

Aus der Fachrichtung Pharmakologie
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung des Ca²⁺ Kanals TRPV6a im Vergleich zu TRPV6b

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

Vorgelegt von:

Farid Rezaeian

geb. am: 17/01/1979 in Shiraz

Meiner Familie und meinen Freunden

Nihil tam difficile est, quin quaerendo investigari possit

P. Terentius Afer

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/ Summary	6
2 Einleitung	8
2.1 Regulation des Ca ²⁺ Haushaltes	8
2.2 Einteilung der TRP Proteine	11
2.2.1 Identifizierung von TRP Proteinen in Drosophila melanogaster	11
2.2.2 Struktur der TRP Proteine	11
2.2.3 Funktion der TRP Proteine	13
2.3 Ziel der Arbeit	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Arbeitsmaterial und Geräte	17
3.1.1 HEK293-Zelllinie	17
3.1.2 Kulturmedien	17
3.1.3 Fura-2-AM	17
3.1.4 Vektoren	17
3.1.5 Lösungen	18
3.1.6 Datenanalyse	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	19
3.2.2 Transfektion	19
3.2.3 Ca ²⁺ Imaging	20
3.2.3.1 Fluoreszenzindikatoren	20
3.2.3.2 Ratiometrische Ca ²⁺ Bestimmung	20
3.2.3.3 Messplatz	23
3.2.3.4 Versuchsablauf	24
3.2.4 Patch-Clamp Methode	25
3.2.4.1 Einleitung	25
3.2.4.2 Prinzip der Spannungsklemme	26
3.2.4.3 Messkonfigurationen	27

3.2.4.4	Messstand	28
3.3.4.5	Versuchsablauf	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Ca ²⁺ Messungen an hTRPV6 exprimierenden HEK-Zellen	30
4.2	Patch-Clamp Messungen	36
4.2.1	Untersuchungen bei hoher intrazellulärer Ca ²⁺ Pufferung	36
4.2.2	Untersuchungen bei schwacher intrazellulärer Ca ²⁺ Pufferung	40
4.2.3	Spannungsabhängigkeit des TRPV6 vermittelten Ca ²⁺ Einstroms	44
5	Diskussion	47
6	Literaturverzeichnis	50
7	Danksagung	59
8	Lebenslauf	60

1 Zusammenfassung

Kalziumionen (Ca^{2+}) sind als intrazelluläre Botenstoffe an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt wie beispielsweise der Sekretion von Neurotransmittern, der Muskelkontraktion und dem Wachstum bösartiger Zellen. Der in dieser Arbeit untersuchte Ca^{2+} Kanal TRPV6 zählt zu der Familie der Transient Receptor Potential (TRP) Proteine und weist eine strukturelle Verwandtschaft zum Vanilloid-Rezeptor (TRPV1) auf. Das menschliche TRPV6 Gen hat zwei verschiedene Allele. Die beiden TRPV6 Proteine, TRPV6a und TRPV6b, unterscheiden sich in drei Aminosäureresten. Von besonderem medizinischem Interesse ist hierbei die erhöhte Expression von TRPV6 in malignem Prostatagewebe.

Meine Aufgabe war es herauszufinden, ob zwischen TRPV6a und TRPV6b funktionelle Unterschiede bestehen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Ca^{2+} Imaging als auch Patch-Clamp Experimente an TRPV6a oder TRPV6b exprimierenden HEK-Zellen und nicht-transfizierten Zellen durchgeführt. Für den Ca^{2+} selektiven Kanal TRPV6b wurde bereits ein Aktivierungsverhalten in Abhängigkeit von der intrazellulären freien Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nachgewiesen. Ob TRPV6a ähnliche Eigenschaften aufweist, sollte in den optischen und elektrischen Versuchen festgestellt werden. Die Ca^{2+} Imaging Experimente wiesen sowohl für TRPV6a als auch für TRPV6b auf konstitutiv aktive Ca^{2+} Kanäle hin. In den elektrophysiologischen Versuchen waren bei starker intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung einwärts rektifizierende Ströme mit positiven Umkehrpotentialen messbar, die sich für TRPV6a und TRPV6b nicht unterschieden. Bei schwacher Pufferung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war weder in den TRPV6a noch in den TRPV6b exprimierenden Human Embryonic Kidney (HEK)-Zellen ein Ca^{2+} Einstrom aktivierbar.

In dieser Arbeit wurde erstmalig TRPV6a funktionell charakterisiert und mit den biophysikalischen Eigenschaften von TRPV6b verglichen. Die Ca^{2+} Ströme beider TRPV6 Kanäle sind trotz ihrer strukturellen Unterschiede sehr ähnlich. Da TRPV6a im Gegensatz zum TRPV6b Protein eine putative Phosphokinase C (PKC) Phosphorylierungsstelle aufweist, könnte der Phosphorylierungsstatus die Kanalaktivität beeinflussen. Zusätzliche Experimente müssen klären, ob dies der Fall ist und ob ein kausaler Zusammenhang bezüglich der Expression von TRPV6 im Prostatakarzinom besteht.

1. Summary

Calcium ions (Ca^{2+}) are second messengers participating in a number of physiological and pathological processes, such as the secretion of neurotransmitters, muscle contraction and malignant growth. The Ca^{2+} channel TRPV6 is a member of the transient receptor potential (TRP) family of proteins, featuring a close structural relation to the vanilloid receptor (TRPV1). The human TRPV6 gene exhibits two different alleles. Both TRPV6a and TRPV6b differ in three amino acid residues. Interestingly, TRPV6 is up-regulated in malignant prostate tissue.

The aim of the present thesis was to elaborate, whether there are functional differences between TRPV6a and TRPV6b. For this purpose, Ca^{2+} imaging and patch-clamp experiments were performed on TRPV6a or TRPV6b expressing human embryonic kidney (HEK)-cells and non-transfected cells. The Ca^{2+} imaging experiments on TRPV6a and TRPV6b expressing cells indicated constitutively active Ca^{2+} channels. Inward rectifying currents with a positive reversal potential activated when dialysing high concentrations of a Ca^{2+} chelator into TRPV6a and TRPV6b expressing cells. In contrast, no currents developed using a weakly Ca^{2+} buffered intracellular solution. Thus, TRPV6a and TRPV6b channels can be activated by lowering the free intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

This study is the first functional characterisation of TRPV6a in comparison to the biophysical properties of TRPV6b. The Ca^{2+} currents of both TRPV6 channels are quite similar, despite their structural differences. When compared to TRPV6b, TRPV6a possesses a putative additional phosphokinase C (PKC) phosphorylation site, potentially influencing channel activity. Further experiments have to be performed, in order to prove this hypothesis.

2 Einleitung

2.1. Regulation des intrazellulären Ca^{2+} Haushaltes

Der menschliche Organismus besteht aus vielen Milliarden Zellen. Die Koordination dieser mikroskopisch kleinen Funktionseinheiten wird durch Signalmoleküle geregelt. Dazu zählen beispielsweise Hormone und Neurotransmitter. Häufig binden diese Botenstoffe an Rezeptorproteine in der Plasmamembran. Daraufhin werden oft intrazelluläre Enzymkaskaden aktiviert. Änderungen der intrazellulären freien Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) spielen bei der Regulation zahlreicher physiologischer und pathologischer Prozesse eine Rolle wie z.B. der Muskelkontraktion, der Sekretion von Neurotransmittern und der Apoptose (Cohen et al., 1988; Tsien et al., 1991; Hofmann et al., 1994; Zhang et al., 1994; Furuya et al., 1994; Waldron et al., 1994).

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht-stimulierter Zellen beträgt etwa 100 nM, während die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ca. 10000-fach höher ist. Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann durch Ca^{2+} Freisetzung aus Ca^{2+} Speichern erfolgen (Berridge 1993; Clapham 1995). Durch Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird die Phospholipase C (PLC- β) Kaskade aktiviert. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) wird durch die PLC in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die zahlreiche Proteine phosphoryliert (Berridge et al., 1984). IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren, die sich überwiegend im endoplasmatischen Retikulum (ER) befinden. Daraufhin öffnen diese ligandengesteuerte Kanäle, so dass Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol freigesetzt wird. Im Skelettmuskel erfolgt die Ca^{2+} Freisetzung durch das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) über eine direkte Kopplung zwischen den in der Plasmamembran lokalisierten spannungsabhängigen Dihydropyridinrezeptoren und den in SR-Membranen befindlichen Ryanodinrezeptoren (Berridge 1993; Clapham 1995).

Zum anderen kann auch durch Ca^{2+} Einstrom eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht werden (Putney et al., 1981). In erregbaren Zellen (Neurone, endokrine Zellen, Muskelzellen) wird der Ca^{2+} Einstrom hauptsächlich durch spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle (VOCCs = voltage operated calcium channels) reguliert, die während eines Aktionspotentials aktiviert werden (Abb. 1; Tsien et al., 1995).

In nicht-erregbaren Zellen wird der Ca^{2+} Einstrom in Abhängigkeit von dem Füllungszustand intrazellulärer Ca^{2+} Speicher aktiviert (Putney 1986, 1990). Der am besten charakterisierte speicherabhängige Strom ist der so genannte „calcium-release activated calcium current“ (I_{CRAC}), der erstmalig in Lymphozyten und Mastzellen identifiziert wurde (Lewis und Cahalan 1989; Hoth und Penner 1992; Zweifach und Lewis 1993). Nach Entleerung IP_3 -sensitiver Ca^{2+} Speicher aktiviert I_{CRAC} . Die molekulare Identität des CRAC Kanals könnte mit Orai 1 bzw. CRACM 1 identisch sein (Feske et. al., 2006; Vig et. al., 2006; Cai 2007).

Rezeptorgesteuerte Kanäle sind häufig durchlässig für Ca^{2+} und andere Kationen (Abb. 1). Da der Großteil der Ströme von monovalenten Ionen wie Na^+ und K^+ getragen wird, ist der Beitrag zum Ca^{2+} Einstrom gering.

Ligandenkontrollierte Kanäle werden durch intrazelluläre Botenstoffe aktiviert (Abb. 1). Wie bei den rezeptorgesteuerten Kanälen handelt es sich bei den ligandengesteuerten Kanälen meist um unselektive Kationenkanäle.

Mechanismen, die eine Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken sind notwendig, um das Ca^{2+} Gleichgewicht der Zellen aufrecht zu erhalten und eine zeitliche Begrenzung des Ca^{2+} Signals zu setzen. Hierbei stehen der Zelle ATP-abhängige Ca^{2+} -/ Na^+ -Pumpen und Kotransporter sowie verschiedene Ca^{2+} bindende Proteine zur Verfügung. Die Sarko Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) befördert zytosolisches Ca^{2+} in das Lumen des SR bzw. ER. Die Plasmamembran Ca^{2+} ATPase (PMCA) pumpt intrazelluläres Ca^{2+} in den Extrazellularraum (Abb. 1). Zusätzlich gibt es mitochondriale Ca^{2+} Transporter, die Ca^{2+} aus dem Intrazellularraum ins Organellinnere transportieren. Der in der Plasmamembran lokalisierte Na^+ -/ Ca^{2+} -Austauscher befördert passiv Na^+ in die Zelle und im Gegenzug Ca^{2+} in den Extrazellularraum (Abb.1). Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird durch Ca^{2+} bindende Proteine wie z.B. Calmodulin, Calbindin und Calsequestrin gepuffert (Putney 1993; Clapham 1995; Berridge 1997; Barritt 1999).

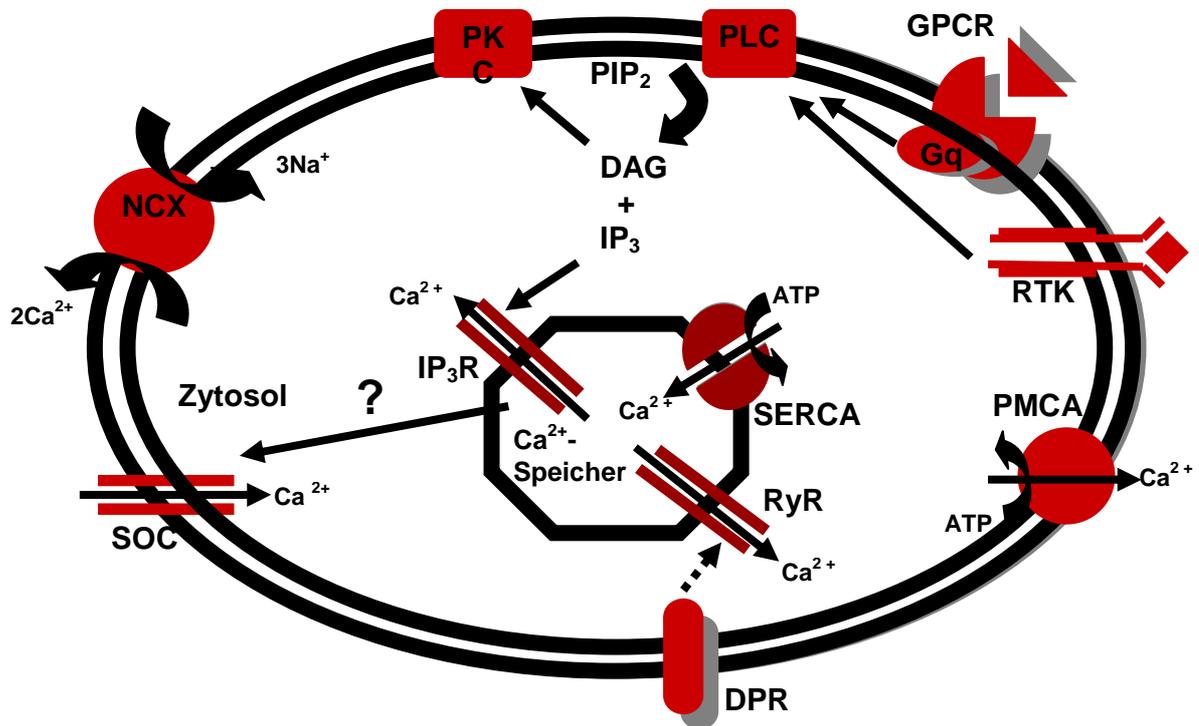


Abb. 1: Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Schematische Darstellung Ca^{2+} permeabler Kanäle in der Plasmamembran und in den Membranen des SR und des ER. Rezeptorgesteuerte Ionenkanäle aktivieren durch Bindung extrazellulärer Agonisten. Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle öffnen bei Membrandepolarisation. Unter physiologischen Bedingungen öffnen speicherabhängige Ca^{2+} Kanäle bei Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen. Daraufhin katalysiert die PLC die Hydrolyse von PIP_2 zu DAG. DAG aktiviert die PKC und IP_3 , bindet an IP_3 -Rezeptoren des ER und setzt hieraus Ca^{2+} frei. Sowohl PKC als auch Ca^{2+} sind an der Inaktivierung des speicherabhängigen Ca^{2+} Stroms I_{CRAC} beteiligt. Zusätzlich zu den IP_3 sensitiven Ca^{2+} -Speichern gibt es die Ryanodin empfindlichen Ca^{2+} Speicher, die vorwiegend in erregbaren Zellen vorkommen.

NCX = $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, SOC = speicher-abhängiger Kanal (store operated channel), PKC = Phosphokinase C, PLC = Phospholipase C, PIP_2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, DAG = Diacylglycerol, IP_3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat, GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor), RTK = Rezeptor-Tyrosinkinase, SERCA = Sarkoendoplasmatische Kalzium-ATPase, PMCA = Plasmamembran Kalzium-ATPase, RyR = Ryanodinrezeptor, DPR = Dihydropyridinrezeptor, IP_3R = IP_3 -Rezeptor.

2.2. Einteilung der TRP Proteine

2.2.1 Identifizierung von TRP Proteinen

Messungen an Photorezeptoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ergaben, dass in einer Mutante das Rezeptorpotential, welches durch einen Einstrom von Kationen über die Plasmamembran nach Belichtung entsteht, transient und nicht wie normalerweise in den Wildtyp Fliegen lang anhaltend war (Montell et. al., 1985). Das mutierte Gen wurde nach dem Phänotyp der Mutante Transient Receptor Potential (TRP) genannt. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass während der Belichtung Ca^{2+} durch einen in der Plasmamembran lokalisierten Kanal, für den das *trp*-Gen kodiert, einströmt (Hardie und Minke 1992; Perez et al., 1994). Um entsprechende Kanäle in Vertebraten zu identifizieren, wurde insbesondere bei Säugern nach homologen Proteinen gesucht. Bislang wurden zahlreiche strukturell ähnliche Proteine identifiziert, die so in verschiedenen Organismen wie Würmern, Fliegen und Säugern vorkommen (Abb. 2).

2.2.2 Struktur der TRP Proteine

Alle TRP Proteine bestehen aus sechs putativen Transmembrandomänen (Segment 1-6) mit einer hydrophoben Schleife zwischen Segment 5 und 6, welche wahrscheinlich die Pore bildet, und aus zytosolisch gelegenem Amino-(N) und Carboxy-(C)Terminus (Abb. 2, 3). Zudem weist das Protein „Ankyrin-like-repeats“ auf, welche möglicherweise bei Interaktionen zwischen Proteinen eine Rolle spielen (Sedgwick et. al., 1999). Aufgrund ihrer Homologie werden die einzelnen Proteine der TRP Familie in mindestens drei Untergruppen unterteilt (Abb. 2; Montell et al., 2002): TRP C, TRP M, TRP V und entferntere TRP verwandte Proteine wie verschiedene Mucopolipine (TRPML), Polycystine (TRPP) und ANKTM1 (nicht abgebildet).

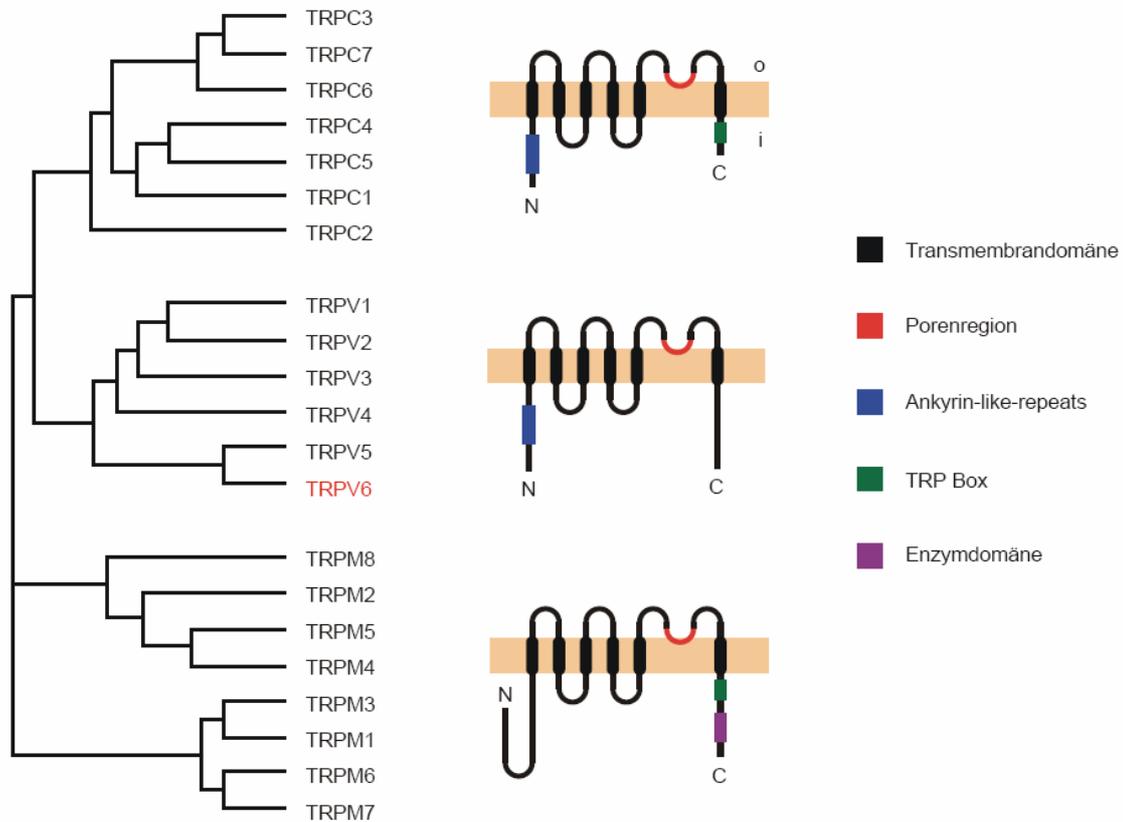


Abb. 2: Stammbaum der TRP Proteine

Die TRP Proteine werden in mindestens drei Untergruppen unterteilt: die klassische (TRPC), die Vanilloid Untergruppe (TRPV) und die Melastatin Untergruppe (TRPM).

Rechts neben dem Stammbaum ist die vorausgesagte Transmembrantopologie für jeweils einen Vertreter der drei Untergruppen dargestellt. Dabei steht C für den zytosolischen Carboxy- und N für den Amino-Terminus. In der Vanilloid und der klassischen Untergruppe sind zudem Ankyrin-like-repeats mit blau markiert. Die Porenregion (rot markiert) befindet sich bei allen Proteinen wahrscheinlich zwischen der Transmembrandomäne 5 und 6 (Bödding 2006).

Entferntere verwandte TRP Proteine sind Mucolipine, Polycystine und ANKTM1, die hier nicht abgebildet sind.

2.2.3 Funktion der Proteine

TRPC Protein Gruppe

Die klassischen TRPC Kanäle weisen zu dem TRP Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* die höchste Homologie auf und zählen zu den am längsten bekannten Vertretern (TRPC1-C7). Bei den TRPC Proteinen handelt es sich um Ca^{2+} durchlässige Kationenkanäle, die bei Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren bzw. Rezeptortyrosinkinasen öffnen.

TRPM Protein Gruppe

Dieser Gruppe gehören acht Mitglieder an, die nach dem Melastatin (TRPM1) benannt wurden (Abb. 2). TRPM1 wurde in menschlichen Melanoma-Zellen identifiziert und weist Eigenschaften eines Tumorsuppressors auf (Duncan et al., 1998, 2001). TRPM2, TRPM6 und TRPM7 sind multifunktionelle Proteine, die neben einer Porenregion jeweils auch eine Enzymdomäne aufweisen (Nadler et al., 2001; Perraud et al., 2001; Runnels et al., 2001; Sano et al., 2001). TRPM8 mRNA wird unter anderem in Hinterwurzel- und Trigeminalganglien sowie in Prostatakarzinomen exprimiert. Temperaturen unterhalb von 26°C und kühlende Substanzen wie Menthol und Icilin aktivieren TRPM8 (Tsavaler et al., 2001; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Allen Mitgliedern dieser Gruppe ist das Fehlen von „Ankyrin-like-repeats“ gemeinsam (Abb. 2; Harteneck et al., 2000; Montell et al., 2001, 2002).

TRPV Protein Gruppe

TRPV Kanäle werden nach dem Vanilloid Rezeptor TRPV1 benannt, der bei der Schmerzwahrnehmung und Temperaturempfindung eine Rolle spielt (Caterina et al., 1997). TRPV1 ist ein Kationenkanal, welcher in dorsalen Wurzeln, sensorischen Ganglien und in den Hinterhörnern des Rückenmarks exprimiert wird. Andere temperaturabhängige Kanäle sind TRPV4 (>25°C), TRPV3 (>31°C) und TRPV2 (>52°C) (Guler et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002; Peier et al., 2002; Caterina et al., 1997, 1999).

TRPV5 und TRPV6

Diese beiden Ionenkanäle bilden aufgrund struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten eine eigene Untergruppe. TRPV5 und TRPV6 sind Ca^{2+} Kanäle, die bei geringen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktivieren (Nilius et al., 2001; Bödding, Wissenbach, Flockerzi 2002). Ihre mRNA kommen hauptsächlich in Niere (TRPV5), Darm (TRPV5/6), Plazenta (TRPV6) und Pankreas (TRPV6) vor und sind vermutlich für die epitheliale Ca^{2+} Resorption verantwortlich (Hoenderop et. al., 1999; Peng et. al., 1999). Die TRPV6 cDNA wurde ursprünglich aus dem Duodenum der Ratte kloniert und das Protein als Ca^{2+} Transporter (CaT) bezeichnet (Peng et al., 1999). Die TRPV6 mRNA wird beim Menschen im Gegensatz zur Maus vermutlich nicht in Niere und Darm exprimiert, sondern vorwiegend in Plazenta und Pankreas (Wissenbach et al., 2001; Hirnet et. al., 2003; Wissenbach und Niemeyer 2007). Von besonderem medizinischen Interesse ist die Expression von TRPV6 Transkripten in malignen, nicht aber in benignen Zellen der Prostata (Wissenbach et al., 2001).

Es existieren zwei Allele des TRPV6 Gens: Typ a und Typ b, die sich in fünf Basen unterscheiden (Wissenbach et al., 2001). Als Folge dieses genetischen Polymorphismus entstehen zwei Proteine, die sich durch drei Aminosäureaustausche, R bzw. C an Position 158, V bzw. M an Position 378 und T bzw. M an Position 681 für TRPV6a bzw. TRPV6b, differenzieren lassen (Abb. 3). Der N-terminal gelegene Unterschied in den Aminosäureresten Arginin bzw. Cystein führt zu einer möglichen Phosphorylierungsstelle (SPR) für die Phosphokinase C (PKC) in dem TRPV6a Protein. Bislang wurden alle funktionellen Untersuchungen des TRPV6 Proteins an der b-Variante vorgenommen.

TRPV6		MG	2
TRPV1	MEQRASLDSESESESPQENSCLDPPDRDPNCKPPPVKPHIF'TT'RSRTRLFGKGDSEASP		60
TRPV6	LSLPKEKG-----LILCLWSKFCRWFQRR---ESWAQSRDEQNLLQOK-RIWESP-LLLA		52
TRPV1	LDCPYEEGGLASCPITVSSVLTIQRPGDGPASVRPSSQDSVSAGEKPPRLYDRRSIFDA		120
TRPV6	AKDNDVQALNKLLKYEDCKVH-----QRGAMGETALHIAAL-YDN--LEAMVLMEAA		102
TRPV1	VAQSNCOELESLLPFLQSRKRLTDSEFKDPETGKTCLLKAMLNHNGQNDTIALLLDVA		180
TRPV6	-----PELVFEPMTSELYEGQTALHIAVNVQNMNLVRAALLARRASVSARATCTAFRRSP		156
TRPV1	RKTDLSLKQFVNASYTDSYKQQTALHIAIERRNMTLVTLVENGADVQAAANGDFFKKT		240
TRPV6	R -NLIYFGHEPLSFAACVNSEEIVRLLIEHG---ADIRAQDSLGN'TVLHILILQP-----		207
TRPV1	GRPGFYFGELPLSLAACTNQLAIVKFLQNSWQPADISARDSVGNTVLHALVEVADNTVD		300
TRPV6	NKTFACQMYNLLLSDRHDHLOPLDLVPHQGLTPFKLAGVEGNTVMFQHLMQ-----		261
TRPV1	NTKFVTSMYNEILILGAKLHPTLKLEEITNRKGLTPLALAASSGKIGVLAYILQREIHEP		360
TRPV6	-----KRKHTQWYTGPLTSTLYDLTEIDSSGDEQSLELELIITTK-KREAR-QILDQTPVK		314
TRPV1	ECRHLRKRFTWAYGPVHSSLYDLSCIDTC-EKNSVLEVIAYSSSETPNRHDMLLVEPLN		419
TRPV6	ELVSLKWKRYGRPYFCMLGAIYLLYIICFTMCCIYRPLKPRNTNRTSPRDNTLLQOKLLQ		374
TRPV1	RLLQDKWDRFVKRIFYFNFFVYCLYMIIFTAAAYR'PVEG-----LPP-----YKLN--	S1	467
TRPV6	V EAYTPKDDIRLVGELVTVIGAI IILLVEVPDIFRMGVTRFFGQ'TILGGPFHVLIIITYAF		434
TRPV1	----TVGDYFRVTGEILSVSGVYFFFRGIQYFLQRRPS--LKSLFVDSYSEILFFVQSL	S2	521
TRPV6	MVLVTMVMRLISASGEVVPMSFALVVGWCNVMYFARGFQMLGPFTIMI'QKMI'FGDLMRFC		494
TRPV1	FMLVSVVLYFSQRKEYVASMVFLAMGWTNMLYYTRGFQQMGIYAVMIEKMI'LRDL'CRFM	S4	581
TRPV6	WMAVVILGFASAFYIIFQTED----PEE-----LG-HFYDYPMALFSTFELV		537
TRPV1	FVYLVFLFGFSTAVVTLIEDGKNNSLPMESTPHKCRGSACKPGNSYNSLYSTCLEL'FKFT	S5	641
TRPV6	LTIIDGPANYNDL'PFMYSITYAFAI'ATLLMLNLLIAMMGDTHWRVAHERDELWRAQI		597
TRPV1	IGMGDLEFTENYDFKAVFI ILLLAYVILTYI LLLNMLIALMGETV'NKIAQESKNI'WKLQR	S6	701
TRPV6	VATTVMLEKLRCLWP--RSG---ICGREYGLGD--RWFLRVEDRQDLNRQRIQRYAQA		650
TRPV1	AITILDTEKSFLKCMRKA'FRSGKLLQVGF'PDGKDDYRWC'FRVDEVNWT'TWNT'NVIINE		761
TRPV6	FHTR---GSEDLKDSV-EKLELGC'PFSPHLSL T PSVSRSTSRSSANWERLRQGLRR		705
TRPV1	DPGN--CEGVKRTLSFSLRSGRVSGRNWKNFALVPLLRDASTRDRHATQ'QEEVQLKHYTG	M	819
TRPV6	DLRGIINR'GLEDESWEYQI*		725
TRPV1	SLKPEDA'EVFKDSMVPGEK*		838

Abb. 3: Aminosäuresequenz der beiden TRPV6 Proteine im Vergleich zu TRPV1

Das menschliche TRPV6 Protein kommt in zwei Varianten vor. Die a- und b-Variante unterscheiden sich in drei Aminosäureresten in Position 157 (R bzw. C), 378 (V bzw. M) und 681 (T bzw. M). Zum Vergleich ist die Aminosäuresequenz des ersten Vertreters der TRPV Familie abgebildet (modifiziert nach Wissenbach et al., 2001).

2.3 Ziel der Arbeit

Ziel meiner Arbeit ist die erstmalige funktionelle Charakterisierung des TRPV6a Kanals. Die mittels zytosolischer Ca^{2+} Messungen und elektrophysiologischer Versuche gewonnenen Daten sollen mit den bereits bekannten Eigenschaften des TRPV6b Kanals verglichen werden, um mögliche Unterschiede zwischen beiden Proteinen festzustellen. Interessanterweise wird TRPV6 in malignem Prostatagewebe exprimiert (Wissenbach et al., 2001). Dabei konnte TRPV6a vor allem in der afroamerikanischen Bevölkerung nachgewiesen werden (Akey et al., 2006), welche etwa doppelt so häufig wie weiße US-Amerikaner und viermal häufiger als Europäer an Prostatakarzinom erkranken. Asiaten hingegen erkranken viel seltener (Brawley et al., 1998). Neben sozioökonomischen Faktoren sind auch genetische Faktoren für diese familiäre Häufung verantwortlich (Shavers und Brown, 2002). Ein Zusammenhang zwischen TRPV6 Expression und Inzidenz bzw. Mortalität des Prostatakarzinoms wäre hierbei denkbar und könnte für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden sowie pharmakologischer Therapiekonzepte hilfreich sein.

3. Material und Methoden

3.1 Arbeitsmaterial und Geräte

3.1.1 HEK-293-Zelllinie (ATCC (American Type Culture Collection), 1573-CRL):

Dabei handelt es sich um eine Zelllinie aus Fibroblasten der menschlichen embryonalen Niere.

3.1.2 Kulturmedien

HEK-293, 293hTRPV6b-1d (stabil transfizierte Zelllinie)

Menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK 293) wurden in Minimum Essential Medium (MEM, Kat. Nr. 31095-029, Invitrogen) kultiviert, dem 10 % fetales Kälberserum (FCS, Kat. Nr. 10270, Invitrogen) zugesetzt war. Zusätzlich enthielt das Medium im Falle der stabil hTRPV6 transfizierten Zelllinie 293hTRPV6b-1d 500 µg/ml Geneticin (G 418, Kat. Nr. 10131-019, Invitrogen).

3.1.3 FURA-2-AM (Molecular Probes Inc.): Es handelt sich hierbei um ein Acetyloxymehtylester des Fluoreszenzindikators Fura-2. Durch die Veresterung ist Fura-2-AM membrangängig. Nach Aufnahme in die Zelle erfolgt die Abspaltung der Estergruppen durch endogene Esterasen, so dass die Ca^{2+} bindende Säure entsteht. Diese liegt bei physiologischem pH-Wert als Salz vor, das zu hydrophil ist, um über die Plasmamembran aus dem Zytosol zu gelangen (Tsien et al., 1981).

3.1.4 Vektoren

Das Plasmid pcDNA3 wurde zur cDNA-Amplifikation in *Escherichia coli*, zur Mutation von cDNA und zur Proteinexpression *in vitro* oder nach Transfektion in HEK-293 Zellen verwendet. Es beinhaltet prokaryotische, eukaryotische und virale Elemente. Der bakterielle high copy Replikationsursprung ColE1 origin sowie das Gen für die β -Lactamase ermöglichen Amplifikation des Plasmids und Selektion der plasmid-

tragenden Bakterien. Die Phagen-Promotoren T7 und Sp6, welche die multiple Klonierungsstelle flankieren, dienen der strangspezifischen *in vitro* Transkription, z.B. bei der kombinierten *in vitro* Transkription und Translation einer cDNA. Die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen steht unter der Kontrolle des viralen Cytomegalo Virus (CMV)-Promotors.

3.1.5 Lösungen

Für die Ca^{2+} Imaging Experimente wurden zwei Badlösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet.

145 mM NaCl	145 mM NaCl
10 mM HEPES	10 mM HEPES
2.8 mM KCl	2.8 mM KCl
2 mM MgCl_2	2 mM MgCl_2
2 mM CaCl_2	1 mM EGTA

Die Patch-Clamp Experimente wurden mit einer modifizierten Ringerlösung durchgeführt. Dabei wurde die Messpipette mit einer Cs-Aspartat haltigen Lösung befüllt. Sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Lösung wurden jeweils mit NaOH bzw. CsOH auf einen pH-Wert von 7.2 titriert. Die Osmolaritäten lagen zwischen 290 und 310 mosm/l.

<u>intrazellulär</u>	<u>extrazellulär</u>
145 mM Cs-Aspartat	145 mM NaCl
8 mM NaCl	10 mM HEPES
1 mM MgCl_2	2.8 mM KCl
10 mM HEPES	2 mM MgCl_2
2 mM Mg-ATP	10 mM CaCl_2
10 mM oder 0.1 mM EGTA	10 mM CsCl

3.1.6 Datenanalyse

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software "PulseFit" (HEKA Electronics) und der "IGOR-Macro-language" Software (Wave Metrics, Lake Oswego, OR, U.S.A.). Die Ströme wurden durch Spannungsrampen ausgelöst und bei -80 mV gemessen. Die statistische Analyse der Werte erfolgte durch Bildung der Mittelwerte mit beidseitiger Standardabweichung (\pm S.E.) der Mittelwerte (s.e.m.) aus der Anzahl (n) der gemessenen Zellen. Zum Vergleich der Mittelwerte untereinander wurde der ungepaarte t-Test für ungleiche Varianzen mit $p \leq 0,05$ herangezogen. Signifikante Änderungen sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet oder im Text erwähnt.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter einer Reinraumwerkbank (Holten Lamin Air, Modell S 2010) durchgeführt. Gebrauchsgegenstände, wie Pipetten oder Kulturflaschen wurden entweder autoklaviert oder es wurden sterile Kunststoff-Einwegartikel verwendet. Alle Lösungen wurden autoklaviert oder waren bereits steril. Die Zellen wurden in Bicarbonat-gepufferten Medien im Begasungsbrutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um den Gasaustausch mit der Umgebung zu ermöglichen, wurden die Deckel der Kulturflaschen nicht vollständig geschlossen.

3.2.2 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in lebende Zellen. Zur transienten Transfektion von HEK-Zellen mit TRPV6 cDNA wurde das PolyFect Transfektion Reagenz (Qiagen) eingesetzt. Bei dieser Methode wird die DNA an ein kationisches Polymer, ein so genanntes aktiviertes Dendrimer gebunden. Der positiv geladene DNA/Dendrimer-Komplex bindet an negativ geladene Oberflächenmoleküle der Zelle und wird dann endozytotisch aufgenommen; daher spricht man auch von einer Ladungs-basierten Transfektionsmethode.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion passagiert und in Zellkulturschälchen von 3,1 cm Durchmesser ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen 60-70 % Konfluenz aufweisen. Pro Transfektion wurden etwa 2-3 µg Plasmid-DNA in 100 µl Optimem 1-Medium mit Glutamax-I (Invitrogen) ohne FCS-Zusatz aufgenommen, 10 µl PolyFect Reagenz hinzugefügt, der Ansatz intensiv gemischt und 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Optimem-Medium ohne FCS-Zusatz gewaschen und anschließend mit 1,5 ml MEM-Medium mit FCS-Zusatz überschichtet. Zu den DNA-Lösungen wurden je Ansatz 600 µl MEM-Medium pipettiert, die Ansätze gründlich gemischt und in die Kulturschälchen überführt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion für die optischen bzw. elektrischen Messungen verwendet.

3.2.3 Ca²⁺ Imaging

3.2.3.1 Fluoreszenzindikatoren

Fura-2 ist ein fluoreszierender Komplexbildner für zweiwertige Kationen. Die Dissoziationskonstante des Ca²⁺-Fura-2-Komplexes liegt bei etwa 224 nM (Grynkiewicz et al., 1985). Aufgrund der hohen Ca²⁺ Affinität ist Fura-2 zur Bestimmung physiologisch vorkommender Ca²⁺ Konzentrationen in lebenden Zellen geeignet. Fura-2 ist eine organische Säure und als Salz gut wasserlöslich. Fura-2-AM ist ein Acetyloxymethylester-Derivat, das durch die Veresterung der Carboxylgruppen lipophil und damit membrangängig ist. Es wird in die Zelle aufgenommen und reichert sich dort an. Im Zytosol vorkommende Esterasen spalten die Esterbindungen, so dass aus Fura-2-AM das Ca²⁺ bindende Fura-2 entsteht (Tsien et al., 1981).

3.2.3.2 Ratiometrische Ca²⁺ Bestimmung

Fura-2 eignet sich besonders gut für Ca²⁺ Messungen, da ein Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und [Ca²⁺] besteht. Wenn eine FURA-2 beladene Zelle mit Anregungslicht der Wellenlänge 340 nm beleuchtet wird, fluoresziert der

Farbstoff bei ca. 510 nm mit der Intensität F_{340} . Bei hoher $[Ca^{2+}]_i$ (43,4 μ M) verschiebt sich das Maximum der Fluoreszenzintensität auf eine Wellenlänge von 340 nm. Die Fluoreszenzintensitäten sind nicht nur von der Ca^{2+} Beladung des Farbstoffs abhängig, sondern auch von der Fura-2 Konzentration, der Zelldicke und einer Konstante, die von den optischen Eigenschaften der Messapparatur abhängt.

Da aber die Zelldicke unbekannt ist, ist es nicht möglich die $[Ca^{2+}]_i$ aus der Intensität des Fluoreszenzlichtes F_{340} zu berechnen. Hier hilft nun die Eigenschaft von Fura-2, auf Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem Anstieg von F_{340} und einem Abfall von F_{380} zu reagieren: Führt man zwei Fluoreszenzmessungen kurz hintereinander durch, und zwar mit einem Anregungslicht von 340 nm und bei 380 nm, ändern sich weder Farbstoffkonzentration noch Zelldicke oder die Konstante zwischen den beiden Messungen (Abb. 4). Wenn man dann die beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} dividiert, ist es möglich die drei unbekanntenen Größen zu kürzen. Durch diese Methode erhält man eine experimentell bestimmbare Messgröße (den Quotienten F_{340}/F_{380}), die nur von der $[Ca^{2+}]_i$ abhängt. Der Quotient F_{340}/F_{380} wird oft mit R (englisch: ratio) bezeichnet. Dieser Quotient ermöglicht die Messung absoluter $[Ca^{2+}]_i$ in lebenden Zellen, weil er unabhängig von der Farbstoffkonzentration und der Zellform ist (Grynkiewicz et al., 1985).

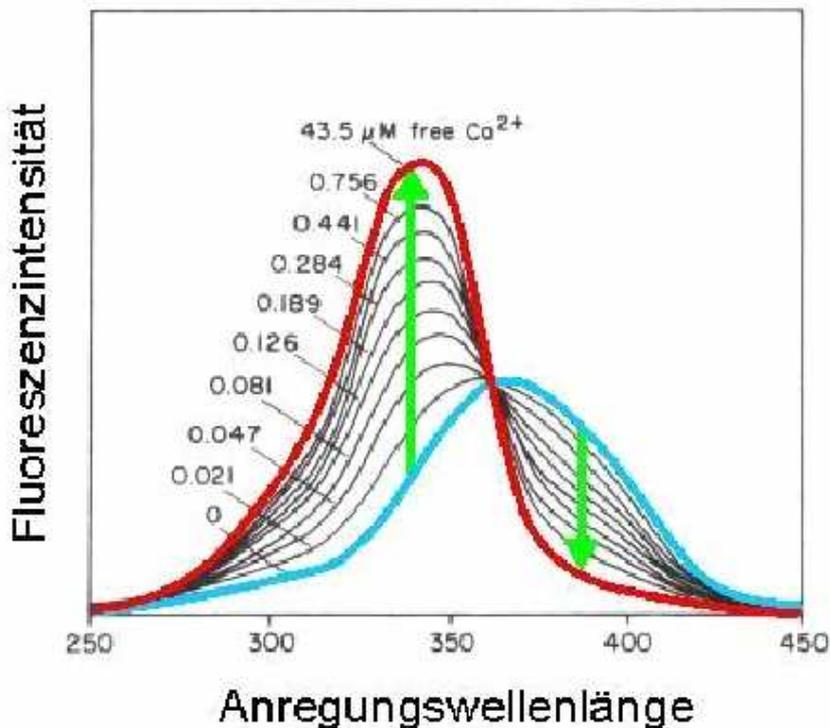
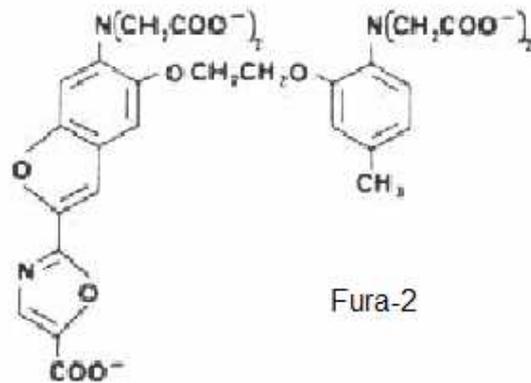


Abb. 4: Strukturformel und Emissionsspektrum von Fura-2

Hier ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit ultraviolettem Licht dargestellt. Die Fluoreszenz ändert sich sowohl mit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch mit der $[Ca^{2+}]$. In Ca^{2+} freier Lösung wird das **blaue Spektrum** mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 365 nm gemessen. Bei hoher $[Ca^{2+}]$ von 43,5 μM verschiebt sich das Maximum auf 340 nm, und das **rote Spektrum** wird gemessen. Nur bei 360 nm, dem isobestischen Punkt, ist die Fluoreszenz unabhängig von der $[Ca^{2+}]$. Bei Zugabe von Ca^{2+} zu einer Fura-2-Lösung ergeben sich also zwei gegenläufige Änderungen der Fluoreszenzintensitäten (**grüne Pfeile**): Eine Zunahme bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und eine Abnahme bei 380 nm. Auf diesem Effekt beruht die Verwendung von Fura-2 als ratiometrischer Ca^{2+} Indikator.

3.2.3.3 Messplatz

Der Messaufbau des Imaging-Setups besteht aus einem inversen Mikroskop, mit dem die zu untersuchenden Zellen von unten betrachtet werden können und einem daran angeschlossenen Imaging-System (T.I.L.L. Photonics). Dieses umfasst eine monochromatische Lichtquelle für die Anregung von Fura-2, einen dichroitischen Filter zur Auskopplung des emittierten Fluoreszenzlichtes, eine im Emissionsstrahlengang angebrachte Kamera und ein computergestütztes Auswertungssystem (Gryniewicz et al., 1985; Caterina et al., 1997, 2000; Tominaga et al., 1998). Bei dem dichroitischen Spiegel (engl. dichroic mirror) handelt es sich um einen Spiegel, der nur einen Teil des Lichtspektrums reflektiert und den nicht reflektierten Anteil durchlässt. Er trennt das einfallende Licht nach der Wellenlänge und somit nach der Farbe (Abb. 5).

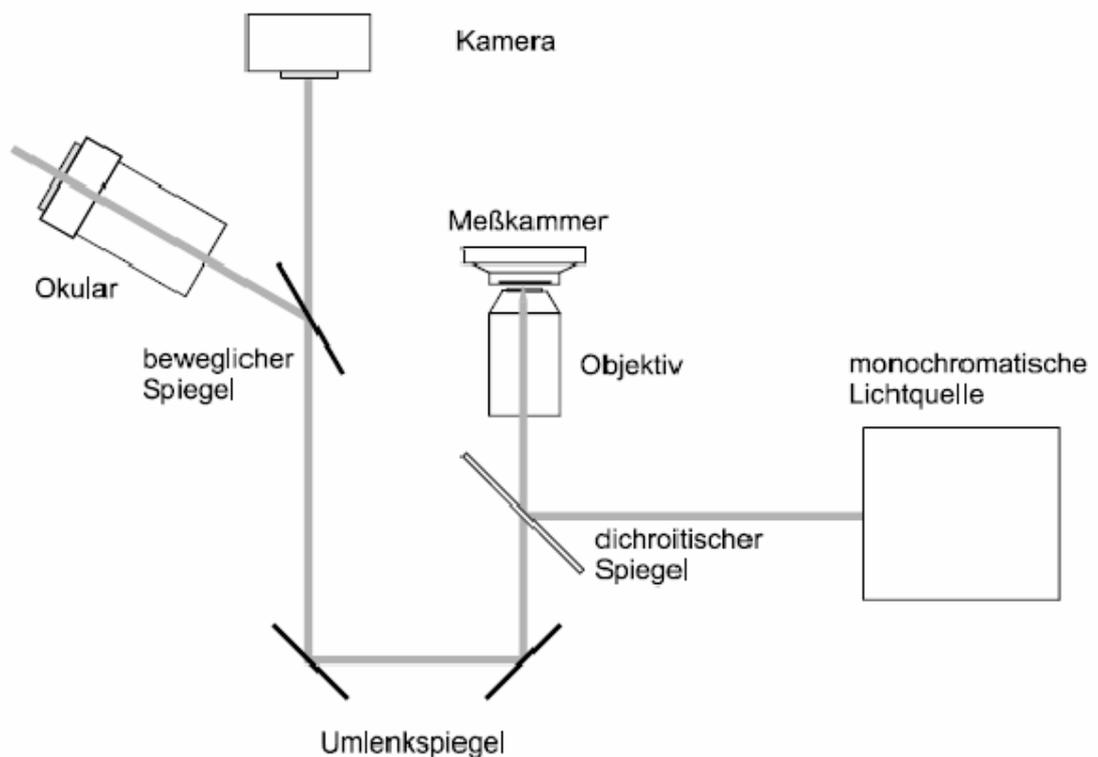


Abb. 5: Strahlengang im Imaging-Setup

3.2.3.4 Versuchsablauf

Vorbereitung:

Zu Beginn des Versuchs werden die benötigten Reagenzien angesetzt:

- 100 ml Ca^{2+} haltige Ringerlösung (2 mM Ca^{2+})
- 100 ml EGTA-haltige Ringerlösung (1 mM EGTA)
- Fura-Stammlösung (50 μg Fura-2 in 50 μl DMSO = 3 μM Fura-2)

Hiernach erfolgt die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2:

- Die mit hTRPV6-Zellen beschichteten Deckgläser werden in Schalen überführt.
- Es erfolgt anschließend eine 30-minütige Inkubation in 1.5 ml Medium und 4.5 μl Fura-2-AM-Stammlösung bei 37°
- Danach muss mehrmals mit einer Ca^{2+} haltigen Ringerlösung gewaschen werden, um extrazelluläres Fura-2 zu entfernen.

Zeitverlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRPV6-transfizierten Zellen vs. Kontrollzellen:

- Die Deckgläschen mit den Zellen werden jeweils in eine Messkammer eingespannt und 300 μl Ca^{2+} -haltige Ringerlösung zupipettiert.
- Jetzt erfolgt die Fokussierung des Kamerabildes im „live“-Modus.
- Anschließend wird die optimale Belichtungszeit ermittelt (Anhaltspunkt: FURA-Filtersatz, Start-time: 0, Cycle-time: 2000, Numbers of Cycles: 500, Exposure time: 20 ms).
- Jetzt kann die Messung gestartet werden (500 frames, Anregungswellen: 340 nm und 380 nm, Belichtungszeit wie ermittelt, Intervall: 2 s).
- Nach 400 Sekunden erfolgt Zugabe von 900 μl der EGTA-haltigen Ringerlösung (1 mM). Dabei ist darauf zu achten, dass Zellen nicht weggespült werden.

3.2.4 PATCH-CLAMP METHODE

3.2.4.1 Einleitung

Mit der Patch-Clamp Technik (Hamill et al., 1981; Neher & Sakmann, 1992; Hille, 1992) können Ionenkanäle in Zellmembranen funktionell untersucht werden. Die Registrierung von Strömen mit geringer Amplitude (Tausendmilliardstel Ampère) ist mit Hilfe dieser Messtechnik an biologischen Membranen möglich.

Der Physiker Erwin Neher und der Mediziner Bert Sakmann haben die Patch-Clamp Technik entwickelt. Das Problem der unvollständigen Abdichtung zwischen Mikropipette und Zellmembran wurde durch Säubern der Zelloberfläche durch Behandlung mit Kollagenasen und Proteasen, Filtrieren der Lösungen, Beschichtung der Pipettenoberfläche und der Optimierung der Pipettenspitze gelöst und damit ein engerer Kontakt hergestellt.

Schließlich konnten an einem denervierten Froschmuskel Einzelkanalströme durch den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (n-Ach-Rezeptor) auf dem Oszilloskop aufgezeichnet werden (Neher und Sakman, 1976). Diese rechteckigen Signale gleicher Amplitude aber unterschiedlicher Dauer belegten frühere Hypothesen, dass Ionenkanäle nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip öffnen und schließen. Neher stellte durch Zufall fest, dass durch Ansaugen der Zellmembran durch die frisch polierte Messpipette der Abdichtwiderstand bis in den Gigaohm-Bereich gesteigert werden konnte (Hamill et al., 1981). Für die Entwicklung der Patch-Clamp Technik und den so möglichen elektrophysiologischen Untersuchungen von Ionenkanälen, erhielten Neher und Sakman 1991 den Nobelpreis für Medizin.

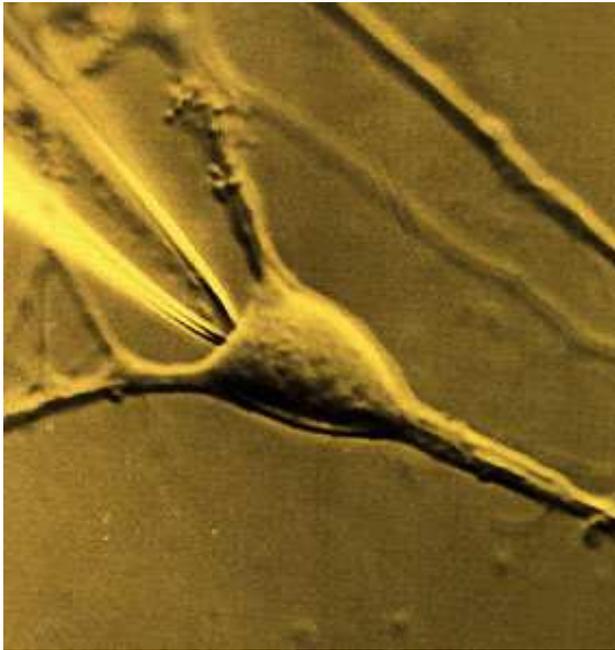


Abb. 6: Darstellung des engen Kontaktes zwischen Pipette und der Zelloberfläche einer Neuronenzelle

Diese Abbildung veranschaulicht den engen Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zellmembran (Neher & Sakmann 1992).

3.2.4.2 Prinzip der Spannungsklemme

Um Änderungen des Membranpotentials zu verhindern, wird ein sog. Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Ionenstrom, der über die Membran fließt, diesem aber entgegengerichtet ist (negativer Rückkopplungsmechanismus). Es wird also das Membranpotential der Zelle gemessen und mit einem vorgegebenen gewünschten Wert der so genannten Sollspannung U_{soll} verglichen. Bei Unterschieden zwischen der Sollspannung und der tatsächlich gemessenen Membranspannung wird ein entgegengerichteter Strom in die Zelle injiziert. Dieser sehr kleine Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp Experimenten gemessen. Er lässt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von den Ionenkanälen oder Ionentransportern bestimmt wird.

3.2.4.3 Messkonfigurationen

Die Patch-Clamp Technik wird in verschiedenen sog. Konfigurationen angewendet. In meinen Experimenten wurde der Strom in der Ganzzell-Konfiguration gemessen. Hierfür muss zuerst ein hoher Abdichtwiderstand zwischen Messpipette und Plasmamembran hergestellt werden. Von dieser als cell-attached bezeichneten Messkonfiguration kann durch einen kräftigen, kurzen Saug- oder Spannungspuls (zwischen 0.5 und 1 V für 0.5 bis 1 ms) ein Loch in die Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung gebrochen werden. Die Ganzzell-Konfiguration ist besonders für kleine Säugetierzellen geeignet. Damit ist es möglich, Ströme durch Kanäle der Zellmembran zu messen.

Durch Wegziehen der Pipette von der Zelle kann ein Zellmembranflecken abgelöst werden. Die aus der Pipette ragenden Membranränder verschließen sich sofort wieder, so dass die Außenseite der Zellmembran in Richtung der Badlösung weist. In diesen Outside-out („Außen-Außen“) patches werden meist rezeptorgesteuerte Ionenkanäle vermessen, da Lösungen von der extrazellulären Seite appliziert werden können (Abb. 7).

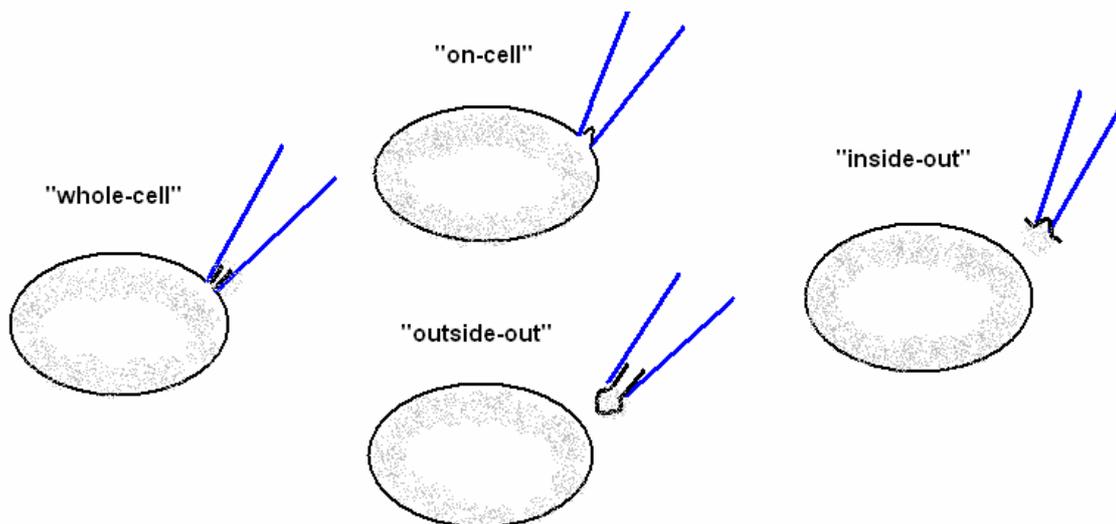


Abb. 7: Übersicht der unterschiedlichen Messkonfigurationen

Diese Abbildung zeigt eine schematische Übersicht der wichtigsten Messkonfigurationen, die bei der Patch-Clamp Methode verwendet werden. In den Experimenten meiner Dissertation wurde ausschließlich die Ganzzell-Konfiguration („whole-cell“) verwendet, bei der Ströme durch Kanäle einer Zelle gemessen werden.

3.2.4.4 Messstand

Der typische Messplatz zur Durchführung von Patch-Clamp Experimenten besteht aus optischen, mechanischen und elektrischen Komponenten. Zum Schutz vor Schwingungen sollte der Messplatz erdnah in einem möglichst störfreien Raum des Gebäudes aufgestellt und durch Tischbeine aus Styropor, Tennisbällen oder Reifengummis gestützt werden. Um Störungen durch vertikale Bewegungen vorzubeugen, verwendet man üblicherweise Pressluft-gelagerte, schwere Tischplatten.

Zur kontrollierten Steuerung der Pipette in Richtung Zelloberfläche benötigt man so genannte Mikromanipulatoren, die auf mechanische, hydraulisch-pneumatische, motorische oder piezoelektrische Art und Weise eine koordinierte Bewegung im dreidimensionalen Raum ermöglichen.

Ein Faradaykäfig schirmt den Messstand vor elektrischen Störeinflüssen ab. Kleidet man den Käfig mit dunkler, lichtabsorbierender Pappe aus, dann lassen sich Experimente mit lichtempfindlichen Substanzen durchführen.

Mit einer an dem Mikroskop angebrachten Videokamera ist es möglich unter visueller Kontrolle eine sehr präzise Annäherung der Pipettenspitze an die Zellmembran durchzuführen. Ein weiterer Vorteil einer Kamera liegt in der Beobachtung der Zellmorphologie während der Messungen.

Zum Ableiten der Ströme wird einem Hauptverstärker ein Vorverstärker vorgeschaltet, welcher den Strom vergrößert und damit diesen vor dem Hintergrundrauschen schützt. Gemessen wird mit Hilfe von zwei Elektroden. Dabei befinden sich die Referenzelektrode in der Badlösung und die Messelektrode in der mit der intrazellulären Lösung gefüllten Glaskapillare. Letztere ist direkt über einen mit Teflon isolierten BNC-Stecker mit dem Vorverstärker verbunden. Chlorid ist Ladungsträger der Ag/AgCl-Elektroden. Im Hauptverstärker folgt anschließend sowohl die Amplifikation als auch die Filterung des Signals. Die Messgrößen werden über einen A/D-(analog/digital)-Wandler direkt in den Computer überführt. Zur Applikation von Spannungsänderungen an der Zellmembran dient ein Pulsgenerator, dessen digitale Signale in einem D/A-Wandler in Spannungssignale umgewandelt werden.

3.2.4.5 Versuchsablauf

Die Pipetten werden in der Hitze mit einem Puller aus einer Glaskapillare gezogen. Das Ausziehen der Glaspipette erfolgt in zwei Stufen. In der ersten hat die Erhitzung innerhalb der Heizspule eine Dehnung der Glaskapillare zur Folge und in der zweiten Phase bewirkt der Temperaturanstieg den Bruch der Kapillare woraus die zwei symmetrischen Pipetten entstehen.

Unter Aussparung der Pipettenöffnung wird der vordere Teil der Pipette mit einer isolierenden Schicht überzogen, um das Signal-Rauschverhältnis bei Strom- und Kapazitätsmessungen zu verbessern. Durch die anschließende Hitzepolierung der Pipettenspitze werden die Glasränder geglättet, damit die Zellen nicht verletzt werden und um einen Gigaseal zu ermöglichen. Die so fertig gestellte Pipette wird je nach Messkonfiguration in eine intra- oder extrazelluläre Lösung eingetaucht, wodurch sie aufgrund der Kapillarkräfte Flüssigkeit aufnimmt.

Bei der Füllung der Pipette durch eine Spritze vom anderen Ende muss darauf geachtet werden, keine Luftblasen zu erzeugen, um eine mögliche Unterbrechung des Kontakts zwischen Elektrolytlösung und Ag/AgCl-Elektrode zu vermeiden.

Wird die Messelektrode in die Badlösung eingetaucht, schließt sich der elektrische Schaltkreis zur Referenzelektrode und ein Strom kann gemessen werden. Daraus kann nach dem Ohm'schen Gesetz ($R=U/I$) der Pipettenwiderstand berechnet werden, welcher in meinen Experimenten stets einen Wert zwischen 2 und 5 M Ω betrug. Bei Annäherung der Pipette an die Zelle nimmt der Widerstand zu und der Strom ab. Berührt die Pipette die Zellmembran, wird über einen an den Pipettenhalter angeschlossenen Schlauch vorsichtig gesaugt. Durch Depolarisation kann das Erreichen des Gigaseals beschleunigt werden.

Zur Überführung des momentan geschaffenen On-cell-Modus in die Ganzzell-Konfiguration wird ein zweiter, diesmal stärkerer und kürzerer Saugstoß appliziert, der die Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung aufbrechen lässt. Nach Kompensation der kapazitiven Transienten kann die Messung beginnen.

Das hierbei verwendete Spannungsprotokoll besteht aus Rampen (von -110 mV bis +90 mV in 50 ms), welche alle zwei Sekunden appliziert werden. Hierfür wurde die PULSE Software (HEKA Electronics) benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Ca^{2+} Messungen an hTRPV6 exprimierenden HEK-Zellen

Funktionelle Untersuchungen an der b-Variante von TRPV6 ergaben, dass es sich bei diesem Protein, um einen Ca^{2+} durchlässigen Ionenkanal handelt (Wissenbach et al., 2001). Ob dies auch für die a-Variante gilt, sollte durch Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transfizierter Zellen festgestellt werden. In diesen Experimenten wurde zuerst die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter annähernd physiologischen Bedingungen gemessen, indem eine extrazelluläre Ringerlösung verwendet wurde, die 2 mM Ca^{2+} enthielt. Anschließend erfolgte die Entfernung freier extrazellulärer Ca^{2+} Ionen durch die Zugabe des Chelators EGTA in die Badlösung. Eine Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wies auf einen konstitutiv aktiven Ca^{2+} Einstrom hin.

Die Abbildung 8 zeigt eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzverhältnisses (F_{340}/F_{380}) in TRPV6a exprimierenden HEK-Zellen nach Entfernung der extrazellulären Ca^{2+} Ionen durch Zugabe des Ca^{2+} Chelators EGTA (nach 400 Sekunden).

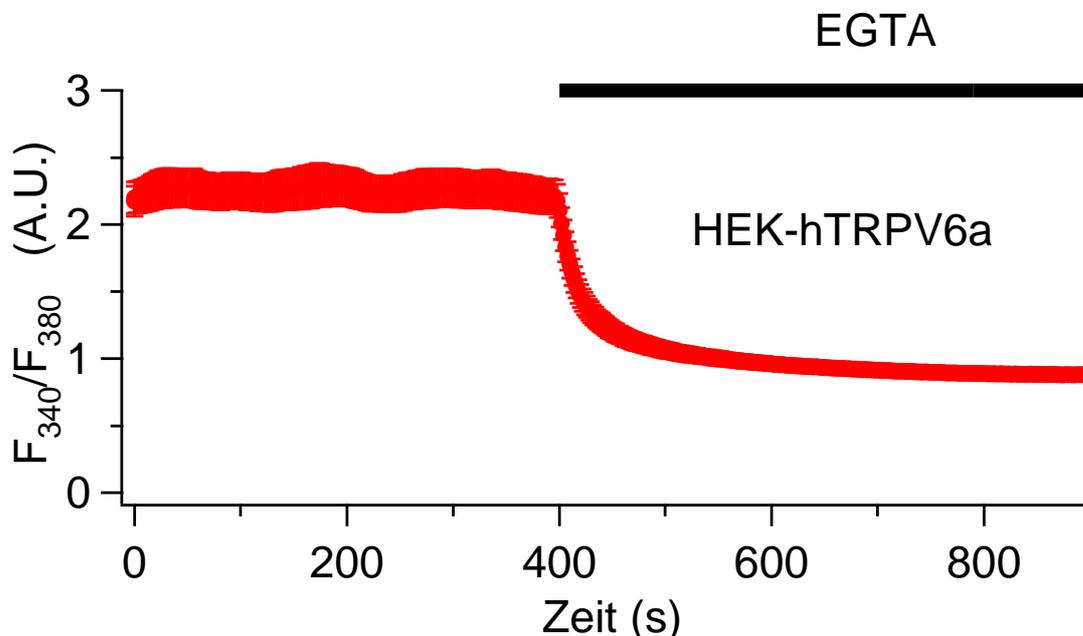


Abb. 8: Ca^{2+} Messungen an hTRPV6a exprimierenden HEK-Zellen

Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzverhältnis (F_{340}/F_{380}) gegen die Zeit in Sekunden (s) auf der x-Achse aufgetragen. Dieses Fluoreszenzverhältnis stellt ein Maß für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dar. Die Messung beginnt beim Zeitpunkt $t = 0$. Die Messkammer enthält 300 μl der Ca^{2+} haltigen Ringerlösung (2 mM Ca^{2+}). 400 Sekunden nach Messbeginn werden 900 μl einer EGTA-haltigen Lösung (1 mM) der Badlösung zugegeben. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 21$).

Eine Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration bewirkt auch bei der b-Variante eine Abnahme des Fluoreszenzverhältnisses (Abb. 9). Somit scheint Ca^{2+} sowohl in die TRPV6a als auch in die TRPV6b exprimierenden HEK-Zellen unter diesen Messbedingungen einzuströmen.

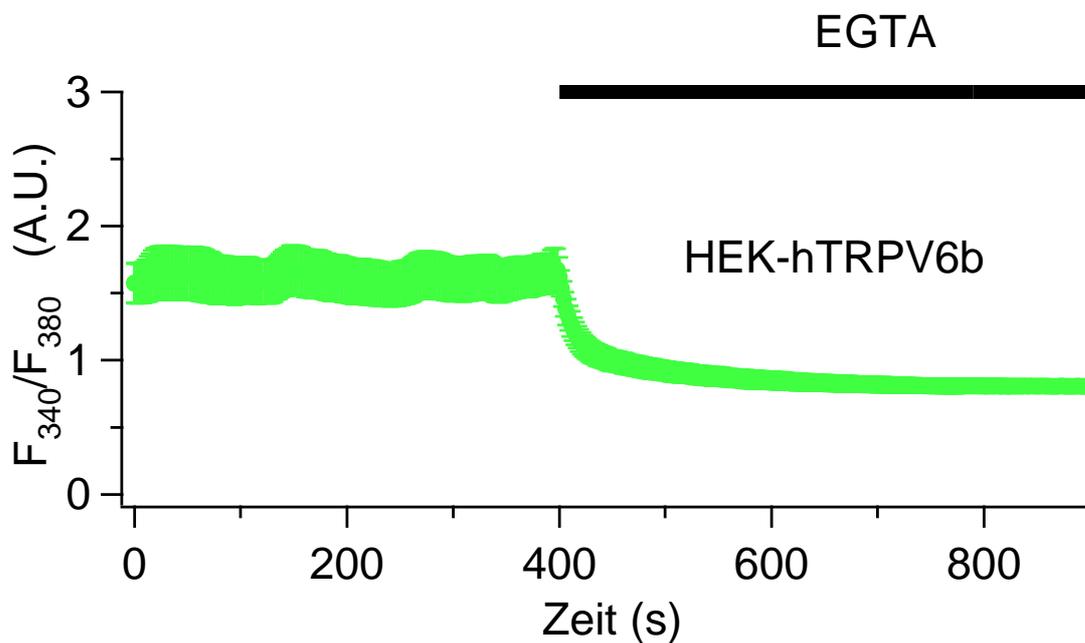


Abb. 9: Ca^{2+} Messungen an hTRPV6b exprimierenden HEK-Zellen

Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzverhältnis (F_{340}/F_{380}) gegen die Zeit in Sekunden (s) auf der x-Achse aufgetragen. Dieses Fluoreszenzverhältnis stellt ein Maß für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dar. Die Messung beginnt beim Zeitpunkt $t = 0$. Die Messkammer enthält 300 μl der Ca^{2+} haltigen Ringerlösung (2 mM Ca^{2+}). 400 Sekunden nach Messbeginn werden 900 μl einer EGTA-haltigen Lösung (1 mM) der Badlösung zugegeben. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 26$).

Als negative Kontrolle wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in nicht transfizierten HEK-Zellen untersucht (Abb. 10). Mit einem polyklonalen Antikörper konnte in HEK Wildtyp Zellen kein TRPV6 Protein nachgewiesen werden (Bödding et al., 2003; Hirnet et al., 2003). Dementsprechend war das Fluoreszenzverhältnis zu Beginn der Messung niedriger als in den Experimenten an den transfizierten HEK-Zellen. Der geringere basale Ca^{2+} Einstrom durch TRPV6 Kanäle könnte hierfür verantwortlich sein. Nach Chelatierung des extrazellulären Ca^{2+} zeigte sich eine geringfügige Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 10).

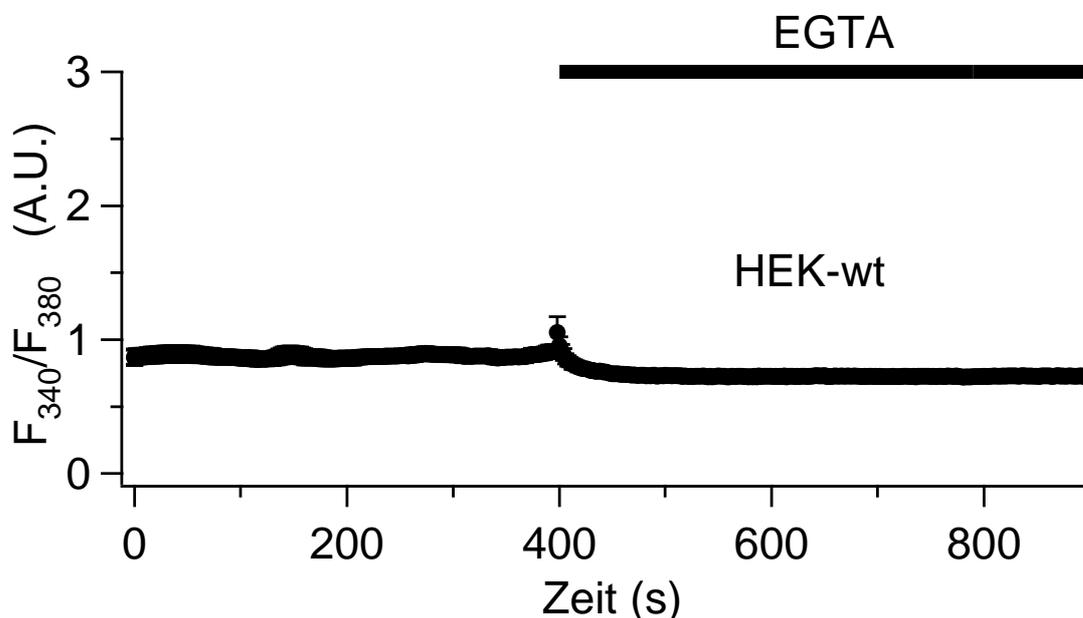


Abb. 10: Ca^{2+} Messungen an HEK Wildtyp Zellen

Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzverhältnis (F_{340}/F_{380}) gegen die Zeit in Sekunden (s) auf der x-Achse aufgetragen. Dieses Fluoreszenzverhältnis stellt ein Maß für die $[Ca^{2+}]_i$ dar. Die Messung beginnt beim Zeitpunkt $t = 0$. Die Messkammer enthält 300 μ l der Ca^{2+} haltigen Ringerlösung (2 mM Ca^{2+}). 400 Sekunden nach Messbeginn werden 900 μ l einer EGTA-haltigen Lösung (1 mM) der Badlösung zugegeben. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 17$).

Zusammenfassend sind in Abbildung 11 Experimente an der a- und b-Variante von TRPV6 sowie die Versuche an nicht-transfizierten HEK-Zellen dargestellt. Die transfizierten Zellen weisen ein deutlich höheres Ausgangsniveau des Fluoreszenzverhältnisses auf als nicht transfizierte Zellen. Bei den TRPV6a exprimierenden HEK-Zellen ist das Fluoreszenzverhältnis zu Beginn etwas höher als bei den TRPV6b exprimierenden HEK-Zellen, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Abb. 12). Bei allen Zellen ist nach Applikation von EGTA eine Abnahme des Fluoreszenzverhältnisses auf ein relativ einheitliches Niveau zu erkennen.

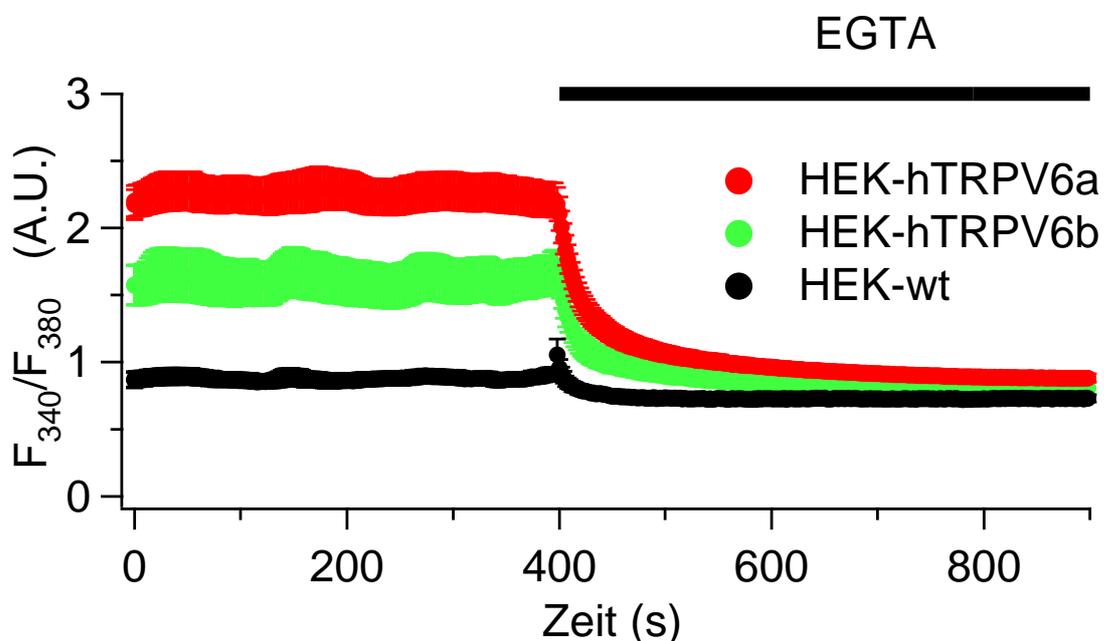


Abb. 11: Ca^{2+} Messungen an hTRPV6a und TRPV6b exprimierenden HEK-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen

Der Versuchsablauf ist identisch mit den vorangegangenen Experimenten (dargestellt in Abb. 8, 9, 10). Es handelt sich dabei um den Vergleich zwischen transfizierten HEK-Zellen mit TRPV6a/b ($n = 21/n = 26$) und nicht-transfizierten HEK Wildtyp Zellen ($n = 17$). Es sind Daten mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte abgebildet.

Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde in der An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} analysiert, indem die Fluoreszenzverhältnisse der transfizierten und nicht-transfizierten HEK-Zellen zu Beginn und am Ende der Messung bestimmt wurden (Abb. 12, 13). In den hTRPV6a und hTRPV6b exprimierenden HEK Zellen waren die Ausgangsniveaus statistisch signifikant höher als in den Wildtyp Zellen. Der Unterschied zwischen den hTRPV6a bzw. hTRPV6b exprimierenden HEK-Zellen war nicht signifikant.

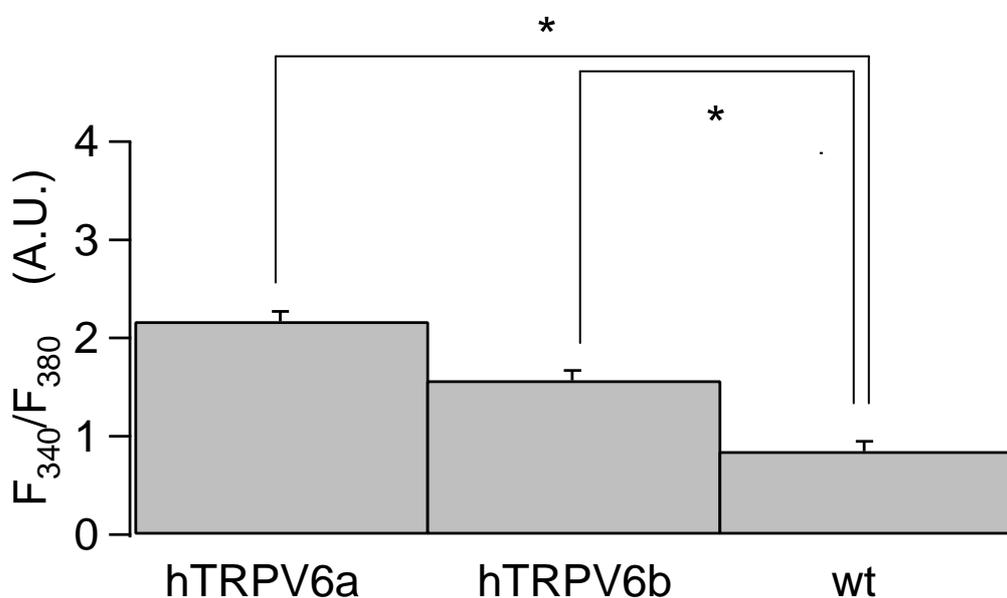


Abb. 12: Ausgangs-Fluoreszenzverhältnisse zu Beginn der Messung

Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzverhältnis (F_{340}/F_{380}) aufgetragen. Die drei Histogramme stellen jeweils die Durchschnittswerte der maximalen Fluoreszenzverhältnisse dar mit zugehöriger Standardabweichung. F_{340}/F_{380} ist aufgezeichnet zu Beginn der Messung zum Zeitpunkt gleich 0 s. Von links nach rechts sind hTRPV6a (Maximales Fluoreszenzverhältnis = 2.17 ± 0.01), hTRPV6b (Maximales Fluoreszenzverhältnis = 1.57 ± 0.01) und wt (Maximales Fluoreszenzverhältnis = 0.85 ± 0.01) abgebildet. Dabei ist jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den hTRPV6-transfizierten und den nicht-transfizierten HEK Wildtyp Zellen zu beobachten (* $p < 0.05$ vs. wt). Zwischen der a- und b-Variante besteht kein signifikanter Unterschied.

Die Untersuchung der Fluoreszenzverhältnisse in TRPV6 exprimierenden HEK-Zellen und nicht-transfizierten Zellen am Ende der Messung zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb.13). Aus diesen Daten ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in allen Zellen ähnlich war.

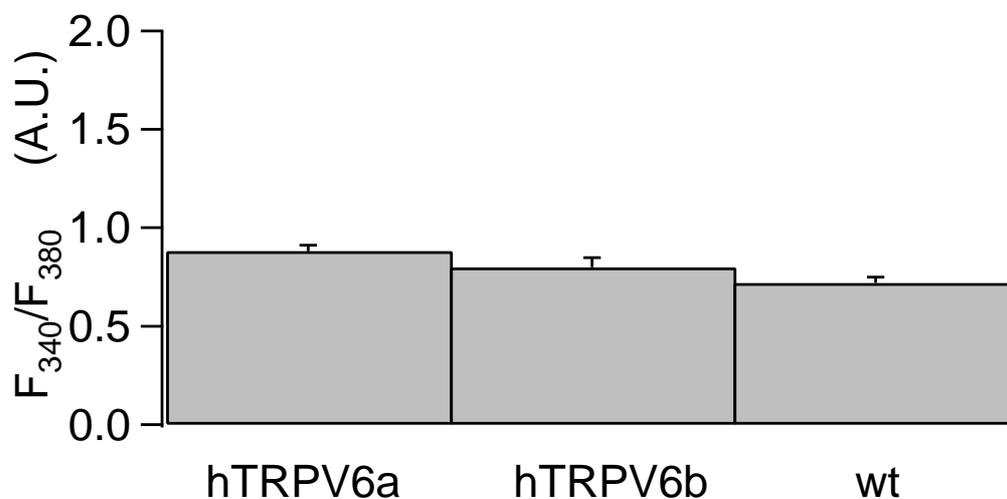


Abb. 13: Fluoreszenzverhältnisse in Ca^{2+} freier Badlösung zum Ende der Messung

Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzverhältnis (F_{340}/F_{380}) zum Ende der Messung (900 s) aufgetragen. Es ist hierbei kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Sowohl die transfizierten als auch die nicht-transfizierten HEK-Zellen befinden sich zum Ende der Messung auf einem sehr ähnlichen Fluoreszenzverhältnis.

4.2 Patch-Clamp Messungen

Die Kanalaktivität des TRPV6b Proteins ist abhängig von der Höhe der $[Ca^{2+}]_i$: Bei starker intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung strömt mehr Ca^{2+} in TRPV6b exprimierende HEK-Zellen als bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung (Nilius et al., 2001; Bödding, Wissenbach, Flockerzi 2002). Um festzustellen, ob die Stromdichte von TRPV6a von der intrazellulären Ca^{2+} Pufferung abhängt, wurden Strommessungen in der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp Technik mit unterschiedlichen intrazellulären EGTA Konzentrationen durchgeführt.

4.2.1 Untersuchungen bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung

Die Abbildung 14 zeigt den Verlauf des Einstroms der hTRPV6a exprimierenden HEK-Zellen bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung mit 10 mM EGTA. Zu Beginn der Messung kam es zu einer raschen Aktivierung eines Einwärtsstroms, gefolgt von einer langsamen und teilweisen Inaktivierung.

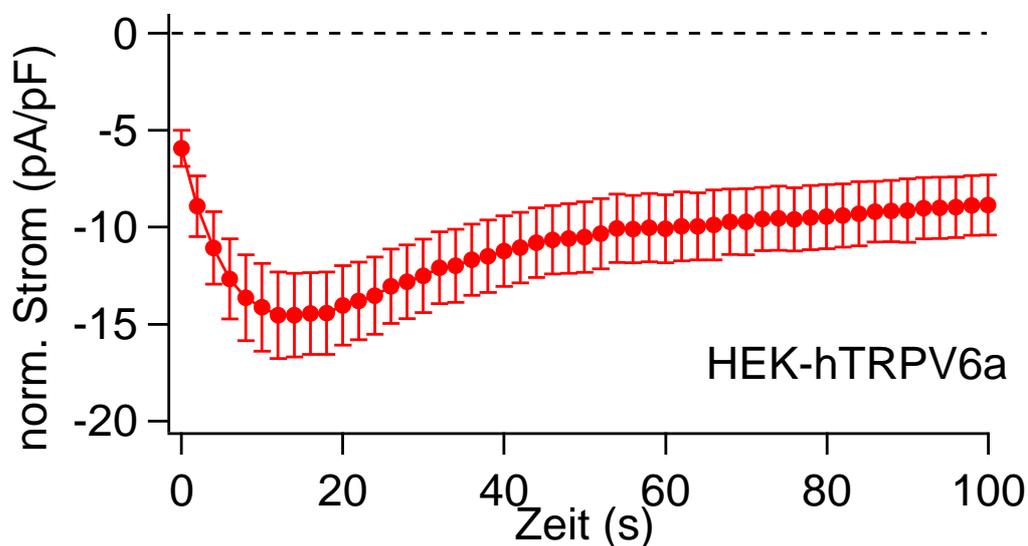


Abb. 14: Zeitabhängigkeit des Einwärtsstroms hTRPV6a exprimierender HEK-Zellen

Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA sowie eine Lösung mit 10 mM Ca^{2+} verwendet. Der bei -80 mV gemessene Einwärtsstrom wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert. Es sind Daten mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte abgebildet (n = 15).

Bei der b-Variante von hTRPV6 war bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung mit 10 mM EGTA ein ähnliches Aktivierungsverhalten wie bei der a-Variante feststellbar. Zu Beginn der Messung aktivierte ein Einwärtsstrom, erreichte nach etwa 15 Sekunden seine maximale Amplitude, die im weiteren Verlauf des Experimentes abnahm und dann konstant blieb (Abb. 16).

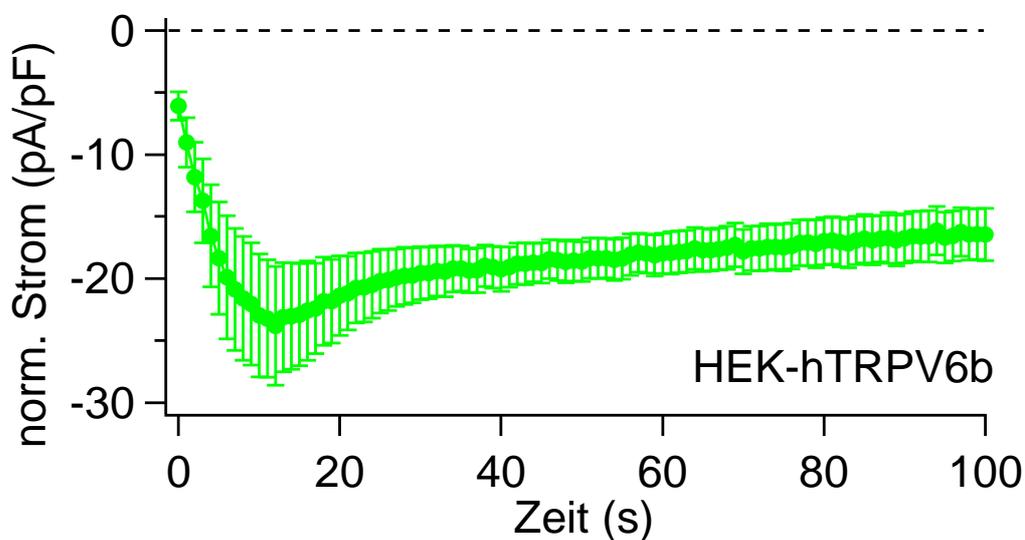


Abb. 15: Zeitabhängigkeit des Einwärtsstroms hTRPV6b exprimierender HEK-Zellen

Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA sowie eine Lösung mit 10 mM Ca^{2+} verwendet. Der bei -80 mV gemessene Einwärtsstrom wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert. Es sind Daten mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte abgebildet (n = 7).

Die statistische Auswertung der elektrophysiologischen Daten (Abb. 16) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den maximalen Stromdichten beider TRPV6 Varianten. Daher ist bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung von einer ähnlichen Aktivierung der Kanäle auszugehen.

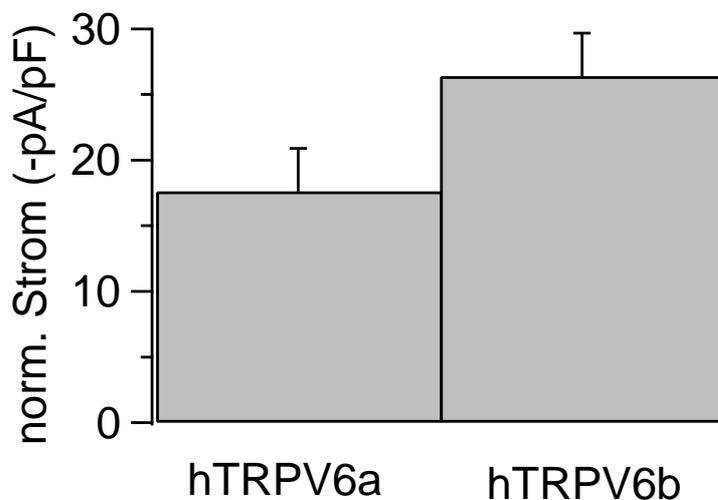


Abb. 16: Maximale Stromdichte während der Messung in Ganzzell-Konfiguration

Auf der y-Achse ist die maximale Stromdichte (normalisierter Strom) in $-\text{pA/pF}$ aufgetragen. Es handelte sich um Messungen an hTRPV6a- oder b-transfizierten HEK-Zellen in einer 10 mM-haltigen intrazellulären EGTA-Lösung in Ganzzell-Konfiguration, die bereits in Abb. 14 und 15 gezeigt wurden. Die Plasmamembran wurde bei einem Haltepotential -10 mV geklemmt. Die maximale Stromdichte betrug für hTRPV6a = -17.6 ± 3.3 pA/pF und für hTRPV6b = -26.4 ± 3.3 pA/pF. Es sind Durchschnittswerte mit jeweiliger Standardabweichung dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Stromdichten.

In der Abbildung 17 sind die Spannungsabhängigkeiten der TRPV6 vermittelten Ca^{2+} Ströme für die a- und b-Variante dargestellt. Nach Pufferung des intrazellulären Ca^{2+} mit 10 mM EGTA aktiviert der TRPV6 Kanal. Die Strom-Spannungskurven sind für beide TRPV6 Varianten ähnlich. Es handelt sich um einwärts rektifizierende Ströme, die positive Umkehrpotentiale (>30 mV) aufweisen. Aufgrund der positiven Umkehrpotentiale ist eine hohe Ca^{2+} Selektivität wahrscheinlich, die in extrazellulären Ionen-substitutionsexperimenten (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden konnte.

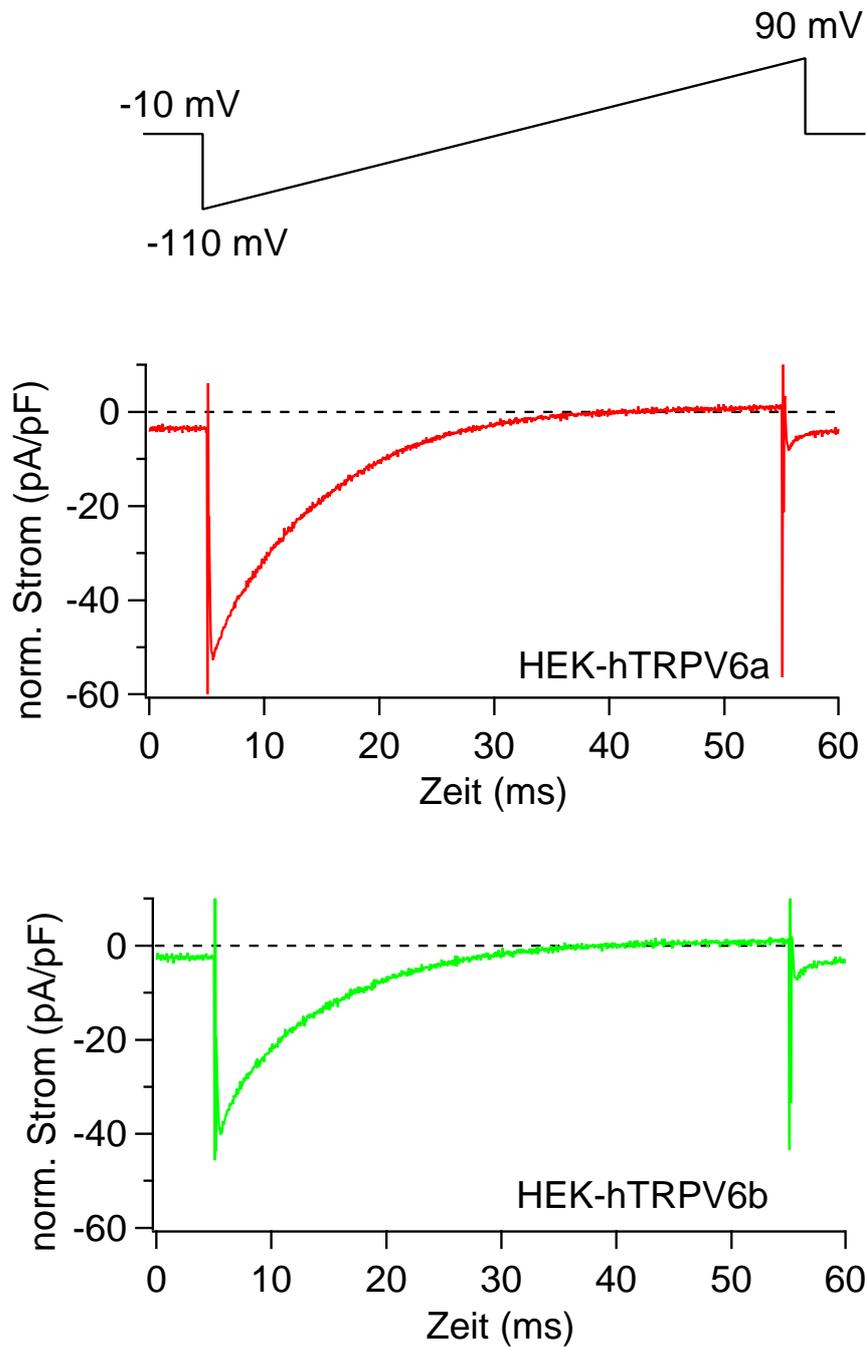


Abb. 17: Strom-Spannungskurven hTRPV6a bzw. hTRPV6b exprimierender HEK-Zellen

Dargestellt ist je eine repräsentative Messung in der Ganzzell-Konfiguration mit dem dazu gehörigen Spannungsprotokoll. Die Stromdichten wurden nach maximaler Aktivierung der Einwärtsströme gemessen. Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA verwendet. Bei der Badlösung handelte es sich um eine modifizierte Ringerlösung mit 10 mM Ca^{2+} . Die Stromdichte wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert.

4.2.2 Untersuchungen bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung

Um die Abhängigkeit der TRPV6 Kanäle von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Messungen bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung durchgeführt. In Abbildung 18 sind hTRPV6a exprimierende HEK-Zellen dargestellt. Es handelt sich hierbei um Experimente mit 0.1 mM EGTA in der intrazellulären Lösung. Im Gegensatz zu den Experimenten mit der 10 mM-haltigen EGTA Pipetten-Lösung aktiviert unter diesen Bedingungen kein Einwärtsstrom.

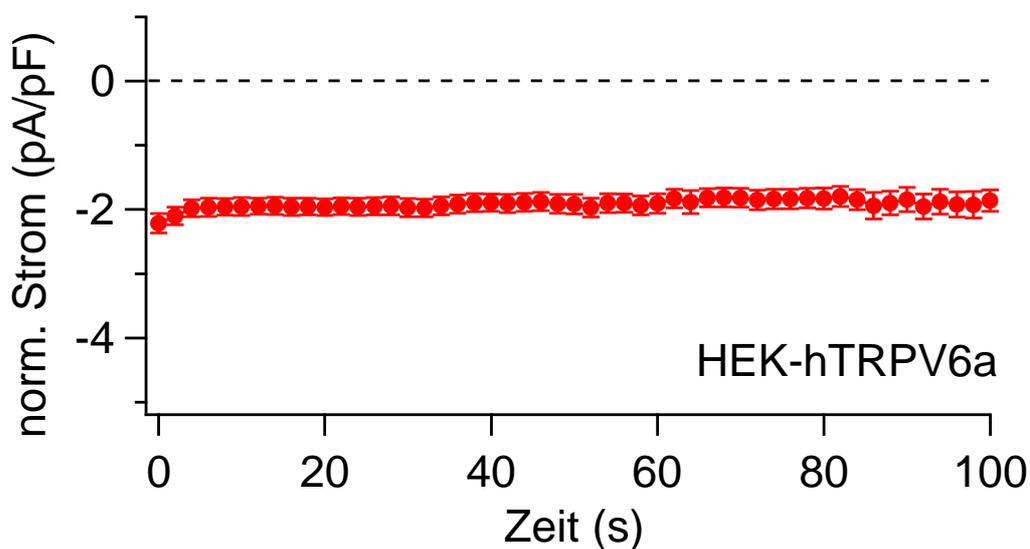


Abb. 18: Zeitabhängigkeit des Einwärtsstroms hTRPV6a exprimierender HEK-Zellen

Wie zuvor (Abb. 14 und 15) wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA verwendet. Die Ca^{2+} -Pufferung erfolgte durch 0.1 mM EGTA. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 25$).

Wie die hTRPV6a exprimierenden HEK-Zellen zeigten die mit der hTRPV6b cDNA transfizierten Zellen bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung keine Aktivierung eines Einwärtsstroms. Somit ist davon auszugehen, dass der Aktivierungsmechanismus beider TRPV6 Varianten von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängig ist.

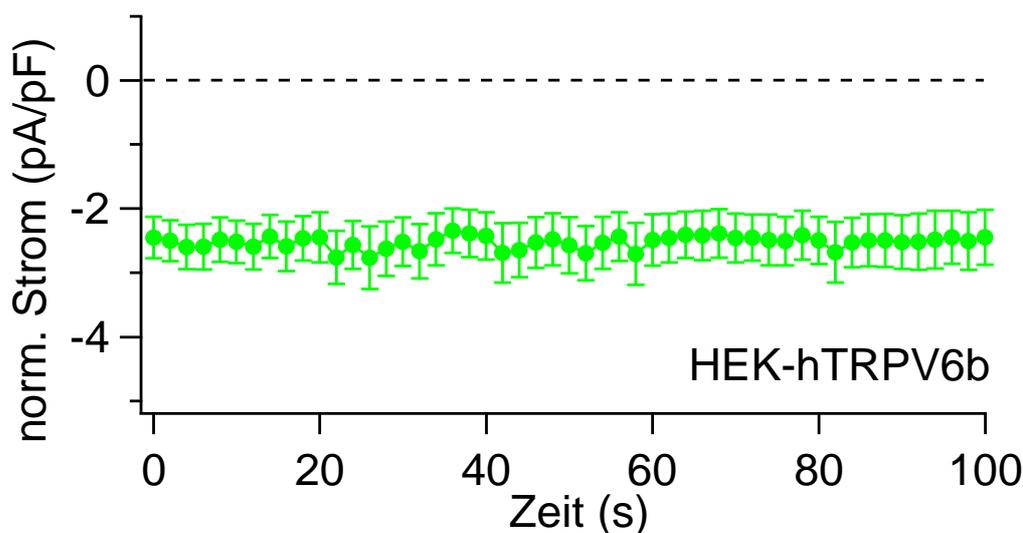


Abb. 19: Zeitabhängigkeit des Einwärtsstroms hTRPV6b exprimierender HEK-Zellen

Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 0.1 mM EGTA sowie eine extrazelluläre modifizierte Ringerlösung mit 10 mM Ca^{2+} verwendet. Auf der x-Achse wurde die Zeit in Sekunden (s) aufgetragen. Es handelte sich um Messungen in der Ganzzell-Konfiguration mit dem dazu gehörigen Spannungsprotokoll. Es sind Daten mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt (n= 7).

Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK-Zellen untersucht. Es wurden die gleichen intrazellulären Lösungen mit 0.1 bzw. 10 mM EGTA verwendet, wie in den Experimenten an transfizierten Zellen. In der Abbildung 20 sind die Stromdichten im zeitlichen Verlauf dargestellt. Während der Messdauer von 200 Sekunden blieb die Amplitude der Einwärtsströme relativ konstant.

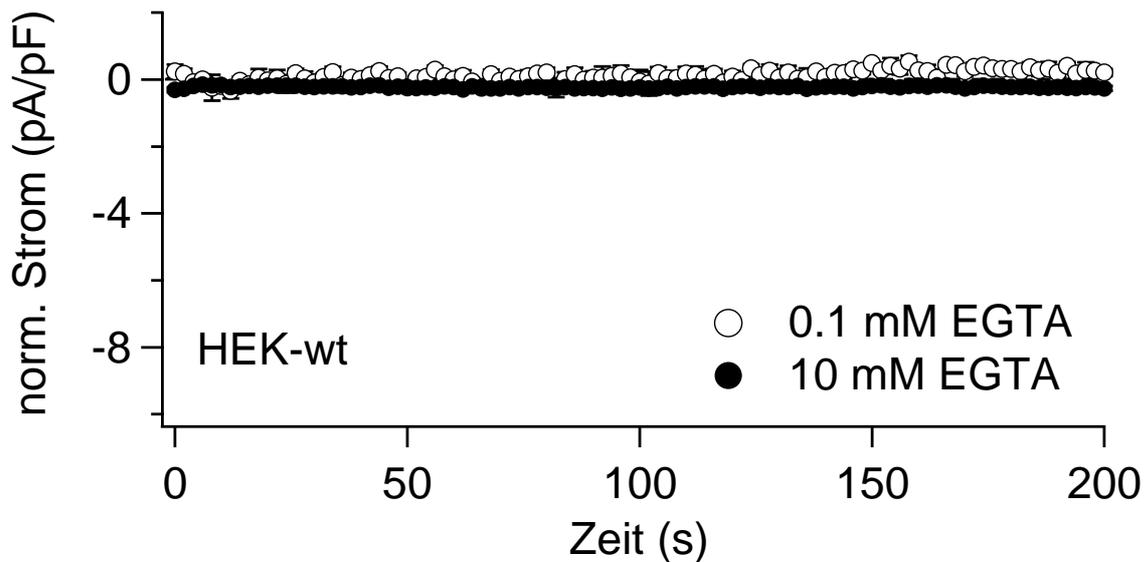


Abb. 20: Zeitabhängigkeit des Einwärtsstroms nicht-transfizierter HEK-Zellen

Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA verwendet. Die Ca^{2+} Pufferung erfolgte durch 0.1 mM und 10 mM EGTA. Der Einwärtsstrom wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 7$; $n = 7$).

Abschließend zu dieser Versuchsreihe wurden im Balkendiagramm (Abb. 21) die Stromdichten der transfizierten und nicht-transfizierten HEK-Zellen verglichen, die unmittelbar nach Herstellung der Ganzzell-Konfiguration aufgezeichnet wurden. Bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung (0.1 mM EGTA) ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass unter diesen Messbedingungen TRPV6 nicht konstitutiv aktiv ist.

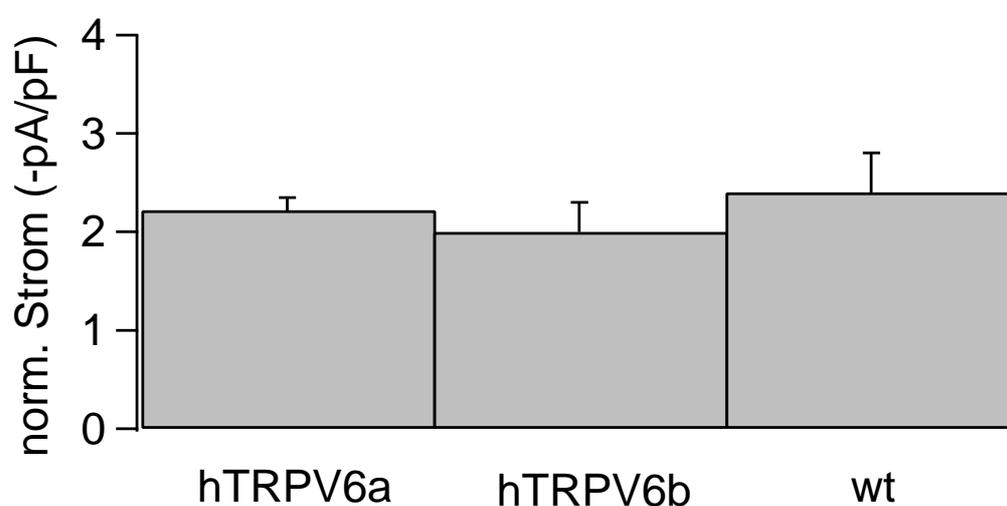


Abb. 21: Stromdichte unmittelbar nach Herstellung der Ganzzell-Konfiguration

Der Einwärtsstrom bei -80 mV wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert (-pA/pF). Es handelte sich um Messungen an hTRPV6a- oder b-transfizierten HEK-Zellen und HEK Wildtyp Zellen in einer 0.1 mM-haltigen intrazellulären EGTA-Lösung in Ganzzell-Konfiguration. Das Haltepotential war -10 mV. Die Stromdichten betragen für hTRPV6a = -2.22 ± 0.15 pA/pF, für hTRPV6b = -2 ± 0.3 pA/pF und für Wildtyp = -2.4 ± 0.4 pA/pF. Es sind Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung dargestellt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Stromdichten.

4.2.3 Spannungsabhängigkeit des TRPV6 Proteins

Wie oben beschrieben, korreliert die Kanalaktivität des TRPV6 Proteins mit der intrazellulären Konzentration des Chelators EGTA und ist auf Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zurückzuführen (Abb.15/16; Bödding et al., 2002). Bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ öffnet TRPV6, so dass Ca^{2+} in die Zelle strömt. Die berechnete zytosolische freie Ca^{2+} Konzentration, die zur Aktivierung von TRPV6 unterschritten werden muss, liegt unterhalb der physiologisch vorkommenden Werte. Das bedeutet aber nicht zwingend, dass die TRPV6 Pore unter *in vivo* Bedingungen immer geschlossen ist. Vielmehr könnten lokale Ca^{2+} Gradienten im Zytosol TRPV6 exprimierender Zellen zu einer abgestuften Aktivierung des Kanals führen. Neben der intrazellulären Ca^{2+} Pufferung beeinflusst auch das Membranpotential TRPV6 Kanäle (Bödding 2005).

Um die Aktivität von TRPV6a im Vergleich zu TRPV6b zu analysieren, wurde das Haltepotential zwischen den repetitiv applizierten Spannungsrampen geändert (Abb. 22). Der TRPV6 vermittelte Einwärtsstrom wurde wie in den Experimenten zuvor bei -80 mV gemessen und auf die Membrankapazität normalisiert. Bei starker intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung mit 10 mM EGTA aktiviert der typische TRPV6 vermittelte, einwärts rektifizierende Ca^{2+} Strom. Erhöht man nun das Haltepotential von -10 mV auf +50 mV, dann misst man eine Zunahme der Stromdichte (Abb. 22). Bei Repolarisation von +50 mV auf -10 mV nimmt die Stromdichte wieder ab, bis ein Gleichgewicht erreicht wird, das dem Ausgangszustand ähnelt.

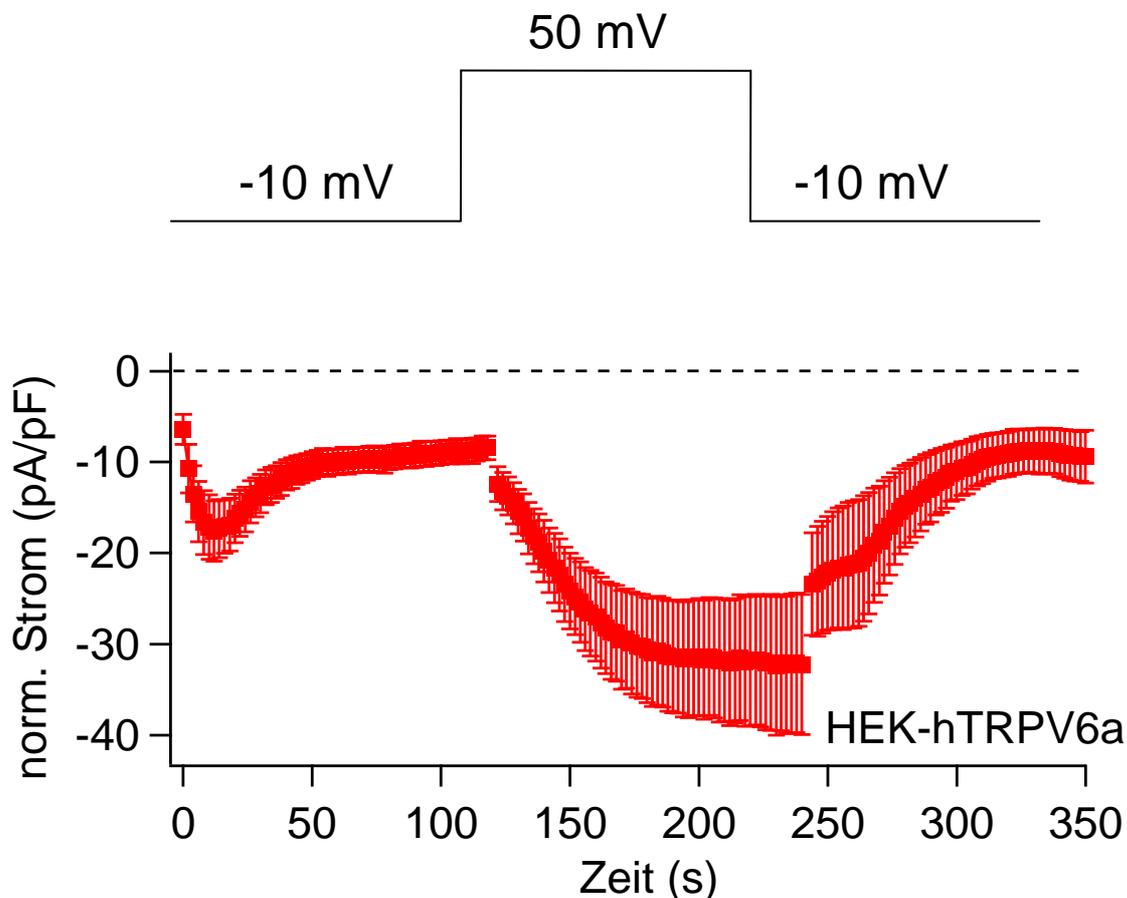


Abb. 22: Veränderungen der Stromdichte bei zwei unterschiedlichen Spannungsschritten in TRPV6a exprimierenden HEK-Zellen bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung

Es wurde eine Caesium-Glutamat-haltige intrazelluläre Lösung mit 10 mM EGTA sowie eine extrazelluläre modifizierte Ringerlösung mit 10 mM Ca^{2+} verwendet. Das Haltepotential wird stufenförmig wie oben abgebildet verändert. Es sind Daten mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte (s.e.m.) dargestellt (n= 8).

Wenn hTRPV6a exprimierende HEK-Zellen bei moderater Ca^{2+} Pufferung mit 0.1 mM EGTA vermessen wurden, war ein Einwärtsstrom von konstanter und geringer Amplitude in den ersten beiden Minuten messbar (-2.22 ± 0.15 pA/pF). Im Vergleich zu den Messungen an nicht transfizierten HEK-Zellen (-2.4 ± 0.4 pA/pF) war kein Unterschied bezüglich der Stromamplitude und Stromspannungskurve festzustellen (Abb. 23).

Durch Veränderung des Haltepotentials von -10 mV auf +50 mV beobachtet man eine exponentielle Zunahme des Einwärtsstroms auf etwa -9.4 pA/pF (Abb. 23). Die Spannungsabhängigkeit des unter depolarisierenden Bedingungen gemessenen

Stroms ist aufgrund seiner Einwärtsrektifizierung und seines positiven Umkehrpotentials für den Ca^{2+} Kanal TRPV6 typisch. Nach Repolarisation auf das Ausgangshaltepotential von -10 mV nimmt die Stromdichte etwa den ursprünglichen Wert an.

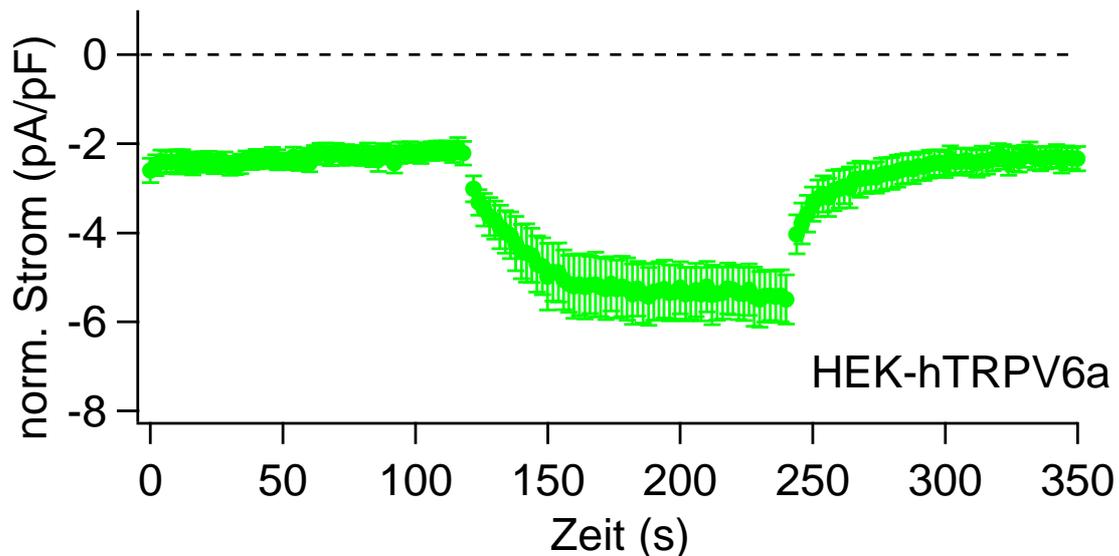


Abb. 23 Veränderungen der Stromdichte bei zwei unterschiedlichen Haltepotentialen in TRPV6a exprimierenden HEK-Zellen mit niedriger intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung

Der Einwärtsstrom bei -80 mV wurde auf die Zellmembrankapazität normalisiert ($-\text{pA/pF}$). Es erfolgte eine stufenweise Veränderung des Haltepotentials wie in Abbildung 22. Es sind Durchschnittswerte mit beidseitiger Standardabweichung der Mittelwerte dargestellt ($n = 8$).

Somit war es möglich, TRPV6a Kanäle bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung durch moderate Änderungen des Membranpotentials zu aktivieren. Eine ganz ähnliche Spannungsabhängigkeit konnte für die b-Variante von TRPV6 nachgewiesen werden (Bödding 2005). Nicht-transfizierte HEK-Zellen vom Wildtyp wiesen kein entsprechendes spannungsabhängiges Verhalten auf (Bödding M., 2005). Somit ist es möglich, den hTRPV6a vermittelten Ca^{2+} Einstrom durch moderate Depolarisation bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung hervorzurufen.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig der TRPV6a Kanal mittels zytosolischer Ca^{2+} Messungen und elektrophysiologischer Versuche funktionell charakterisiert und mit den bereits bekannten Eigenschaften des TRPV6b Kanals verglichen.

In den optischen Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen hTRPV6a und hTRPV6b exprimierenden HEK-Zellen festgestellt. Sie zeigten im Gegensatz zu nicht-transfizierten HEK Wildtyp Zellen eine deutliche Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wenn die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration durch die Verwendung des Ca^{2+} Chelators EGTA herabgesetzt wurde. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass das hTRPV6a Protein ein Ca^{2+} permeabler Kanal ist.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an hTRPV6a und hTRPV6b exprimierenden HEK-Zellen bestätigten diese Hypothese. In hTRPV6a exprimierenden HEK-Zellen wird ein Ca^{2+} -Einstrom bei starker intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung (10 mM EGTA) aktiviert, während kein Strom bei schwacher intrazellulärer Ca^{2+} Pufferung (0.1 mM EGTA) gemessen wurde. Unterschiede in dem Aktivierungsverhalten beider TRPV6 Varianten waren nicht feststellbar.

Die Ca^{2+} Ströme in hTRPV6a exprimierenden HEK-Zellen waren wie die Ca^{2+} Ströme in hTRPV6b transfizierten Zellen von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängig. Je niedriger die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war, desto größere Stromamplituden wurden aufgezeichnet. Bei der Regulation des Ca^{2+} Einstroms spielte auch die Höhe des Membranpotentials eine wichtige Rolle. Eine Hyperpolarisation des Membranpotentials erhöht die treibende Kraft für Ca^{2+} . TRPV6 und andere Ca^{2+} Kanäle weisen eine Ca^{2+} induzierte Inaktivierung auf, so dass ein ungehemmter Ca^{2+} Einstrom verhindert wird. Möglicherweise werden dadurch zelltoxische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermieden (Peng et al., 1999; Wissenbach et al., 2001; Hoenderop et al., 2001; Bödding 2005).

TRPV6 bindet Calmodulin in einer Ca^{2+} abhängigen Art und Weise, was zu einer negativen Regulation der Kanalaktivität führt (Niemeyer et al., 2001). Ist dieser Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Inaktivierungsmechanismus für die Ca^{2+} bzw. Spannungsabhängigkeit von TRPV6 verantwortlich? Das scheint nicht der Fall zu sein, wie Experimente an einer Deletionsmutante zeigten. Trotz der fehlenden Ca^{2+} abhängigen Calmodulin Bindung blieb die Ca^{2+} und Spannungsabhängigkeit in Zellen erhalten, die mit der cDNA dieser Deletionsmutante transfiziert wurden (Bödding, Flockerzi 2004; Bödding 2005).

Könnten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ca^{2+} und negativ geladenen Aminosäureresten die Ca^{2+} und Spannungsabhängigkeit von TRPV6 erklären? Ca^{2+} könnte aufgrund seiner positiven Ladung bei negativem Membranpotential die Pore blockieren und dieser Ca^{2+} Block ließe sich durch Depolarisation aufheben. Als mögliche Ca^{2+} Bindungsstelle in der putativen Porenregion kommen negativ geladene Aminosäurereste in Frage. Es wäre möglich, dass Anziehungs- und Abstoßungsreaktionen zwischen Ca^{2+} und negativ geladenen Aminosäureresten an der Regulation von TRPV6 beteiligt sind (Voets et al., 2003; Bödding 2005).

Intrazelluläres Mg^{2+} blockiert sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} den TRPV6 Kanal (Vennekens 2002). Der charakteristische spannungsabhängige Einwärtsstrom unter divalentfreien Bedingungen ist abhängig von der spannungsabhängigen Bindung intrazellulärer Magnesiumionen in den Kanalporen (Vennekens 2002). Die Neutralisation eines einzelnen negativ geladenen Aspartatrests (D542A) in der Porenregion ruft eine Aufhebung der durch Mg^{2+} hervorgerufenen Hemmung des Kanals hervor (Voets et al., 2003). Dieser Aspartatrest ist auch entscheidend für die Ca^{2+} Selektivität des TRPV6 Kanals (Voets et al., 2003).

Beim Menschen gibt es aufgrund eines gekoppelten Polymorphismus zwei TRPV6 Allele, TRPV6a und TRPV6b, die sich in fünf Basen unterscheiden (Wissenbach et al., 2001). Von diesen fünf Basenaustauschen führen drei zu Änderungen der Aminosäuresequenz (TRPV6a: Argininrest in Position 157, Valin 378 und Threonin 681; TRPV6b: Cysteinrest in Position 157, Methionin 378 und Methionin 681). Erste Genotypisierungen ergaben, dass die meisten Menschen homozygot für die b-Variante sind (bb), nur wenige heterozygote Träger vorkommen (ab), und keiner nur die a-Variante aufweist (Wissenbach et al., 2001). Akey et al. zeigten, dass TRPV6b bei Europäern und TRPV6a bei der afrikanischen Bevölkerung bevorzugt gefunden werden kann. Sie gehen davon aus, dass der Polymorphismus einen Selektionsvorteil verleiht, der eine mögliche Rolle in der diätetischen Ca^{2+} Absorption oder T-Zell vermittelten Immunabwehr einnimmt, welcher während der menschlichen Evolution variiert (Akey et al., 2006).

Besteht eine Beziehung zwischen der Expression von TRPV6a bzw. TRPV6b und der Inzidenz an einem Prostatakarzinom zu erkranken? Da Inzidenz und Mortalität dieses Tumors bei Afroamerikanern im Vergleich zu Amerikanern und besonders

Asiaten erhöht sind, ist ein Zusammenhang denkbar (Brawley et al., 1998). Genetische Faktoren spielen hierbei neben sozioökonomischen Bedingungen eine entscheidende Rolle (Shavers und Brown, 2002).

Die Feststellung, dass TRPV6 im fortgeschrittenem Prostatakarzinom exprimiert wird, könnte zu diagnostischen Zwecken genutzt werden, um so das weitere therapeutische Vorgehen zu optimieren (Wissenbach et al., 2001). Substanzen, die an TRPV6 angreifen, könnten zu neuen und viel versprechenden Therapieansätzen zur Behandlung des Prostatakarzinoms beitragen. Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von TRPV6a und dem Fortschreiten der Erkrankung muss in Zukunft untersucht werden.

Besitzt die zusätzliche PKC Phosphorylierungsstelle des TRPV6a Kanals, die nicht im TRPV6b Protein vorkommt, eine physiologische Relevanz? TRPV6a und TRPV6b weisen trotz ihrer strukturellen Unterschiede sehr ähnliche biophysikalische Eigenschaften auf. In wieweit durch Phosphorylierung des TRPV6a Kanals seine Funktion im Vergleich zu TRPV6b beeinflusst wird, sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Dabei könnten elektrophysiologische Experimente mit Aktivatoren bzw. Inhibitoren der PKC zu einer Beantwortung dieser Frage beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Akey JM, Swanson WJ, Madeoy J, Eberle M, Shriver MD., TRPV6 exhibits unusual patterns of polymorphism and divergence in worldwide populations. *Hum Mol Genet.* 2006 Jul 1; 15 (13): 2106-13.
2. Barritt GJ., Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signalling requirements. *Biochem J.* 1999 Jan 15; 337 (Pt 2): 153-69.
3. Berridge MJ., Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 1984 Jun 1; 220 (2): 345-60.
4. Berridge MJ, Irvine RF., Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984 Nov 22-28; 312 (5992): 315-21.
5. Berridge MJ., Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 1993 Jan 28; 361 (6410): 315-25.
6. Berridge MJ., Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* 1993 Sep 30; 365 (6445): 388-9.
7. Berridge MJ., Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Sep 7; 766: 31-43.
8. Berridge MJ., Capacitative calcium entry. *Biochem J.* 1995 Nov 15; 312 (Pt 1): 1-11.
9. Berridge MJ., Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* 1997 Mar 1; 499 (Pt 2): 291-306.
10. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P., Calcium-a life and death signal. *Nature.* 1998 Oct 15; 395 (6703): 645-8.
11. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD., Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science.* 2000 Mar 3; 287 (5458): 1604-5.
12. Bodding M, Wissenbach U, Flockerzi V., The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca^{2+} sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27; 277 (39): 36656-64.
13. Bodding M., Voltage-dependent changes of TRPV6-mediated Ca^{2+} currents. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25; 280 (8): 7022-9.

14. Bodding M., TRP proteins and cancer.
Cell Signal. 2006 Sep 3;
15. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P., Calcium signalling- an overview.
Semin Cell Dev Biol. 2001 Feb; 12 (1): 3-10.
16. Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ., The organisation and functions of local Ca²⁺ signals.
J Cell Sci. 2001 Jun; 114 (Pt 12): 2213-22.
17. Brawley OW, Knopf K, Thompson I., The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. Semin Urol Oncol. 1998 Nov; 16 (4): 193-201.
18. Cai X, Molecular evolution and structural analysis of the Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel subunit, Orai.
J Mol Biol 2007 May 18, 368 (5): 1284-91
19. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.
Nature. 1997 Oct 23; 389 (6653): 816-24.
20. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D., Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.
Science. 2000 Apr 14; 288 (5464): 306-13.
21. Clapham DE., Calcium signaling.
Cell. 1995 Jan 27; 80 (2): 259-68.
22. Clapham DE., Intracellular calcium. Replenishing the stores.
Nature. 1995 Jun 22; 375 (6533): 634-5.
23. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C., The TRP ion channel family.
Nat Rev Neurosci. 2001 Jun; 2 (6): 387-96.
24. Cohen NM, Lederer WJ., Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development.
J Physiol. 1988 Dec; 406: 115-46.

25. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW., Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis.
Cancer Res. 1998 Apr 1; 58 (7): 1515-20.
26. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCarthy JJ., Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma.
J Clin Oncol. 2001 Jan 15; 19 (2): 568-76.
27. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T., Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels?
Trends Pharmacol Sci. 1994 Mar; 15 (3): 77-83.
28. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A., A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature. 2006 May 11; 441 (7090): 179-85.
29. Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT., The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin.
Cancer Res. 1994 Dec 1; 54(23): 6167-75.
30. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY., A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.
J Biol Chem. 1985 Mar 25; 260 (6): 3440-50.
31. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflugers Arch. 1981 Aug; 391 (2): 85-100.
32. Hamill OP, Sakmann B., Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells.
Nature. 1981 Dec 3; 294 (5840): 462-4.
33. Hardie RC, Minke B., Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization.
Trends Neurosci. 1993 Sep; 16 (9): 371-6.

34. Hardie RC, Minke B., Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and trp. *Cell Calcium*. 1995 Oct; 18 (4): 256-74.
35. Hardie RC, Raghu P, Moore S, Juusola M, Baines RA, Sweeney ST., Calcium influx via TRP channels is required to maintain PIP_2 levels in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. 2001 Apr; 30 (1): 149-59.
36. Hardie RC., Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65: 735-59.
37. Hardie RC., TRP channels in *Drosophila* photoreceptors: the lipid connection. *Cell Calcium*. 2003 May-Jun; 33 (5-6): 385-93
38. Harteneck C, Plant TD, Schultz G., From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*. 2000 Apr; 23 (4): 159-66.
39. Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bodding M, Nastainczyk W, Wissenbach U, Flockerzi V, Freichel M., The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium*. 2003 May- Jun; 33 (5-6): 509-18.
40. Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ., The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 2; 261 (2): 488-92.
41. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V., Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annu Rev Neurosci*. 1994; 17: 399-418.
42. Horn R, Marty A., Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*. 1988 Aug; 92 (2): 145-59.
43. Hoth M, Penner R., Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 1992 Jan 23; 355 (6358): 353-6.
44. Lewis RS, Cahalan MD., Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Regul*. 1989 Nov; 1 (1): 99-112.

45. Lewis RS, Ross PE, Cahalan MD., Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes.
J Gen Physiol. 1993 Jun; 101 (6): 801-26.
46. Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K., Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels.
J Biol Chem. 2000 Sep 8; 275 (36): 27799-805.
47. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D., Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.
Nature. 2002 Mar 7; 416 (6876): 52-8.
48. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G., Rescue of the Drosophila phototransduction mutation trp by germline transformation.
Science. 1985 Nov 29; 230 (4729): 1040-3.
49. Montell C., Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels.
Sci STKE. 2001 Jul 10; 2001 (90)
50. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V., The TRP channels, a remarkably functional family.
Cell. 2002 Mar 8; 108 (5): 595-8.
51. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX., A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.
Mol Cell. 2002 Feb; 9 (2): 229-31.
52. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurotaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A, LTRPC7 is a Mg ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability.
Nature. 2001 May 31; 411 (6837): 590-5.
53. Neher E, Sakmann B., Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature. 1976 Apr 29; 260 (5554): 799-802.

54. Neher E, Sakmann B., Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres.
J Physiol. 1976 Jul; 258 (3): 705-29
55. Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V, Trost C., Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13; 98 (6): 3600-5.
56. Nilius B, Prenen J, Vennekens R, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Modulation of the epithelial calcium channel, ECAC, by intracellular Ca²⁺.
Cell Calcium. 2001 Jun; 29 (6): 417-28.
57. Parekh AB, Penner R., Store depletion and calcium influx.
Physiol Rev. 1997 Oct; 77 (4): 901-30.
58. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A., A TRP channel that senses cold stimuli and menthol.
Cell. 2002 Mar 8; 108 (5): 705-15.
59. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM., ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology.
Nature. 2001 May 31; 411 (6837): 595-9.
60. Phillips AM, Bull A, Kelly LE., Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene.
Neuron. 1992 Apr; 8 (4): 631-42.
61. Pusch M, Neher E., Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette.
Pflugers Arch. 1988 Feb; 411 (2): 204-11.
62. Putney JW Jr., Recent hypotheses regarding the phosphatidylinositol effect.
Life Sci. 1981 Sep 21; 29 (12): 1183-94.
63. Putney JW Jr., Excitement about calcium signaling in inexcitable cells.
Science. 1993 Oct 29; 262 (5134): 676-8.

64. Putney JW Jr, Bird GS., The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells.
Endocr Rev. 1993 Oct; 14 (5): 610-31.
65. Putney JW Jr, Bird GS., The signal for capacitative calcium entry.
Cell. 1993 Oct 22; 75 (2): 199-201.
66. Reeh PW, Petho G., Nociceptor excitation by thermal sensitization-a hypothesis.
Prog Brain Res. 2000; 129: 39-50.
67. Runnels LW, Yue L, Clapham DE., TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities.
Science. 2001 Feb 9; 291 (5506): 1043-7.
68. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K, Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2.
Science. 2001 Aug 17; 293 (5533): 1327-30.
69. Sedgwick SG, Smerdon SJ., The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework.
Trends Biochem Sci. 1999 Aug; 24 (8): 311-6.
70. Shavers VL, Brown ML., Racial and ethnic disparities in the receipt of cancer treatment.
J Natl Cancer Inst. 2002 Mar 6; 94 (5): 334-57.
71. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB., The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1).
Br J Pharmacol. 2000 Jan; 129 (2): 227-30.
72. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE., TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain.
Neuron. 2001 Mar; 29 (3): 645-55.
73. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R., Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins.
Cancer Res. 2001 May 1; 61 (9): 3760-9.

74. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA., Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels.
Trends Pharmacol Sci. 1991 Sep; 12(9): 349-54.
75. Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A., Reflections on Ca^{2+} channel diversity, 1988-1994.
Trends Neurosci. 1995 Feb; 18 (2): 52-4.
76. Vig M, Beck A, Billingsley JM, Lis A, Parvez S, Peinelt C, Koomoa DL, Soboloff J, Gill DL, Fleig A, Kinet JP, Penner R., CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel.
Curr Biol. 2006 Oct 24; 16 (20): 2073-9.
77. Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R, Nilius B., CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties.
J Biol Chem. 2001 Dec 21; 276 (51): 47767-70.
78. Waldron RT, Short AD, Meadows JJ, Ghosh TK, Gill DL., Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth.
J Biol Chem. 1994 Apr 22; 269(16): 11927-33.
79. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V., Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer.
J Biol Chem. 2001 Jun 1; 276 (22): 19461-8. Epub 2001 Feb 2.
80. Wissenbach U, Niemeyer BA, TRPV6.
Handb Exp Pharmacol. 2007; (179): 221-34.
81. Wu X, Babnigg G, Villereal ML., Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca^{2+} entry in HEK-293 cells.
Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Mar; 278 (3): C526-36.
82. Xu XZ, Li HS, Guggino WB, Montell C., Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance.
Cell. 1997 Jun 27; 89 (7): 1155-64.
83. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW., Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels.
Nature. 1994 Nov 3; 372 (6501): 97-100.

84. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L., trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry.
Cell. 1996 May 31; 85 (5): 661-71.
85. Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Luckhoff A, Schultz G., Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} permeable cation channel activated by calcium store depletion.
Neuron. 1996 Jun; 16 (6): 1189-96.
86. Zweifach A, Lewis RS, Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion intracellular Ca^{2+} stores.
Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Jul 1, 90 (13): 6295-9.

7. Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Privat-Dozent Dr. Dr. Matthias Bödding für die ausgezeichnete wissenschaftliche und persönliche Betreuung sowie die Überlassung des Themas danken. Bei auftretenden Problemen war er stets Ansprechpartner.

Herrn Professor Dr. Veit Flockerzi, Leiter des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie, möchte ich danken für die gestellte Aufgabe und die große wissenschaftliche und persönliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich dafür, dass sie mir bei Problemen mit ihrer theoretischen und praktischen Erfahrung hilfreich zur Seite standen.

Den meisten Dank aber schulde ich meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglicht und mich nach Kräften unterstützt haben.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Rezaeian
Vorname: Farid
Anschrift (Schweiz): Rue du Prieuré 15-17 , 1202 Genève
Nationalität: deutsch
E-Mail-Adresse: FaridRezaeian@gmx.de

Ausbildung

1998 Abitur am Friedrich Spee Gymnasium Trier
1998-2005 Medizinstudium an der Universität Homburg/Saar
2005 Abschlussprüfung (Gesamtnote: sehr gut) und
Approbation als Arzt
2005-2006 Assistenzarzt Chirurgische Abteilung Kreiskrankenhaus
St.Ingbert
2005-2006 Erlernung mikrochirurgischer Operationsverfahren und der
intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an Nagetieren am
Institut für Klinisch- & Experimentelle Chirurgie der
Universitätskliniken Homburg/Saar (Prof. M. D. Menger)
seit 05.2006 Wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für
Plastische und Rekonstruktive Chirurgie im Rahmen eines
Forschungsstipendiums des Schweizerischen National
Fonds (SNF) an den Universitätskliniken Genf (HUG),
Schweiz (Prof. B. Pittet; Forschungsgruppe Dr. med. Y.
Harder)

Publizierte Vorträge

Rezaeian F., Wettstein R., Amon M., Schramm R., Pittet B., Menger MD., Harder Y.
„Pretreatment with recombinant human Erythropoietin protects critically perfused flap tissue from chronic ischemia“

Brendel & Award Session - 42nd Annual Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Mai 2007, Rotterdam, NL

Rezaeian F., Wettstein R., Amon M., Schramm R., Pittet B., Menger MD., Harder Y.
„Pretreatment with recombinant human erythropoietin protects critically perfused flap tissue from chronic ischemia“

Association for Research in Surgery (ARS) - 94. Jahreskongress der Schweizerischen Gesellschaft für Chirurgie (SGC), Juni 2007, Lausanne, CH

Rezaeian F., Wettstein R., Sandmann F., Amon M., Pittet B., Menger M.D., Harder Y.

“Non-surgical alternatives to surgical delay: The role of recombinant human Erythropoietin in ischemic flap issue“

11th European Conference of Scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS),
September 2007, Aachen, D

Rezaeian F., Wettstein R., Sandmann F., Amon M., Pittet B., Menger M.D., Harder Y.

“Recombinant human erythropoietin and persistent ischemia: Long term pretreatment (preconditioning) vs. long term posttreatment“

11. Chirurgische Deutsche Forschungstage, November 2007, Saarbrücken, D

Auszeichnungen und Stipendien

Forschungsstipendium Schweizer National Fond (50000 CHF)

Forschungspreis Europäischer Wissenschaftspreis (Braun Scientific Award (1500€) for an outstanding scientific work characterized by clinical relevance and applicability in daily clinical routine”) verliehen von der European Society of Surgical Research

Referenzen

Dr. med. Yves Harder Abteilung für Plastische und Rekonstruktive Chirurgie
Universitätskliniken Genf (HUG)

Prof. Dr. M. D. Menger Institut für Klinisch- & Experimentelle Chirurgie
Universitätskliniken Homburg/Saar

Kenntnisse

Sprachen Englisch, Persisch, Französisch

EDV Microsoft Office, Windows 2000 und XP, SigmaPlot,
Sigmastat, Powerpoint, IGOR pro, Cap Image, Photoshop,
Excel

Genf, den 11.10.2007