type calcium channels. The cardiac and the smooth muscle L-type calcium channel differ in the IS6 segment of the  $\alpha_{1C}$ -gene. The established cell lines expressing the  $\alpha_{1C}$ -a or the  $\alpha_{1C}$ -b splice variants of the  $\alpha_{1C}$ -gene can be used for the screening of tissue specific calcium channel blockers.

*Keywords: cardiovascular diseases, calcium channel blocker,  $\alpha_{1C}$ -gene, specific cell lines*

## 1 Einleitung

Herz-/Kreislaufkrankungen sind immer noch die häufigste Todesursache in den entwickelten Industrieländern. Ihre Verhütung bzw. die effiziente Behandlung der Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems sind deshalb von überragender Bedeutung für die allgemeine Volksgesundheit. Ein Therapieprinzip, das sich zur Behandlung des Hochdrucks und einiger Unterformen von Herzschlag-Irregularitäten (Arrhythmien) bewährt hat, sind die sogenannten Kalziumantagonisten. Diese Pharmaka blockieren den Kalziumeinstrom in verschiedenen erregbaren Geweben, darunter dem Herzmuskel und der glatten Gefäßmuskulatur. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Kontraktion. Unerwünscht ist nun die Hemmung der Kontraktion des Herzmuskels, da sie schließlich zum Tode führen würde. Dagegen ist die dosierte Hemmung des Gefäßmuskeltonus bei allen Formen der Bluthochdruck-Krankheit erwünscht, da durch die Erschlaffung der Gefäße der Blutdruck sinkt. Deshalb werden Kalziumantagonisten, die eine Präferenz für den Kalziumkanal des glatten Gefäß-

muskels haben, als Therapeutika bevorzugt.

Bisherige Screening-Verfahren für solche Substanzen nutzten ausschließlich Gewebspräparate von Laboratoriumstieren. Durch die Klonierung der Untereinheiten des Kalziumkanals eröffneten sich nun Möglichkeiten, neue Screening-Modelle in Zellkultur-Zellen zu erproben. Weitgehend unklar war bisher, ob in solchen Zellkultursystemen die biologischen Unterschiede zwischen Herzmuskel- und Gefäßmuskel-Kalziumkanal reproduziert werden. In einem durch die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen geförderten Forschungsvorhaben wurde untersucht, ob durch Expression der verschiedenen Untereinheiten des Herz- und Gefäßmuskel-Kalziumkanals die biologische Situation wieder hergestellt werden kann. Die Schwierigkeit dabei war, daß, soweit man es aus molekularbiologischen Versuchen wußte, die Kalziumkanäle des Herz- und des Gefäßmuskels durch die gleichen Gene kodiert werden. Wir haben nun in mehreren Schritten versucht, dieses Problem zu lösen.

## 2 Ergebnisse

In einem ersten Ansatz zeigten wir, daß das Gen für die sogenannte  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals in Zellkulturzellen eingebracht werden kann und dort ein Protein synthetisiert wird, das die physiologischen Grundeigenschaften eines L-Typ Kalziumkanals des Herzens oder glatten Muskels hat. Dieser Kalziumkanal wird, wie auch *in vivo*, durch Kalziumantagonisten blockiert (Welling et al., 1993). In einem zweiten Schritt versuchten wir dann, durch Modifikation des eingebrachten Genes eine bessere und stabile Expression des Kalziumkanalproteins in den Zellen zu erreichen. Wir fanden dabei, daß, wenn man vom carboxyterminalen Ende des Proteins etwa 200 Aminosäuren entfernt, das daraus resultierende kleinere Protein in höherer Dichte in der Zellmembran vorhanden ist, aber die grundlegenden physiologischen Eigenschaften des L-Typ Kalziumkanals nicht verändert sind (Seisenberger et al., 1995; Hofmann et al., 1996). Mit diesen Versuchen konnten wir zeigen, daß sich die verkürzte  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals, wenn sie stabil in Zellkultur-

zellen exprimiert wird, als Screening-Modell für Kalziumantagonisten eignet.

Mit diesen Ergebnissen war aber das grundlegende Problem, die unterschiedliche Empfindlichkeit des Gefäßmuskel-Kalziumkanals gegenüber dem Herzmuskel-Kalziumkanal für Kalziumantagonisten, nicht gelöst. In früheren Arbeiten hatten wir bereits gefunden, daß das Gen für den L-Typ Kalziumkanal in verschiedenen Unterformen in der Zelle vorkommt, sogenannten Splice-Varianten (Mikami et al., 1989; Biel et al., 1990). Die beiden wichtigsten Unterformen waren die Splice-Variante A und die Splice-Variante B des  $\alpha_{1C}$ -Gens. Wir vermuteten, daß die eine Unterform im wesentlichen im Herzen, die andere im wesentlichen im glatten Muskel vorkommt, ohne dies allerdings bisher bewiesen zu haben. Beide Splice-Varianten unterscheiden sich nur an vier Positionen in einem sehr großen, über 2000 Aminosäuren enthaltenden Protein. In initialen Versuchen zeigten wir zunächst, daß die Splice-Variante B durch geringere Konzentration eines Kalziumantagonisten gehemmt wird, als die Splice-Variante A (Welling et al., 1993). Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden haben wir chimäre Proteine der beiden Splice-Varianten hergestellt (Welling et al., 1997). Wir konnten in diesen Versuchen dann zeigen, daß ein Segment des Kalziumkanals, das als IS6 bezeichnet wird, verantwortlich dafür ist, ob der resultierende Ionenkanal durch geringe Konzentration eines Kalziumantagonisten oder erst durch hohe Konzentration eines Antagonisten blockiert wird. Die nächste Frage war nun selbstverständlich, ob diese Unterschiede, die wir in den chimären Proteinen gefunden hatten, auch im Organismus für die unterschiedliche Sensitivität des Herzkalziumkanals und des glatten Muskelkalziumkanals gegenüber Kalziumantagonisten verantwortlich sind. Mit Hilfe des Nachweises des Segmentes IS6 im sogenannten *in situ*-Hybridisationsverfahren konnten wir zeigen, daß die Variante, die einen geringen Block durch Kalziumantagonisten aufweist, im Herzen vorkommt und die Variante, die eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Kalziumantagonisten aufweist, im glatten Gefäßmuskel. Damit ist es uns zum ersten Mal gelungen, die Grundlage der sogenannten gewebsspezifischen Blockade

von Kalziumkanälen durch Kalziumantagonisten aufzuklären. Mit Hilfe des jetzt vorhandenen Wissens können nun Zelllinien hergestellt werden, die gewebsspezifische Kalziumkanäle enthalten. Anhand der so hergestellten Zelllinien lassen sich Substanzen untersuchen, die eine vermutete Gewebsspezifität haben.

### 3 Diskussion

Die in diesem Forschungsvorhaben gefundenen Ergebnisse zeigen über das akute spezielle Forschungsthema hinaus, daß es durch die Kombination von Molekularbiologie, Zellbiologie und elektrophysiologischen Methoden gelingt, Zelllinien zu erstellen, die gewebsspezifische Proteine synthetisieren. Anhand einer Batterie solcher Zellen lassen sich Screening-Verfahren für gewebsspezifische Pharmaka entwickeln. Diese Verfahren sind von großer Notwendigkeit, um zu selektiven, spezifisch wirkenden Pharmaka zu kommen. Die bisherigen Methoden, die Durchführung von Ganztier-Experimenten oder die Anwendung verschiedener Gewebe von Tieren, können durch diese Verfahren sicher nicht komplett abgelöst werden. Auf der anderen Seite erlauben diese modernen Verfahren eine erhebliche Einschränkung des Tierverbrauchs für Screening-Verfahren. Wir schätzen eine Einsparung in der Größenordnung von 90 % der früher verbrauchten Tiere. Eine Weiterentwicklung dieser Zelllinien sollte es erlauben, sie in *high throughput* Screening-Verfahren einsetzen zu können.

### Literatur

- Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stühmer, P., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1990). Primary structure and functional expression of high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Letters* 269, 409-412.
- Hofmann, F., Klugbauer, N., Lacinová, L., Seisenberger, C., Schuster, A. and Welling, A. (1996). The interaction of the L-type calcium channel with calcium channel blockers. In M. Endoh, M. Morad, H. Scholz and T. Iijima (Hrsg.), *Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular regulation* (231-242). Tokyo: Springer-Verlag.

- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340, 230-233.

- Seisenberger, C., Welling, A., Schuster and A., Hofmann, F. (1995). Two stable cell lines for screening of calcium channel blockers. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology* 352, 662-669.

- Welling, A., Kwan, Y. W., Bosse, E., Flockerzi, V., Hofmann, F. and Kass, R. S. (1993). Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels: molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ.Res.* 73, 974-980.

- Welling, A., Ludwig, A., Zimmer, S., Klugbauer, N., Flockerzi, V. and Hofmann F. (1997). Alternatively spliced IS6 segments of the  $\alpha_{1C}$  gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type calcium channels. Submitted.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Franz Hofmann  
Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie  
der Technischen Universität München  
Biedersteiner Straße 29  
D-80802 München