

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Zn²⁺-Ionen hemmen die Genexpression nach Stimulation der Ca²⁺-Kanäle Ca_v1.2 und TRPM3

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2021

vorgelegt von
Louisa Loviscach
geboren am 05.02.1997 in San Diego

Tag des Kolloquiums: 29.03.2022

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Adolfo Cavalié

*(...) Er ist ja für keinen von uns in “unerreichbarer” Ferne.
Denn in ihm, “dessen Gegenwart alles durchdringt”,
leben wir, bestehen wir und sind wir (...)*

(NGÜ, Apg. 17, 27 f.)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	10
Summary	11
1. Einleitung	12
1.1 Die Rolle von Zink im menschlichen Körper	12
1.2 Spezifische Zinktransporter	14
1.3 Transkriptionsfaktor AP-1	15
1.4 Spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal	16
1.5 Stimulation der spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle mit KCl/FPL	17
1.6 TRPM3-Kanal	17
1.7 Fragestellung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	20
2.2 Chemikalien	21
2.3 Lösungen	23
2.4 Herstellung rekombinanter Lentiviren	26
2.4.1 Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$	26
2.4.2 Das Hüllprotein-kodierende Plasmid pCMV-G	26
2.4.3. Der AP-1-Sensor Coll.luc	27
2.5 Zelllinien	28
2.6 Zellkultur	29
2.7 Passagieren	29
2.8 Herstellung von Lentiviren für die Infektion eukaryontischer Zellen	30
2.8.1 Transfektion der 293T/17-Zellen mit Plasmiden	30
2.8.2 Isolierung des Überstandes und Infektion der Zielzellen	31
2.8.3 Serumreduktion	31
2.8.4 Stimulation	31
2.8.5 Reporteranalyse	32
2.9 Messung der Luciferaseaktivität	32
2.9.1 Ernten der Zellen	32
2.9.2 Aufschließen der Zellen	32
2.9.3 Luciferase-Assay	33

2.9.4	Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay.....	33
2.9.5	Die relative Luciferase-Aktivität.....	33
2.10	Toxizität von Zink	34
2.10.1	Proteinkonzentration.....	34
2.10.2	MTT-Assay	34
2.11	Statistik.....	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Induktion von AP-1 durch Stimulation von $Ca_v1.2$ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in Insulinoma Zellen.....	36
3.2	Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen auf die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Aktivierung des AP-1 in INS-1 832/13 Zellen	37
3.3	Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle ist essentiell für die Signaltransduktion durch die Stimulation des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $Ca_v1.2$	38
3.4	Die zelluläre Toxizität von Zn^{2+} -Konzentrationen auf INS-1 832/13 Insulinoma Zellen	39
3.5	Zn^{2+} inhibiert die $Ca_v1.2$ -induzierte Aktivierung von AP-1	40
3.6	Die Stimulation des Kationenkanals TRPM3 triggert die Aktivierung von AP-1	43
3.7	Die zelluläre Toxizität von Zn^{2+} -Konzentrationen auf T-REx-TRPM3 Zellen.....	44
3.8	Zn^{2+} -Ionen hemmen die Aktivierung von AP-1 nach der Stimulation von TRPM3-Kanälen.....	46
4.	Diskussion	48
4.1	Toxizität von Zn^{2+} -Ionen	48
4.2	Einstrom von Zn^{2+} -Ionen in die Zellen.....	49
4.3	Extrazelluläre Zn^{2+} -Ionen inhibieren intrazelluläre Signalkaskaden.....	49
4.4	Überlegungen zum mechanistischen Wirkprinzip der hemmenden Aktivität von Zn^{2+} -Ionen	49
4.5	Haben Zn^{2+} -Ionen eine Funktion in der negativen Rückkopplungsschleife bei Stimulus-induzierter Exozytose?.....	51
4.6	Zn^{2+} und Diabetes	52
5.	Literaturverzeichnis	53
6.	Publikation	58
7.	Danksagung.....	59
8.	Lebenslauf	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zinkverteilung im Körper	13
Abbildung 2: Zink in der β -Zelle des Pankreas	14
Abbildung 3: Zinktransporter.....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung des $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} - Kanals	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung des TRPM3-Kanals.....	18
Abbildung 6: Kodierregion des Verpackungsplamids $\Delta 8.91$	26
Abbildung 7: Kodierregion des Pseudotypisierungsplasmids pCMVG	27
Abbildung 8: Provirus mit dem Kollagenase Promotor/Luciferase Reportergen Coll.luc.....	28
Abbildung 9: Das T-Rex System.....	29
Abbildung 10: Formazan-Kristallbildung beim MTT in mesenchymalen Stammzellen.....	35
Abbildung 11: Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Insulinomazellen durch Stimulation des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals.....	36
Abbildung 12: Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen auf die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Aktivierung des AP-1 in INS-1 832/13 Zellen	37
Abbildung 13: Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle ist essentiell für die Signaltransduktion durch die Stimulation des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$...	38
Abbildung 14: Die Toxizität von extrazellulärem Zn^{2+} auf INS-1 832/13 Zellen.....	40
Abbildung 15: Zn^{2+} -Ionen blockieren die durch die Stimulation der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle hervorgerufene Aktivierung des AP-1	42
Abbildung 16: Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat	43
Abbildung 17: Die Toxizität von extrazellulärem Zn^{2+} auf T-REx-TRPM3 Zellen	45
Abbildung 18: Zn^{2+} -Ionen blockieren die durch die Stimulation der TRPM3-Kanäle hervorgerufene Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors	47

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser
AP-1	Aktivator-Protein-1
ATF	aktivierende Transkriptionsfaktoren
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bZIP	Basic Leucin-Zipper
Ca ²⁺	Calcium
Ca _v 1.2	Spannungsabhängiger Calciumkanal Untereinheit alpha-1c
CaMKIV	Calcium-/ Calmodulin-abhängige Kinase Typ IV
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR5	CC Chemokinrezeptor 5
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CDF	Kationendiffusionsvermittler
cDNA	<i>copy-DNA</i>
c-Fos	<i>FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
c-Jun	<i>Jun Proto-Oncogene</i>
CMV	Zytomegalievirus
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
Egr-1	<i>Early growth response protein-1</i>
Elk-1	<i>ETS transcription factor ELK-1</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> – Fetales Kälberserum
FPL64176	Methyl 2,5-dimethyl-4-[2-(phenylmethyl) benzoyl]-1H-pyrrol-3-carboxylat
GP 120	Glykoprotein 120
GPR39	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 39
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>„Hank´s Balanced Salt Solution“</i>

HEK293	<i>Human embryonic kidney</i> – Zelllinie
INS-1 832/13	<i>Rat Insulinoma</i> - Zelllinie
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molar
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MEF-2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MT	Metallothioneine
NFAT	<i>Nuklear factor of activated T-cells</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – Phosphatgepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “- Zellkulturmedium
S2	Schutzstufe 2
SOC	<i>store operated channel</i>
SRE	<i>serum response element</i>
(sh) RNA	<i>small hairpin RNA</i>
SV40pA	Simian-Virus 40 Polyadenylierungssignal
TCF	<i>ternary-complex-factor</i>
Tet	Tetrazyklin
TRE	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate DANN response element</i>
TRPM3	<i>transient receptor potential melastatin-3</i>
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Ψ	Verpackungssignal
Zn^{2+}	Zink
ZIP	Zrt- und Irt- ähnliches Protein
ZnT	Zink Transporter

Zusammenfassung

Zink ist ein wichtiges Spurenelement und wichtig für die Funktion vieler Proteine. Es wird deshalb über spezielle Zn^{2+} Transporter oder Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle aufgenommen. In dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion zweier Ca^{2+} -Kanäle untersucht, des spannungsgesteuerten L-Typ Ca^{2+} -Kanal $Ca_v1.2$ und des „transient receptor potential“ (TRP)-Kanal TRPM3. Die Stimulation des $Ca_v1.2$ -Kanals und auch die Stimulation des TRPM3-Kanals induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, welche die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt. Für den TRPM3-Kanal war bereits gezeigt worden, dass ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen notwendig ist, um die Gentranskription zu aktivieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation des $Ca_v1.2$ -Kanals einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma induzieren muss, um AP-1 zu aktivieren. Um den Einfluss von Zn^{2+} -Ionen auf die intrazelluläre Signaltransduktion der Ca^{2+} -Kanäle $Ca_v1.2$ und TRPM3 untersuchen zu können, wurden verschiedene Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen auf ihre zelluläre Toxizität getestet, um die folgenden Experimente mit nicht-toxischen Konzentrationen durchführen zu können. Danach wurde untersucht, ob extrazelluläre Zn^{2+} -Ionen die nach Stimulation der Kanäle $Ca_v1.2$ und TRPM3- induzierte Gentranskription beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass extrazelluläre Zn^{2+} -Ionen die Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation der spannungsabhängigen $Ca_v1.2$ -Kanäle und TRPM3-Kanäle signifikant reduzierten. Experimente mit Ca^{2+} -freiem Medium zeigten, dass Zn^{2+} -Ionen Ca^{2+} -Ionen bezüglich der Induktion der Gentranskription über $Ca_v1.2$ -Kanäle und TRPM3-Kanäle nicht ersetzen konnten. Hinzugabe von Ca^{2+} -Ionen zum Medium führte jedoch dazu, dass die Stimulation dieser Ca^{2+} -Kanäle eine Signalkaskade mit der Aktivierung von AP-1 auslöste.

Erregbare Zellen wie Neuronen und pankreatische β -Zellen setzen Zn^{2+} -Ionen bei der Exozytose frei. Ich postuliere, dass Zn^{2+} -Ionen als negatives Feedback auf die Stimulus-induzierte Exozytose wirken, indem sie die Signaltransduktion durch Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} -Ionen inhibieren.

Summary

Zinc is a necessary trace element for many proteins. Therefore, Zn^{2+} has to be taken up by the cells, using specific Zn^{2+} transporters or Ca^{2+} channels. In this study I have focused on two Ca^{2+} channels, the L-type voltage-gated $Ca_v1.2$ channel and the transient receptor potential channel TRPM3. Both channels induce an intracellular signaling cascade leading to the activation of the transcription factor AP-1. Stimulation of TRPM3 channels has already been shown to require an influx of Ca^{2+} ions into the cytoplasm to activate gene transcription. Here, I showed that the stimulation of voltage-gated Ca^{2+} channels required an influx of Ca^{2+} ions into the cytoplasm as well, in order to change the genetic program of the cells.

To investigate the effect of Zn^{2+} ions on intracellular signaling and gene transcription following activation of either $Ca_v1.2$ or TRPM3 Ca^{2+} channels, the toxicity of Zn^{2+} ions was determined in dose-response experiments, in order to work with non-toxic concentrations of Zn^{2+} . The objective of this study was to elucidate whether extracellular Zn^{2+} ions affect $Ca_v1.2$ and TRPM3-induced gene transcription following stimulation of the channels. The results show that extracellular Zn^{2+} ions significantly reduced the activation of AP-1 following stimulation of either voltage-gated $Ca_v1.2$ channels or TRPM3 channels. Experiments performed with cells maintained in Ca^{2+} -free medium revealed that Zn^{2+} ions could not replace Ca^{2+} ions in inducing gene transcription via stimulation of $Ca_v1.2$ and TRPM3 channels. Re-addition of Ca^{2+} ions to the cell culture medium, however, restored the ability of these Ca^{2+} channels to induce a signaling cascade leading to the activation of AP-1. Secretory cells, including neurons and pancreatic β -cells release Zn^{2+} ions during exocytosis. I am proposing that the released Zn^{2+} ions function as a negative feedback loop for stimulus-induced exocytosis by inhibiting Ca^{2+} channel signaling.

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von Zink im menschlichen Körper

Im Körper eines erwachsenen Menschen befinden sich etwa 2-3 g Zink (Zn^{2+}), welches viele Funktionen in den Zellen des Organismus ausübt. Bei Zink handelt es sich um ein notwendiges Spurenelement, das die Expression und Aktivierung von verschiedenen biologischen Molekülen wie Transkriptionsfaktoren, Kanälen und Wachstumsfaktoren, reguliert. Auch für die Funktion von über 300 unterschiedlichen Enzymen - sei es als Kofaktor oder als Strukturelement - sind Zn^{2+} -Ionen essentiell [15]. Viele DNA Bindeproteine benutzen Zn^{2+} als Strukturelement um, durch die Anordnung von zwei Cystein- und zwei Histidinresten, die Zinkfinger-DNA-Bindedomäne zu bilden [14]. Auch die Superoxid Dismutase, die unter anderem der Entfernung von Sauerstoffradikalen in Erythrozyten dient, enthält Zink [52].

Sowohl ein Überschuss als auch eine Malabsorption von Zink stört die Homöostase und beeinflusst dementsprechend Wachstum, Morphogenese und Immunantwort, wie auch neurosensorische und endokrine Funktionen [7]. Hierbei kann ein Mangel von Zink zu zahlreichen Symptomen, wie Haarverlust, Haut- und Augenproblemen, Immundefiziten, Geschmacksveränderungen, sowie Wachstumsrestriktion führen. Ein Zinküberschuss verursacht häufig Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, Fieber und Kopfschmerzen [13]. Die Auswirkungen eines absoluten Zinkmangels werden in dem Krankheitsbild der Acrodermatitis enteropathica deutlich. Es handelt sich hierbei um eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Das defekte Gen ist das kodierende Gen des Zink-Transporters ZIP4 SLC39A4, welches sich auf Chromosom 8q24 befindet. Dies geht mit einer verminderten Aufnahme von Zink aus der Nahrung in die Enterozyten einher. Klinisch präsentiert sich die Krankheit ähnlich wie eine Psoriasis mit Läsionen der Haut und Veränderungen der Nägel [38].

Zink wird vor allem in der Skelettmuskulatur und den Knochen gespeichert. Diese können jedoch nicht mehr Zink aufnehmen, als der Körper benötigt. Deshalb muss Zink täglich über die Nahrung aufgenommen werden. Weniger als 1 % befinden sich im Serum, wobei dort 80 % des Zinks an Albumin, und 20 % an α_2 -Makroglobulin gebunden vorliegen. Jeden Tag werden ungefähr 0,1 % der Gesamtmenge von Zink, die sich im Körper befindet über die Nahrung, vor allem im Dünndarm aufgenommen. Dabei ist der Körper, falls dies notwendig ist, in der Lage bis zu 90 % des konsumierten Zinks aufzunehmen. Befindet sich zu viel Zink im Körper wird es über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden, was unter anderem durch die Zellmauserung der Darmmukosa geschieht [13].

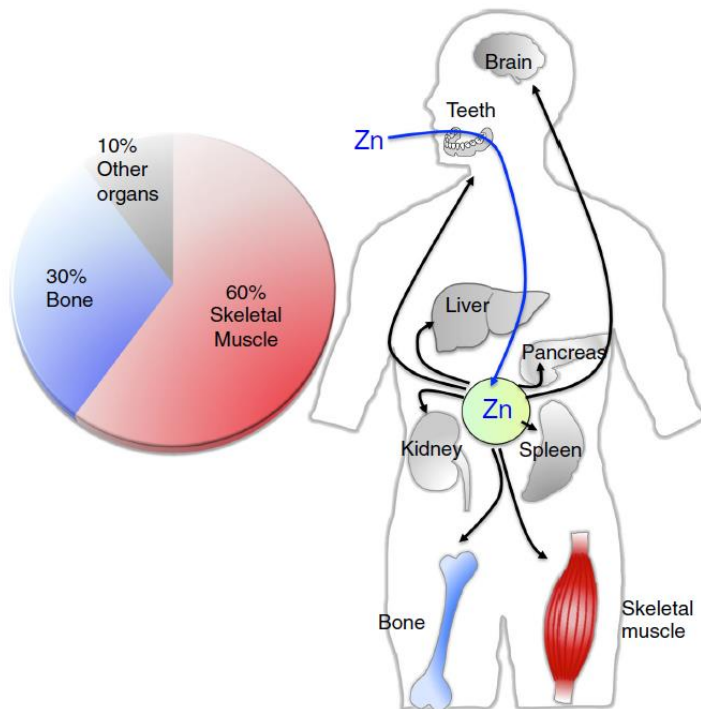


Abbildung 1: Zinkverteilung im Körper

Zink wird im Dünndarm aufgenommen und anschließend zum größten Teil in Knochen und Muskeln gespeichert. Entnommen und modifiziert aus: Hara T. et al. [13].

In den β -Zellen des Pankreas spielt Zink insofern eine Rolle, dass das reife Insulin zusammen mit dem abgespaltenen C-Peptid und Zink in Vesikeln gespeichert wird. In den Vesikeln bildet das Insulin mit dem Zink kondensierte Komplexe, die so genannten hexameren Insuline, die dort kristallisieren. Um ein Hexamer zu bilden, formieren sich drei B-Ketten mit ihren, an der Position 10 befindlichen Histidinresten um ein Zinkion. Jeweils zwei dieser Komplexe bilden ein Hexamer [15,68]. Wenn die extrazelluläre Glucosekonzentration ansteigt, kommt es zur Sekretion dieser Vesikel. Glucose wird hierbei, abhängig vom Blutzuckerspiegel, beim Menschen über den GLUT1 Transporter in die β -Zellen aufgenommen. Anschließend wird es über die Glykolyse in den Mitochondrien abgebaut, was zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses in der Zelle führt. ATP wiederum bindet an eine Untereinheit des ATP-sensitiven K^+ -Kanals, der in der Plasmamembran der Zelle verankert ist. Dadurch schließt sich der Kanal und es kommt zur Depolarisation, welche darin resultiert, dass sich ein spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanal öffnet, und Calcium in die Zelle strömt. Dieser intrazelluläre Calciumanstieg löst die Exozytose der Vesikel aus [15].

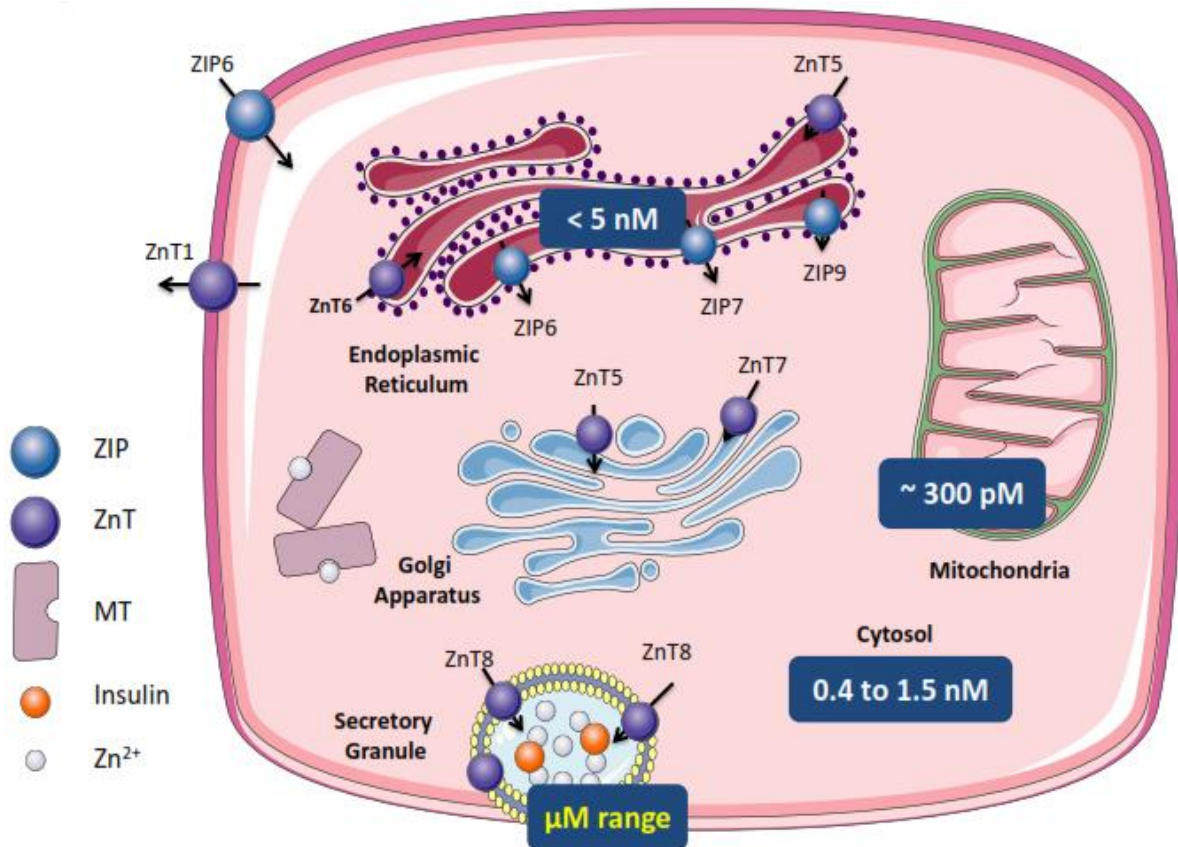


Abbildung 2: Zink in der β -Zelle des Pankreas

Zink wird durch verschiedene Transporter in die Zelle aufgenommen und zusammen mit Insulin in Vesikeln gespeichert. Die β -Zelle exprimiert zahlreiche ZnT und ZIP Transporter, die sich entweder in der Zellmembran oder den Membranen der Zellorganellen befinden. Zum Beispiel ist ZnT8 spezifisch für Pankreaszellen und schleust das Zink für die Hexamerbildung mit dem Insulin in die Vesikel ein. MT: Metallothioneine, können Zink binden und als Donor für Enzyme fungieren, die Zink benötigen; ZnT: Zink Transporter; ZIP: Zrt- und Irt- ähnliches Protein. Entnommen und modifiziert aus: Chabosseau P. et al. [3].

1.2 Spezifische Zinktransporter

Da Zinkionen in der Zelle viele Aufgaben haben, müssen sie in die Zelle aufgenommen werden. Dazu dienen verschiedene spezifische Zn^{2+} -Transporter und auch Ca^{2+} -Kanäle, die die Aufnahme dieses wichtigen Spurenelements ermöglichen. In diesem Zusammenhang sind vor allem die beiden Transporterfamilien der ZnT- und ZIP-Transporter zu nennen. Das Genom von Säugetieren codiert für 9 ZnT- und 14 ZIP-Transporter. Diese sind Kationendiffusionsvermittler (CDF), Proteine, die als Effluxtransporter fungieren und vor allem für das Aufrechterhalten der Zinkkonzentration im Zytosol wichtig sind. Die ZnT Transporter und ihre Homologe wirken als $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^+$ Antiporter. Sie transportieren Zn^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum oder in intrazelluläre Kompartimente. Interessant ist hierbei vor allem der ZnT8 Transporter, der in besonders hohem Maß im Pankreas exprimiert

wird. In Mäusen mit einer genetischen Variante dieses Transporters wurde ein 17 % erhöhtes Diabetes-Risiko festgestellt [3]. Außerdem finden sich beim Diabetes mellitus Typ 1 in 60-80 % der Fälle, aber auch beim Typ 2 in geringerem Ausmaß Autoantikörper gegen den ZnT8 Transporter [69]. Im Gegensatz dazu ist die Zrt/Irt-like protein/solute (ZIP)-Transporterfamilie für den Einstrom von Zink aus dem extrazellulären Raum und aus intrazellulären Vesikeln in das Zytoplasma verantwortlich. Wie ZIP-Transporter genau funktionieren, ist noch nicht geklärt. Jedoch können die Zn^{2+} -Ionen auch über die Poren von Ca^{2+} -Kanälen, wie spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle oder TRP-Kanälen (englisch: „transient receptor potential“), in das Innere der Zelle gelangen [13].

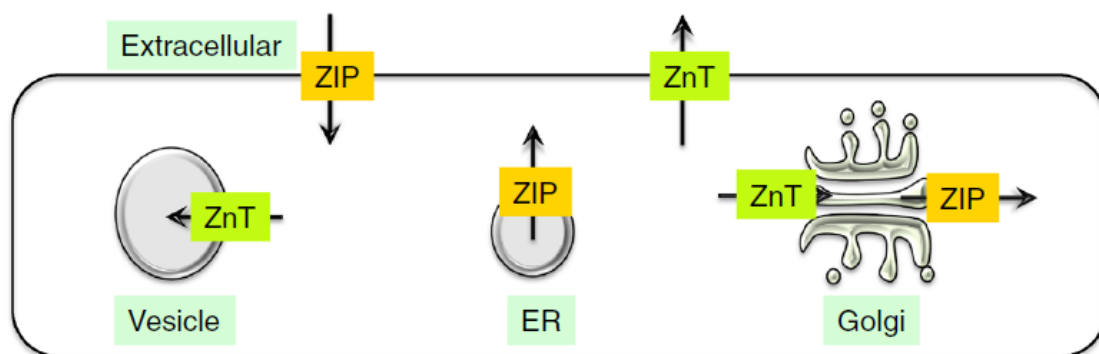


Abbildung 3: Zinktransporter

Die Aufnahme von Zink in das Zytoplasma erfolgt unter anderem über die Transporter der ZIP-Familie. Die Ausschleusung des Zinks aus der Zelle oder in die Zellorganellen wird durch die ZnT-Transporter gesteuert.

Entnommen und modifiziert aus: Hara T. et al. [13].

1.3 Transkriptionsfaktor AP-1

Das Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als Heterodimer aus c-Jun und c-Fos beschrieben wurde, aber auch von verschiedenen Homologen der genannten gebildet wird. Diese Transkriptionsfaktoren gehören zu den Leucin-Zipper (bZIP) Proteinen. Sie dimerisieren über ihre Leucin-Zipper-Domänen, welche ihrerseits mit ihren basischen Domänen die DNA an einer bestimmten Sequenz binden.

Außerdem können auch die ATF-Familie mit der c-Jun- und c-Fos-Familie interagieren, sodass AP-1 aktuell als eine Gruppe verschiedener Homo- und Heterodimere aus den verschiedenen Proteinen der c-Jun-, c-Fos- und ATF-Leucin-Zipper Familie verstanden wird [41].

1.4 Spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal

Spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle werden in vielen Zellen exprimiert und repräsentieren einen der Haupteintrittswege für Ca^{2+} -Ionen in die Zelle.

Die Stimulation dieser Ca^{2+} -Kanäle führt zur Aktivierung der Gentranskription, einschließlich der Transkriptionsfaktoren CREB, NFAT, MEF2, und AP-1 [5,11,67]. Die genannten Signalwege sind von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegen abhängig. Diese Ca^{2+} -Ionen führen wiederum zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme wie beispielsweise der Proteinkinase C, welches das Signal zum Zellkern fortleitet. Diese Signalkaskade involviert häufig auch andere Proteinkinasen wie die Proteinkinase ERK 1/2. Außerdem können die Ca^{2+} -Ionen in den Zellkern gelangen und dort die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMKIV aktivieren. Ein weiterer Signalweg, der mit der Gentranskription gekoppelt ist, beinhaltet die Aktivierung der Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin, die die Gentranskription über die Dephosphorylierung von genregulierenden Proteinen entweder aktiviert oder verhindert [26].

In erregbaren Zellen wie Neuronen oder pankreatischen β -Zellen ist die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen an Exozytoseprozessen beteiligt. In Insulinoma Zellen ist die Insulinsekretion hauptsächlich an die Stimulation spannungsabhängiger $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} -Kanäle gekoppelt [47]. Die durch Depolarisation induzierte Stimulation von spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanälen führt zu einem beständigen Einstrom von Zn^{2+} -Ionen in Insulinoma Zellen. Es wird sogar vermutet, dass Zn^{2+} -Ionen hauptsächlich diese spannungsabhängigen Kanäle nutzen, um in Insulinoma Zellen zu gelangen [10,12,49].

Die Stimulation von Insulinoma Zellen mit KCL und dem Aktivator FPL64176, welcher spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert wird [25,43].

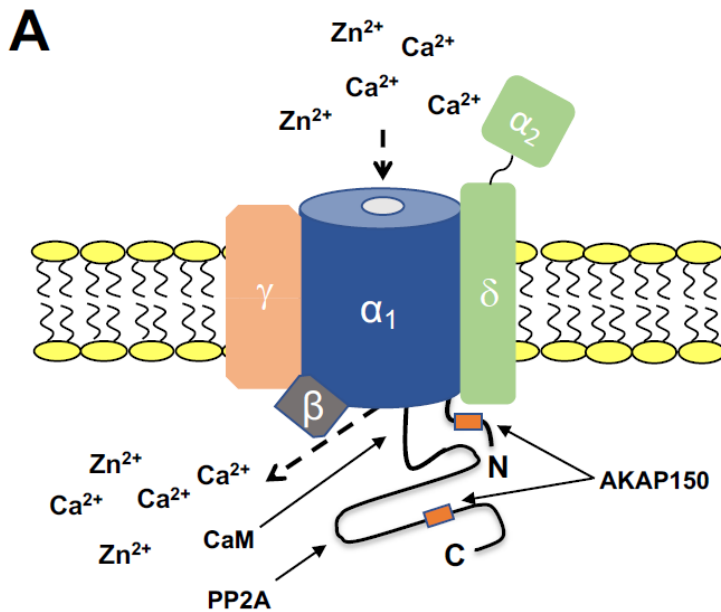


Abbildung 4: Schematische Darstellung des $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} -Kanals

Darstellung der fünf Untereinheiten des Kanals mit der Hauptuntereinheit α_1 und der Hilfsuntereinheiten 2δ , β und γ . Die Pore wird von der α_1 Untereinheit geformt, die auch die Bindungsstelle für Agonisten und Antagonisten ist. Stimulation der Insulinoma Zelle mit KCl und dem Aktivator FPL64176 des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1.

1.5 Stimulation der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle mit KCl/FPL

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle müssen mit KCl/FPL stimuliert werden, um die Aktivierung von AP-1 zu bewirken. Dies zeigt sich, wenn der Ca^{2+} -Kanalblocker Nifedipin benutzt wird, welcher ein Analogon von Dihydropyridin ist. In INS-1 832/13 Zellen, welche einen, durch lentiviralen Gentransfer eingebrachtes Coll.luc Reportergen enthalten, bewirkt KCl/FPL64176 eine starke Hochregulierung der Transkription des Reportergens, welche allerdings durch vor inkubieren mit Nifedipin blockiert werden kann. Durch die Expression einer $\text{Ca}_v1.2$ -specific small hairpin (sh) RNA in INS-1 832 /13 Zellen mittels lentiviralem Gentransfer, wird die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Gentranskription des Coll.luc Reportergens stark reduziert. Also wird durch KCl/FPL64176 tatsächlich hauptsächlich der L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$ stimuliert. Daraus geht hervor, dass die Aktivierung des L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$ durch KCl/FPL64176 eine Signalkaskade auslöst, welche dazu führt, dass AP-1 aktiviert wird [30].

1.6 TRPM3-Kanal

TRPM3-Kanäle (englisch: „transient receptor potential melastatin-3“) sind unselektive Kationenkanäle und gehören zur Gruppe der TRP-Kanäle. Die meisten TRP-Kanäle sind durchlässig für Ca^{2+} - und Na^{2+} -Ionen. Gemeinsam ist allen TRP-Kanälen, dass sie 6 Transmembranregionen besitzen. Funktionell regulieren TRP-Kanäle sensorische Transduktionswege unter anderem für die Wahrnehmung von Geschmack, Temperatur oder Schmerz. Die Stimulation von verschiedenen TRP-Kanälen führt zur Aktivierung der Gentranskription

[58,60]. Es wurde beschrieben, dass die Stimulation der TRPM3-Kanäle besonders die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, Egr-1, und Elk-1 bewirkt [59].

TRPM3-Kanäle werden in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert, zum Beispiel in pankreatischen β -Zellen oder somatosensorischen Neuronen. Die Stimulation des Kanals konnte mit der Insulinsekretion sowie dem Schmerzempfinden in Zusammenhang gebracht werden [16,62,64]. Verschiedene Metaboliten wurden als Aktivatoren der TRPM3-Kanäle beschrieben, unter anderem das Steroid Pregnenolonsulfat, das Lipid D-Erythro-Sphingosin, sowie auch der L-Typ Ca^{2+} -Kanalinhibitor Nifedipin. Allerdings wurde herausgefunden, dass Pregnenolonsulfat der zurzeit stärkste Aktivator der TRPM3-Kanäle ist [27]. Die Stimulation der TRPM3-Kanäle mit dem Neurosteroid Pregnenolonsulfat triggert einen schnellen Einstrom von Ca^{2+} durch die Kanäle in die Zelle und bewirkt einen anschließenden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [28,44,65]. Basierend auf fluorometrischen Messungen wurde die These aufgestellt, dass TRPM3-Kanäle für Zn^{2+} -Ionen sehr durchlässig seien [66]. Über die TRP-Kanäle TRPC6 und TRPA1 wird auch beschrieben, dass sie Zn^{2+} -Ionen in Zellen transportieren [9,20].

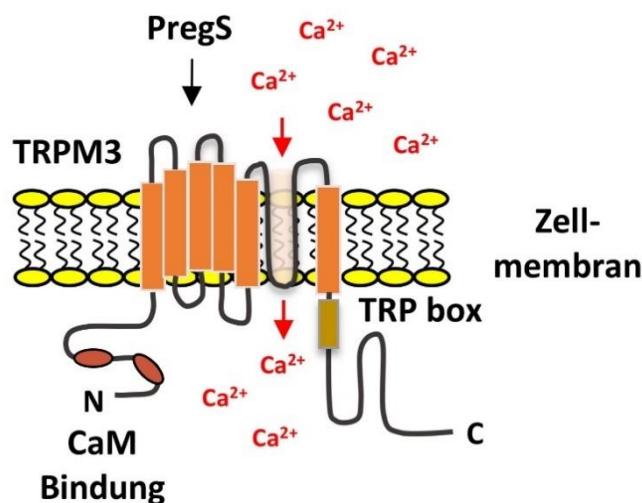


Abbildung 5: Schematische Darstellung des TRPM3-Kanals

Schematische Darstellung der molekularen Struktur des TRPM3-Kanals. Der Kanal enthält sechs Transmembrandomänen, sowie eine porenbildende Domäne zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne. Sowohl der Carboxy- als auch der Aminoterminus sind im Zytosol lokalisiert und binden regulatorische Proteine wie Calmodulin.

Entnommen aus: Thiel G. et al. [59].

1.7 Fragestellung der Arbeit

Es gibt Hinweise darauf, dass Zn^{2+} -Ionen, so wie Ca^{2+} -Ionen als Second Messenger wirken und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Zn^{2+} -Ionen in der Zellkultur über die Stimulation von spannungsabhängigen $Ca_v1.2$ Ca^{2+} - oder TRPM3-Kanälen Einfluss auf die Gentranskription nehmen. Als Marker für die Gentranskription wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 gewählt, welcher sowohl durch die Stimulation des $Ca_v1.2$ Ca^{2+} -Kanals, als auch des TRPM3-Kanals aktiviert wird. Es wurde untersucht, welchen Einfluss Zn^{2+} -Ionen auf die Gentranskription nehmen und ob diese Ca^{2+} -Ionen unter Umständen sogar ersetzen können.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Loch-Platte, transparent (Greiner)	Bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Platte, transparent, steril	Greiner, Frickenhausen
96-Loch-Platte, weiß (Nunc)	Roskilde, Dänemark
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fisher, Berlin
Druckfiltrationseinheit, steril (Sartolab P)	Sartorius, Göttingen
Einmal-Spitzen (200 µl und 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen (10 ml und 20 ml)	Braun AG, Melsungen
Eismaschine	Diverse Hersteller
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann, Eberstadt
Konische Zentrifugen-Röhrchen 15 ml	Bio-one, Frickenhausen
Konische Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Küvette (Quarz)	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Berthold Detection Systems, Alabama USA
Magnetrührer KA	Labortechnik, Staufen
Microplate Reader Infinite M Nano	Tecan, Männedorf CH
Millipore Wasseranlage	Milli Q Millipore, Milford USA
Neubauer Zählkammer (improved)	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Peleusball	Deutsch & Neumann, Henningsdorf
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg

Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA, Labortechnik, Staufen
Zellkulturflaschen	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø 35 mm	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø 60 mm	Bio-one, Frickenhausen

2.2 Chemikalien

ATP	Merck KGaA (Sigma Aldrich), Darmstadt, # A2383
Bacillol Plus	Bode Chemie, Hamburg, # 973375
BCA Protein	Interchim, Montlucon, # UP40840A
Bisindolylmaleimid III (BisIII)	ENZO, # ALX-270-051
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, # T885.2
Ca ²⁺ -free DMEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, # D9800-10
Chloroquin	Merck, Darmstadt, # C6628
Chlorwasserstoff (HCL)	Roth, Karlsruhe, # 9277.2
Coenzym A	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, # sc-214753A
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, # A994.1
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, # NIST SRM 2186II
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, # 6908.1
DME	Sigma Aldrich, Taufkirchen, # D5030
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, # 52100047
Ethanol (EtOH)	ZBDS2, Saarbrücken, # 702543
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, # X986.2
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, # 10270-106
FPL64176	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, # sc-201491
Glucose	Merck, Darmstadt, # G8270
Glutamin	Merck, Darmstadt, # G7513
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt, # H3375

Kaliumchlorid (KCL)	Grüssing GmbH, Filsum, # 12009
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, # 4873
Luminol	Roth, Karlsruhe, # 4203.1
D-Luciferin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, # 4096.2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, # 2189.2
Magnesiumhydrogencarbonat (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt, # 1058270250 Merck, Darmstadt, # M5671
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, # 105886
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT)	Merck, Darmstadt, # 475989
Natriumchlorid (NaCl)	Grüssing GmbH, Filsum, # 121221000U
Natriumpyruvat	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, # 11360070
Penicillin/Streptomycin	Merck, Darmstadt, # P4333
Hexadimethrin-Bromid (Polybren)	Merck, Darmstadt, # 107689
Pregnenolonsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, # P162
Reporter Lysis Buffer (5x)	Promega, Mannheim, # E3971
RPMI 1604	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, # 51800-043
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, # T7680
Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)	Calbiochem, # 524400-1
Tricin	Merck, Darmstadt, # 39468
Trypsin/EDTA (10x)	Merck, Darmstadt, # L2153
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Merck KGaA (Sigma Aldrich), Darmstadt, # 108816

2.3 Lösungen

Nachfolgend werden die benutzten Lösungen und Puffer beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, wurde als Lösemittel Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{MILLIPORE}}$) benutzt. Um den geeigneten pH-Wert zu erreichen, wurden HCL und NaOH verwendet.

DMEM

Fetales Kälberserum (FCS)	10	%
Glucose	25	mM
L-Glutamin	2	mM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$

DMEM- serumreduziert

Fetales Kälberserum (FCS)	0,05	%
Glucose	25	mM
L-Glutamin	2	mM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$

RPMI

Fetales Kälberserum (FCS)	10	%
HEPES	10	mM
L-Glutamin	2	mM
Natrium-Pyruvat	1	mM
β -Mercaptoethanol	50	μM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$
Glucose	11	mM

DME

Fetales Kälberserum (FCS)	0,5	%
HEPES	10	mM
L-Glutamin	2	mM
Natrium-Pyruvat	1	mM
β -Mercaptoethanol	50	μM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$
Glucose	2	mM

Ca²⁺-freies DMEM

Fetales Kälberserum (FCS)	0,5	%
HEPES	10	mM
L-Glutamin	2	mM
Natrium-Pyruvat	1	mM
β-Mercaptoethanol	50	μM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	μg/ml
Glucose	5,5	mM

Luciferase-Assay Reagent

ATP	583	μM
Coenzym A	297	μM
DTT	36,3	mM
EDTA	0,11	mM
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	1,177	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,94	mM
Tricin	22	mM
pH 7,8		

<u>Luciferin</u>	4,7	mM
------------------	-----	----

Um die fertige Lösung für die Luciferasemessung zu erhalten, wurde 9 ml des *Luciferase-Assay Reagent* mit 1 ml Luciferin versetzt.

1x phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	170	mM
KCl	3,35	mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4	mM
KH ₂ PO ₄	1,84	mM
pH 7,24		

1x Trypsin/EDTA (Merck, Darmstadt)

Trypsin 0,25% (w/v)	0,25	% (w/v)
EDTA 0,1% (w/v)	0,1	% (w/v)

2x Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

NaCl	274	mM
Na ₂ HPO ₄	3,75	mM
KCl	25	mM
Glucose	27,75	mM
HEPES	105	mM
pH 7,05-7,12		

Mit Sterilfilter (Ø 0,22 µm) steril filtriert.

1x Reporterlysympuffer

5x Reporter Lysis Buffer	20	%
H ₂ O _{MILLIPORE}	80	%

2.4 Herstellung rekombinanter Lentiviren

Für die Herstellung der Lentiviren wurden drei Plasmide benutzt: Das Verpackungsplasmid, das Hüllprotein-kodierende Plasmid und der Transfektor. Diese drei Plasmide wurden in einer transienten Transfektion in die zu transfizierenden HEK293-TN-Zellen gegeben. Nachfolgend werden die Plasmide einzeln beschrieben.

2.4.1 Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$

Dieses Plasmid kodiert für die Gene Gag, Pol und Rev. Gag kodiert hierbei die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, also für die virusspezifischen Antigene. Pol codiert die Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und die Protease, welche für das Umschreiben und den Einbau der viralen Information in die Zielzelle wichtig sind. Rev ist wichtig für den „regulator of expression of virion proteins“, welcher den Export der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma fördert. Die Gene stehen unter Kontrolle des starken „intermediate early“ (IE) Promotors/Enhancer Komplexes des Cytomegalovirus (CMV), sodass es zu einer starken Expression kommt. Das Konstrukt enthält 3' ein Polyadenylierungssignal (SV40pA) (Abbildung 6) [51,57].

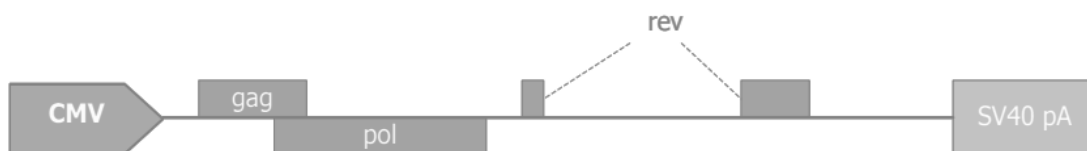


Abbildung 6: Kodierregion des Verpackungsplasmids $\Delta 8.91$

Das Plasmid kodiert für die HIV-Gene gag, pol und rev. Sie stehen unter der Kontrolle des (IE)-Promotor/Enhancer Komplexes von CMV. Das Polyadenylierungssignal SV40pA steht am Ende des Konstruktes [57].

Entnommen und modifiziert aus: Dissertation Isabelle Müller [42].

2.4.2 Das Hüllprotein-kodierende Plasmid pCMV-G

Das Expressionsplasmid codiert das Hüllprotein eines Herpesvirus, des „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV). Es wird verwendet, da das ursprüngliche Hüllprotein GP 120 des HIV nur mit dem CD-4 Rezeptor und dem Co-Rezeptor CCR5 interagiert und somit nur Zellen mit diesen Rezeptoren infiziert werden können. Dadurch wird der Tropismus des Virus erweitert. Da das VSV-G somit für ein Hüllprotein eines anderen Virus, bzw. des CMV codiert, wird das Plasmid auch Pseudotypierungsplasmid genannt. Auch in diesem Expressionsplasmid steht das

Gen unter Kontrolle des IE-Promotors/Enhancer Komplexes des CMV und wird ebenso durch das SV40pA abgeschlossen (Abbildung 7).



Abbildung 7: Kodierregion des Pseudotypisierungsplasmids pCMVG

Das Expressionsplasmid codiert das Hüllprotein des VSV. Die VSV-G cDNA steht ebenfalls unter der Kontrolle des IE-Promotors/Enhancer Komplexes des CMV. Auch hier wird das Plasmid durch das SV40pA abgeschlossen [57].

Entnommen und modifiziert aus: Dissertation Isabelle Müller [42].

2.4.3. Der AP-1-Sensor Coll.luc

Für die Experimente wurde der AP-1-Sensor Coll.luc benutzt. Coll.luc ist ein Reporter gen, bestehend aus dem Luciferasegen und dem Kollagenase-Promotor. Der Kollagenasepromotor enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1, die TRE genannt wird. Zur Herstellung rekombinanter Lentiviren, die das Coll.luc Reporter gen in ihrem Genom enthielten, wurde der lentivirale Transfervektor pFW-Coll.luc zusammen mit dem Verpackungsplasmid ($\Delta 8.91$) und dem Expressionsplasmid (pCMV-G) in die Virusproduzierenden HEK293-TN-Zellen transfiziert. Die so produzierten Lentiviren enthielten die Kodierinformation des Reporter gens im Genom.

Durch die Infektion mit dem Coll.luc-kodierenden Lentivirus wurde das Reporter gen in das Chromatin der INS-1 832/13-Zellen oder der T-REx-TRPM3-Zellen integriert. Durch die Stimulation der Ca^{2+} -Kanäle Ca_v12 oder TRPM3 wurde AP-1 aktiviert, dass an die AP-1-Bindungsstelle des Kollagenase-Promoters des Reporter gens band. Dadurch wurde das Luciferasegen transkribiert. Die gesteigerte Biosynthese der Luciferase konnte dann im Luciferase-Assay gemessen werden.

Coll.luc

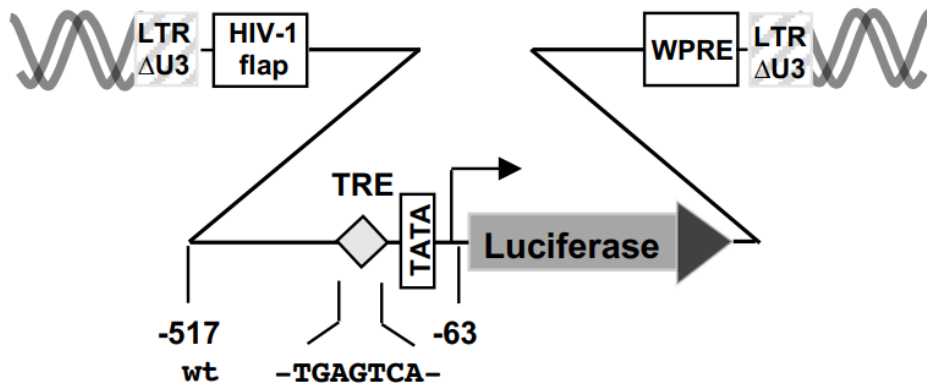


Abbildung 8: Provirus mit dem Kollagenase Promotor/Luciferase Reportergen Coll.luc

Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für das Kollagenase Reportergen Coll.luc kodiert. Das 5'LTR weist eine Deletion des U3 auf. Die Lokalisation des WPRE und HIV flap- Elements werden gezeigt.

2.5 Zelllinien

Für die Virusproduktion wurden HEK293/T17-TN Zellen benutzt. Es handelt sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche das T-Antigen exprimiert. Expressionsvektoren, die den SV40 Replikationsursprung enthalten, werden in den Zellen episomal amplifiziert, was die Plasmidkopienzahl erhöht und zu höherer transienter Expression führt [45].

Für die Analyse wurden INS-1 832/13-Zellen und T-REx-TRPM3-Zellen benutzt. INS-1 832/13-Zellen sind Insulinomazellen der Ratte, die freundlicherweise von Hindrik Mulder, Lund University, Sweden, mit Zustimmung von Hans-Ewald Hohmeier und Christopher Newgard, Duke University, USA, zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich bei diesen Zellen um einen Abkömmling der INS-1 Zell-Linie. INS-1 Zellen entstanden durch ein transplantierbares, durch Röntgenstrahlung induziertes Insulinom der Ratte. Ursprünglich stellten diese Zellen eine Mischung verschiedener endokriner Zellen mit verschiedenem Phänotyp dar. Diese Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches das humane Insulingen enthielt. Die Zellkolonien wurden anschließend auf ihre Insulinproduktion nach Stimulation mit Glucose eingeteilt. Bei den INS-1 832/13 Zellen handelt es sich hierbei um einen Klon, der mit hoher Insulinausschüttung reagiert [18].

T-REx-TRPM3 Zellen sind HEK293 Zellen, die induzierbar den humanen TRPM3-Kanal exprimieren [27]. Die Zellen wurden mir von David Beech, Universität Leeds, zur Verfügung gestellt. Die Expression des TRPM3-Kanals unterliegt hierbei der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Tet Repressors vom pcDNATM6/TR Plasmid. Durch das TREx-System wird die Expression von Genen in Säugerzellen reguliert. Das Tet-Operon (TetO) ist ein

regulatorisches Element aus Escherichia Coli, welches im Zusammenhang mit der Tetrazyklin-Resistenz steht [17]. In dem System steht das TetO unter Kontrolle des sehr starken Promotors des Cytomegalie Virus (CMV). Dieser Promotor besitzt zwei

Kopien der Tet-Operon (TetO₂) -Sequenzen 5`TCCCTATCAGTGATAGAGA`3. Jeweils zwei Moleküle des Tet-Repressors (TetR) können an die TetO-Sequenzen, welche als Bindungsstelle dienen, binden. Wenn kein Tetrazyklin vorhanden ist, bindet der Tet-Repressor als Homodimer an die TetO₂-Sequenz des Promotors und unterdrückt somit die Expression des Zielgens. Wird Tetrazyklin jedoch hinzugegeben, bindet es an den TetR, welcher sich nun unter Konformationsänderung vom Tet-Operon ablöst. Als Folge kann die Expression des Gens stattfinden (Abbildung 9) [29].

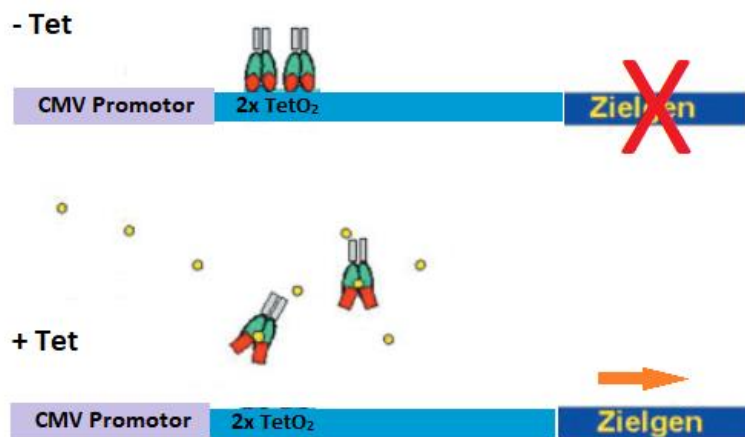


Abbildung 9: Das T-Rex System

Jeweils zwei Moleküle des TetR können an die TetO-Sequenzen binden und unterdrücken die Expression des Zielgens. Ist Tetrazyklin vorhanden, bindet es an den TetR und verhindert dessen Bindung an die TetO₂ Sequenz des CMV-Promotors. Die Expression des Zielgens kann stattfinden. Entnommen und modifiziert aus: Hillen, W. et.al. [17].

2.6 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Inkubator unter Standardbedingungen kultiviert, d.h. unter feuchter Atmosphäre, 37°C und 5 % CO₂. Das Arbeiten an der Zellkultur wurde unter der Sterilbank getätigt. Sicherheitsbereich S2.

2.7 Passagieren

Die INS-1 832/13 Zellen wurden alle fünf Tage passagiert. Bei den übrigen Zelllinien erfolgte dies alle drei Tage. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA inkubiert, bis es zum Ablösen der Zellen kam. Im Anschluss wurden die Zellen mit Medium im Verhältnis

1:10 verdünnt. Für die INS-1 832/13 Zellen wurde hierbei RPMI-Medium benutzt, für die anderen Zelllinien DMEM-Medium.

2.8 Herstellung von Lentiviren für die Infektion eukaryontischer Zellen

2.8.1 Transfektion der 293T/17-Zellen mit Plasmiden

Am Tag vor der Transfektion wurden die HEK293-TN-Zellen geerntet. Es wurden pro Platte (Ø 60 mm) 1,6 Mio. Zellen ausgesät, nachdem sie zuvor mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt und mit 4 ml Medium versetzt wurden. Für die Transfektion zur Herstellung der Viren, wurden die drei bereits genannten Plasmide benutzt. Die jeweilige Konzentration wurde mit Hilfe des Photometers bei 260nm bestimmt. Pro Petrischale wurden 5 µg des Verpackungsplasmids Δ8.91, 2,3 µg des Expressionsplasmids pCMV-G und 6,6 µg des Transfervektors pFWColl.luc in 250 µl H₂O_{MILLIPORE} in einem Polystyrolröhrchen angesetzt. Daraufhin wurde 27,5 µl CaCl₂ (2,5 M) hinzugefügt. In einem weiteren Polystyrolröhrchen wurde 275 µl 2x HBSS gegeben und mit einer Pasteurpipette unter Einblasen von Luft durchmischt, sowie mit einer weiteren Pasteurpipette der Ansatz des ersten Polystyrolröhrchens hinzugefügt. Hierdurch entstanden Calcium-Phosphat DNA-Präzipitate, welche dann durch die zu transfizierenden Zellen aufgenommen werden konnten. Die Präzipitate zeigten sich durch einen weißen Niederschlag. Das Medium der am Vortag ausplattierten Zellen wurde abgenommen und 4 ml frisches, 25 µM Chloroquin enthaltendes Medium auf die Zellen gegeben. Das Malariamedikament Chloroquin neutralisiert den pH-Wert der Lysosomen, sodass die sich in ihnen befindlichen DNAsen gehemmt werden und die Transfektion effektiver ist [32]. Im Anschluss wurden jeweils 500 µl des Calcium-Phosphat DNA-Präzipitates auf die Platten gegeben und für 20-24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Chloroquin-haltige Medium abgenommen und sachgerecht entsorgt und die Platten 2x mit je 2 ml PBS gewaschen. Nach der Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für weitere 72 h unter den genannten Standardbedingungen inkubiert. In dieser Zeit fand die Virusproduktion statt und die viralen Enzyme und Proteine der Plasmide pCMV-G und Δ8.91 wurden translatiert. Zusammen mit der RNA, die aus der DNA des Transfervektors transkribiert wurde, bildeten sich die neuen Viren und schnürten sich von der Zellmembran ab und befanden sich nun im Medium [23].

2.8.2 Isolierung des Überstandes und Infektion der Zielzellen

Der Virusüberstand wurde von den 60 mm Platten abgenommen und durch einen Spritzenfilter (\varnothing 0,45 mm) filtriert, um etwaige Zellbestandteile zu entfernen. Der Virusüberstand wurde im Verhältnis 1:2 mit Medium verdünnt. Anschließend wurde 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren zu der Viruslösung gegeben, welches die Effizienz der Infektion erhöht. Für die Infektion der INS-1 832/13 Zellen, wurden 450 000 Zellen pro Platte (\varnothing 30 mm) ausgesät und 2 ml der Viruslösung dazu pipettiert. Für die Experimente mit der T-REx-TRPM3 Zelllinie wurden 400 000 Zellen pro Platte ausgesät, jedoch genauso mit 2 ml der Viruslösung versetzt. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen für 24 h inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen vom Virus infiziert und die Transkriptionseinheit im Plasmid, die das virale Genom bildet, in DNA umgeschrieben und in das Genom des Wirts integriert. Am nächsten Tag wurde das virushaltige Medium abgenommen und unter S2 Bedingungen entsorgt. 2 ml frisches Medium wurde auf die Zellen gegeben. Bei den Versuchen mit den INS-1 832/13 Zellen handelte es sich bei dem verwendeten Medium um RPMI-Medium, während bei den Experimenten mit der T-REx TRPM3 Zelllinie serumreduziertes DMEM mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Tetrazyklin Verwendung fand.

2.8.3 Serumreduktion

Bei den INS-1 832/13 Zellen wurde nach weiteren 24 h der Inkubation das RPMI Medium durch serumreduziertes DME Medium (0,5 % FCS) ausgetauscht, um den Einfluss der in FCS vorhandenen Wachstumsfaktoren und deren unspezifische Stimulation zu verringern. Die T-REx-TRPM3 Zellen wurden direkt nach der Virusinfektion mit serumreduziertem Medium versetzt.

2.8.4 Stimulation

24 h nach der Serumreduktion erfolgte die Stimulation. Die INS-1 832/13 Zellen wurden für 3 h mit 100 μM ZnCl_2 in serumreduziertem DME Medium vorinkubiert und anschließend mit 55 mM KCl und 2,5 μM FPL64176 (in DMSO gelöst) stimuliert.

Die T-REx-TRPM3 Zellen wurden für 3 h mit 75 μM ZnCl_2 in serumreduziertem DMEM mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Tetrazyklin vorinkubiert und im Folgenden mit 20 μM Pregnenolonsulfat (in DMSO gelöst) stimuliert. 24 h nach Stimulation wurden die Zellen geerntet.

Die Experimente, bei denen untersucht wurde, ob Zn^{2+} Ca^{2+} ersetzen kann, wurden mit Calcium-freiem DMEM durchgeführt. In diesem Experiment wurden die INS-1 832/13 Zellen entweder mit 100 μM ZnCl_2 , 100 μM CaCl_2 , oder mit 1,8 mM CaCl_2 versetzt, wobei die Konzentration des Calciums in den üblicherweise benutzten Medien 1,8 mM beträgt.

Bei den T-Rex-TRPM3 Zellen erfolgte der Versuch auf analoge Weise, nur dass 0,75 μM ZnCl_2 und CaCl_2 benutzt wurden und wieder Tetrazyklin hinzugefügt wurde.

2.8.5 Reporteranalyse

Im Coll.luc Reportergen stand das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des Kollagenase-Promotors, der eine Bindungsstelle für AP-1 (genannt TRE) enthielt. Die Aktivität des Kollagenasepromotors diente als Sensor für die AP-1 Aktivität. Der Transkriptionsfaktor AP-1, der durch die Stimulation aktiviert wurde, führte zur Expression der Luciferase. Somit wurde durch die Bestimmung der Luciferase-Aktivität die Quantifizierung AP-1 Aktivität möglich.

2.9 Messung der Luciferaseaktivität

2.9.1 Ernten der Zellen

Am Tag nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet. Nachdem das Medium entfernt wurde und die Zellen mit je 2 ml gekühltem PBS pro Platte gewaschen wurden, wurde pro Platte 1 ml PBS auf die Platten pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgeschabt und mit Hilfe einer Pipettenspitze mit dem PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Kühlung der Zellen wurden sie auf Eis gelagert. Um die Zellen von dem PBS abzutrennen, wurden sie unter Kühlung (4°C) für mindestens 5 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets erneut für 5 min unter Kühlung zentrifugiert. Die übrige Flüssigkeit wurde mit einer Pipettenspitze abgenommen und die Zellpellets entweder unter -20°C eingefroren oder gegebenenfalls gleich mit dem BCA- und Luciferase-Assay analysiert.

2.9.2 Aufschließen der Zellen

Um die Zellmembran der Zellen zu lysieren, wurde 1x Reporterlysepuffer verwendet. Je nach durchschnittlicher Größe der Pellets wurde pro Messung zwischen 40 μl und 80 μl ausgewählt und in die Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen, indem die Reaktionsgefäße mit Abstand von mindestens 5 min 2- bis 3-mal über eine raue Oberfläche gezogen wurden (Ratschen).

2.9.3 Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurde eine weiße, 96-Loch-Platte benutzt. Zuerst wurden pro Vertiefung je 5 µl der korrespondierenden Puffer-Proteinmischung gegeben und anschließend je 50 µl des Luciferase-Assay Reagenz mit einer Multi-Channel-Pipette hinzugefügt. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität mit einem Luminometer bestimmt.

2.9.4 Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay

Als Referenzgröße wurden die Luciferasewerte auf die Proteinkonzentration bezogen, die mithilfe des BCA-Assays gemessen wurde. Es wurden 12,5 µl der Puffer-Proteinmischung auf eine transparente 96-Loch-Platte gegeben. Zuerst wurden jedoch die Proteinkonzentrationen 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml ebenfalls mit 12,5 µl/ Vertiefung (englisch: „Well“) als Standardreihe aufgetragen. Danach wurden mit der Multi-Channel-Pipette je 100 µl/ Well der BCA-Lösung hinzugefügt. Die BCA-Lösung setzt sich, wie folgt zusammen: Es gibt eine Lösung A und eine Lösung B. Die Lösung B macht 1/50 des Volumens der benötigten Lösung aus. Für Lösung A wird vom Gesamtvolumen dieses Fünfzigstel des Volumens abgezogen. Nach Zugabe der BCA Lösung wurde die 96-Loch-Platte für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen findet eine Farbreaktion statt: Die Cu²⁺ Ionen der fertigen BCA Lösung werden durch Anlagerung an Peptidbindungen zu Cu¹⁺ reduziert und es kommt zu einer Komplexbildung zwischen dem Cu¹⁺ und zwei Bicinchoninsäuremolekülen. Dieser Komplex stellt sich in einer Violett-färbung dar. Je mehr Protein in der Lösung war, desto intensiver gestaltete sich die Intensität der Färbung. Mit dem Photometer wurde die Farbintensität bei 562 nm bestimmt und die Proteinkonzentration der Proben mithilfe der Absorptionen der Standardreihe berechnet werden.

2.9.5 Die relative Luciferase-Aktivität

Aus dem Quotienten der Luciferasemessung und dem Proteingehalt wurde die relative Luciferase-Aktivität bestimmt. Sie wurde, wie folgt, berechnet:

$$\text{relative Luciferase – Aktivität} = \frac{\text{Light Units (LU)}}{\text{Proteingehalt } (\mu\text{g})}$$

2.10 Toxizität von Zink

2.10.1 Proteinkonzentration

Durch die Messung der Proteinkonzentration der anhaftenden Zellen wurde die Toxizität von extrazellulärem ZnCl_2 gemessen, da eine steigende Konzentration von Zn^{2+} zu der Ablösung der Zellen führte. Dafür wurden die INS-1 832/13 Zellen über Nacht in RPMI Medium und die T-REx-TRPM3 Zellen in DMEM Medium kultiviert. Anschließend wurden sie für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten und danach mit verschiedenen Zn^{2+} -Konzentrationen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und die Proteinkonzentration analysiert. Jedes Experiment wurde in vierfacher Ausführung durchgeführt.

2.10.2 MTT-Assay

Um die Toxizität von Zn^{2+} -Ionen mit einer weiteren Methode darzustellen, wurde ein MTT Assay durchgeführt. Dafür wurde eine sterile 96-Loch-Platte benutzt. Für jede der Konzentrationen wurden vier Wells mit Zellen besiedelt. Die T-REx-TRPM3 Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Well ausgesät, für die INS-1 832/13 wurde eine höhere Zellzahl von 10000 Zellen pro Well benutzt, aufgrund des langsameren Wachstums dieser Zellart. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Medium mit 10 % FCS für 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und das jeweilige Serum reduzierte Medium auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium wieder abgenommen und Medium mit der jeweiligen ZnCl_2 -Konzentration hinzugefügt und für weitere 24 h inkubiert. Dann wurden 20 μl der MTT Lösung pro Well auf das Medium gegeben und für 2 h bei 37°C in 5 % CO_2 inkubiert. Das MTT wird in den Mitochondrien der Zelle von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zu Formazan-Kristallen reduziert, welche eine violett-schwarze Färbung besitzen (Abbildung 10). Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Kristalle in 200 μl DMSO/ Well unter Rütteln für 10 min gelöst. Je aktiver die Zelle bzw. ihre Mitochondrien waren, desto intensiver war die violette Färbung. Um die Absorption zu quantifizieren, wurde ein Thermo Scientific MultiskanTM FC microplate reader benutzt und mit der Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Hintergrund Aktivität wurde mit einer Wellenlänge von 620 nm gemessen und wurde von dem Ergebnis der Messung mit 570 nm subtrahiert. Die MTT-Reduktion der jeweiligen Konzentrationen wurde ins Verhältnis mit der Kontrolle gesetzt und in Prozent angegeben. Alle Experimente wurden jeweils mindestens drei Mal unabhängig voneinander wiederholt und zwar immer in vierfacher Ausführung.

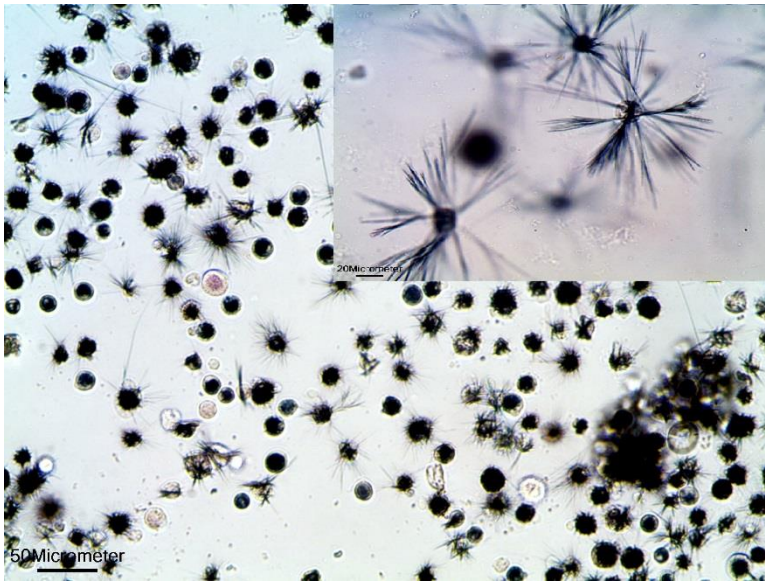


Abbildung 10: Formazan-Kristallbildung beim MTT in mesenchymalen Stammzellen

Entnommen aus:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_test_formazan.jpg
[71]

2.11 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mithilfe von Excel® 2016 (Microsoft Deutschland GmbH) durchgeführt. Die Analysen wurden mithilfe des doppelten T-Tests durchgeführt und auf die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) getestet. Die beschriebenen Daten zeigen die positive und negative Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Die statistische Wahrscheinlichkeit wurde wie folgt angegeben: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Ab einem Sternchen (*) wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion von AP-1 durch Stimulation von $\text{Ca}_v1.2$ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in Insulinoma Zellen

Zur Messung der Aktivität des $\text{Ca}_v1.2$ - Ca^{2+} -Kanals wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 gemessen. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass nach Stimulation des $\text{Ca}_v1.2$ - Ca^{2+} -Kanals eine intrazelluläre Signalkaskade initiiert wird, die im Zellkern zur Aktivierung von AP-1 führt [25,43,61]. Um die AP-1 Aktivität zu messen, wurde ein Kollagenase Promotor/ Luciferase Reporter gen in das Chromatin der INS-1 Insulinomazellen über den lentiviralen Gentransfer eingebaut. Der humane Kollagenasepromotor enthält eine AP-1 Bindungsstelle in der proximalen Promotorregion und wird deshalb regelmäßig benutzt, um die AP-1 Aktivität zu messen (Abbildung 11A) [27,28,41,43]. Abbildung 11B zeigt, dass die Stimulation von Insulinomazellen mit KCl und FPL64176, welches ein Aktivator spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle ist, Transkriptionsfaktor AP-1 aktivierte.

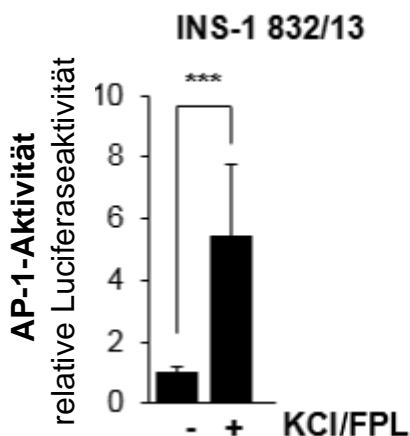


Abbildung 11: Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Insulinomazellen durch Stimulation des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals

INS-1 832/13 Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der ein Luciferase Reporter gen enthielt, welches unter der Kontrolle des Kollagenase Promotors (Coll.luc) stand. Die Zellen wurden für 24 h in serumreduziertem Medium, welches 0,5 % FCS und 2 mM Glucose enthielt, gehalten. Danach wurden die Zellen mit dem Stimulator KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μM) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für die Analyse der Luciferase-Aktivität vorbereitet. Die Luciferase-Aktivität wurde ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gesetzt. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$).

3.2 Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen auf die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Aktivierung des AP-1 in INS-1 832/13 Zellen

RPMI Medium, das Medium in dem die INS-1 832/13 in der Zellkulturflasche kultiviert wurden, enthält 11 mM Glucose. Für das vorherige Experiment wurde DME Medium benutzt, welches nur 2 mM Glucose enthält. Dadurch sollte ein möglicher Einfluss der hohen Glucosekonzentration auf die Gentranskription minimiert werden. Das im Handel erhältliche Ca^{2+} -freie Medium enthält jedoch 5,5 mM Glucose. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine höhere Glucosekonzentration einen Einfluss auf die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Aktivierung des AP-1 in INS-1 832/13 Zellen hat. Die Abbildung 12 zeigt, dass die Stimulation des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals eine Aktivierung von AP-1 induzierte, egal ob die Glucosekonzentration des Mediums 2 oder 5,5 mM betrug.

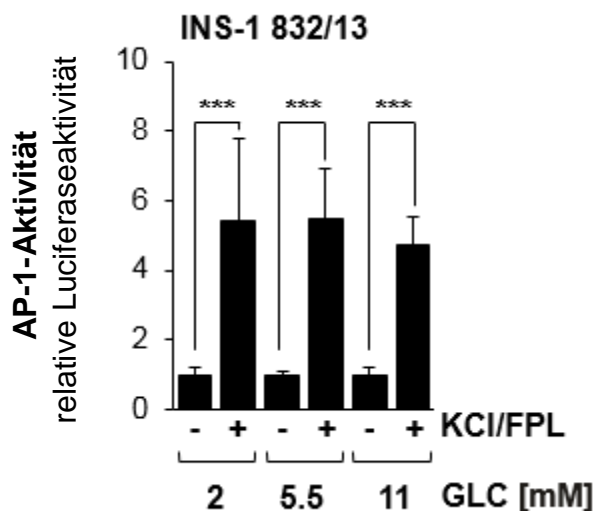


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen auf die durch KCl/FPL64176 hervorgerufene Aktivierung des AP-1 in INS-1 832/13 Zellen

Die Stimulation der $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 in Insulinoma Zellen egal, ob sich im Medium 2 mM Glucose, oder, wie im kommerziell verfügbarem Ca^{2+} -freiem Medium 5,5 mM Glucose, oder 11 mM Glucose, wie dies bei RPMI Medium der Fall ist, befinden. Bei allen drei Konzentrationen findet bei Stimulation eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors statt. Die INS-1 832/13 Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das Coll.luc Reporter gen enthielt. Anschließend wurden die Zellen für 24h in serumreduziertem Medium, welches 0,5 % FCS und 11 mM, 5,5 mM bzw. 2 mM Glucose enthielt, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μM) stimuliert. Eine Analyse der Luciferase-Aktivität, welche zur Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt wurde, schloss sich an. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. (***, $P < 0,001$).

3.3 Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle ist essentiell für die Signaltransduktion durch die Stimulation des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$

Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle $\text{Ca}_v1.2$ ermöglichen den Einstrom der Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Es wurde untersucht, ob der Einstrom der Ca^{2+} -Ionen durch den $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal für die Aktivierung der Gentranskription durch die Stimulation der INS-1 832/13 Zellen mit KCl/FPL64176 notwendig ist. Dafür wurde untersucht, welche Rolle extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen auf die, durch KCl/FPL64176 ausgelöste, Aktivierung der AP-1 regulierten Gentranskription in INS-1 832/13 Zellen haben. Abbildung 13 zeigt, dass in Ca^{2+} -freiem Medium die Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation der Zellen mit KCl/FPL64176 signifikant niedriger war als dies in kalziumhaltigem Medium der Fall gewesen ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle unabdingbar ist, um durch die Stimulation des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals eine AP-1 Aktivität hervorzurufen.

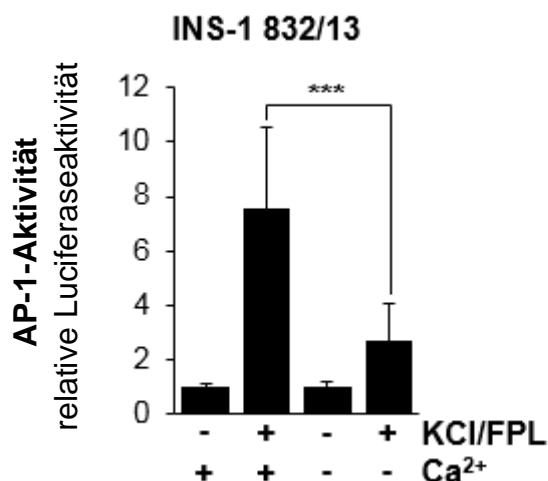


Abbildung 13: Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle ist essentiell für die Signaltransduktion durch die Stimulation des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$

INS-1 832/13 Zellen, welche das Coll.luc Reportergen enthielten, wurden für 24 h in serumreduziertem Medium inkubiert. Bei dem serumreduzierten Medium handelte es sich entweder um DME Medium oder Ca^{2+} -freies Medium. Die Stimulation der Zellen mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μM) wurde hierzu im jeweiligen Medium für einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für die Analyse vorbereitet und die Luciferase-Aktivität im Verhältnis zur Proteinkonzentration gemessen. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte \pm SD dreier voneinander unabhängiger Experimente, welche jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$).

3.4 Die zelluläre Toxizität von Zn^{2+} -Konzentrationen auf INS-1 832/13 Insulinoma Zellen

Zn^{2+} -Ionen sind ein essentielles Spurenelement und werden in vielen Enzymen benötigt. Trotzdem hat sich gezeigt, dass höhere extrazelluläre Konzentrationen von Zn^{2+} zytotoxisch sind. Deshalb wurde die Toxizität von extrazellulärem Zn^{2+} analysiert. Eine toxische Zn^{2+} Konzentration führt dazu, dass sich die Zellen von der Kulturschale ablösen. Deshalb wurde die Proteinkonzentration der übrig gebliebenen anhaftenden Zellen mittels BCA Assay gemessen. Durch das Waschen bei der Zellernte wurden die abgelösten Zellen entfernt. Die Zellen wurden vor der Zugabe von Zn^{2+} erst für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten. Dann wurden sie mit den verschiedenen Zn^{2+} Konzentrationen in serumreduziertem Medium über Nacht inkubiert. INS-1 832/13 Zellen tolerierten eine Konzentration von bis zu 200 μM Zn^{2+} . Eine Erhöhung der Konzentration auf 250 μM Zn^{2+} führte schon zu einer signifikanten Verringerung der Proteinkonzentration, hervorgerufen durch die Ablösung der Zellen (Abbildung 14C). Bei einer Konzentration von 500 μM hatte sich der Großteil der Zellen nach der Inkubation abgelöst und es war kaum mehr Protein im BCA Assay nachweisbar. Im Anschluss wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um auch die zelluläre metabolische Aktivität der Zellen genauer zu erforschen. Dies diente dazu, das vorherige Ergebnis zu verifizieren. Die Auswertung in Abbildung 14D zeigt, dass bereits eine Zn^{2+} -Konzentration von 100 μM die metabolische Aktivität um 30 % reduziert. Höhere Konzentrationen von Zn^{2+} führten zur weiteren Abnahme der metabolischen Aktivität. Da die Zellen bei einer Konzentration von 100 μM Zn^{2+} jedoch weiterhin am Boden der Zellkulturschale anhafteten und die Reduktion der zellulären metabolischen Aktivität relativ gering war, wurde trotz der schon reduzierten metabolischen Aktivität die Konzentration von 100 μM Zn^{2+} für die nachfolgenden Experimente mit den Insulinoma Zellen benutzt. Außerdem wurde eine Konzentration von 100 μM Zn^{2+} auch von anderen Forschern für ähnliche Experimente genutzt. Durch das Verwenden einer Konzentration von 100 μM Zn^{2+} in den nachfolgend geschilderten Experimenten kann somit von einer besseren Vergleichbarkeit mit bereits publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ausgegangen werden [9,10,22,48,49].

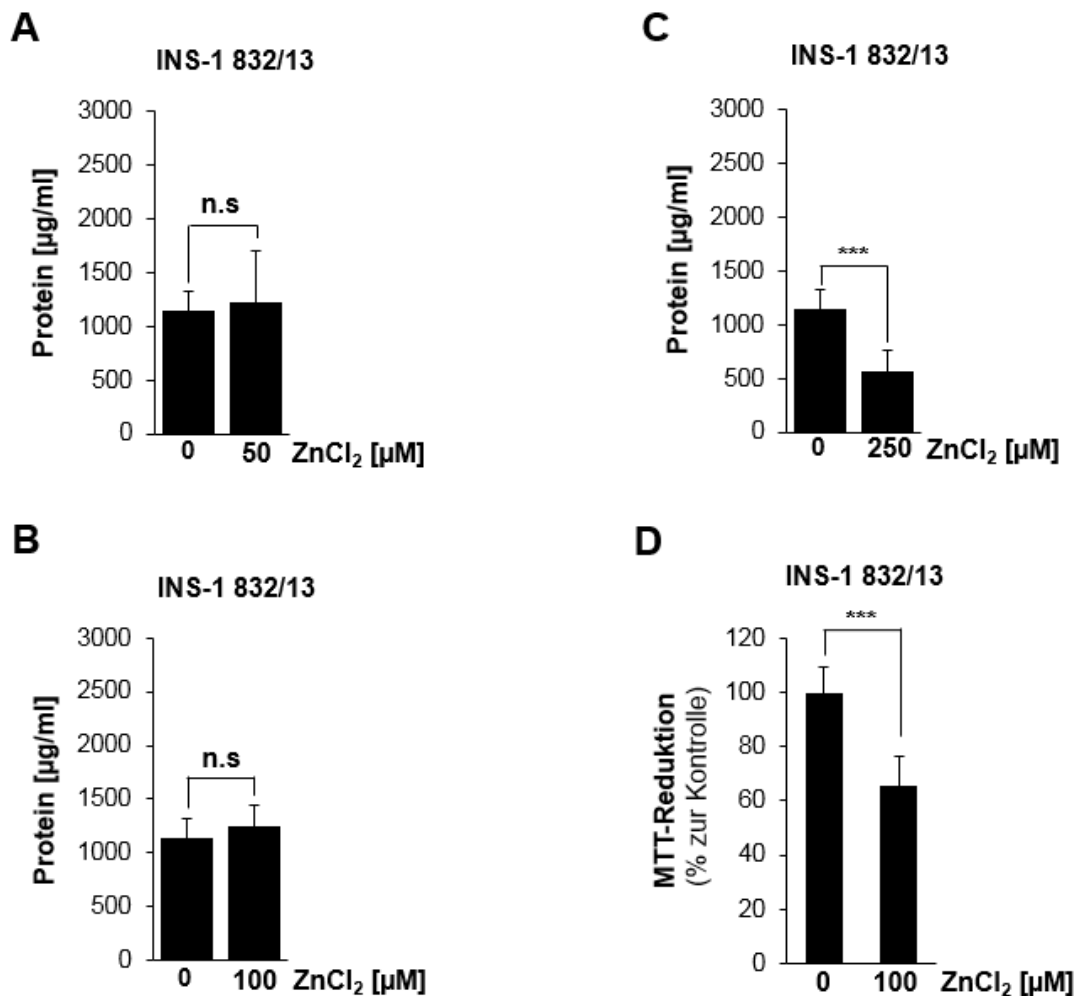


Abbildung 14: Die Toxizität von extrazellulärem Zn²⁺ auf INS-1 832/13 Zellen

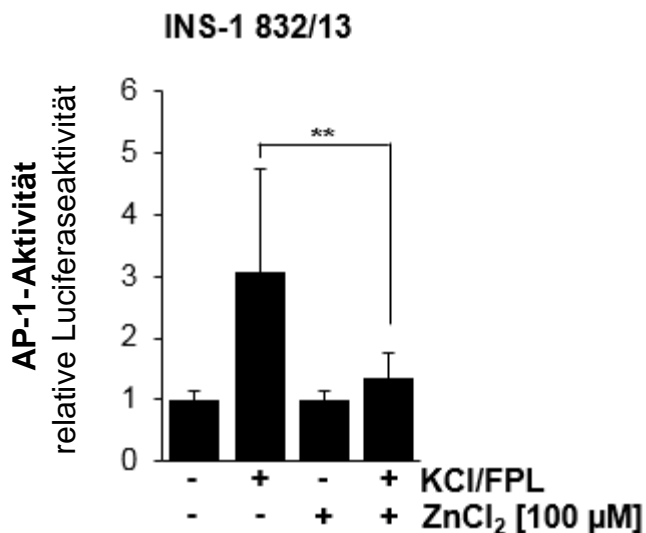
A-C: INS-1 832/13 Zellen wurden in serumreduziertem Medium für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h in serumreduziertem Medium gehalten, welches mit 50 (**A**), 100 (**B**), oder 250 (**C**) μM Zn²⁺ versetzt war. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte +/- SD von drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$; n.s., nicht signifikant). **D:** Mithilfe eines MTT- Assays wurde die enzymatische Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zu Formazan, welche von der mitochondrialen Succinat Dehydrogenase katalysiert wird, gemessen. Die Zellen wurden in einer sterilen 96-Loch Platte, mit einer Dichte von 10000 Zellen pro Well in INS-1 Medium, welches 10 % FCS und 2 mM Glucose enthielt, ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten. Anschließend wurden sie für weitere 24 h in serumreduziertem Medium, versetzt mit 100 μM Zn²⁺, inkubiert. Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten +/- SEM von jeweils vier Wells aus drei voneinander unabhängigen Experimenten (***, $P < 0,001$). Die MTT-Assays wurden zusammen mit Tobias M. Backes durchgeführt.

3.5 Zn²⁺ inhibiert die Ca_v1.2-induzierte Aktivierung von AP-1

In anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass Zn²⁺-Ionen durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in die Zelle strömen können [10,12,49]. Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluss die Anwesenheit von 100 μM Zn²⁺-Ionen im Medium auf die durch den Ca_v1.2 induzierte Gentranskription hat. Die INS-1 832/13 Zellen mit integriertem Coll.luc Reporter gen wurden

zuerst in serumreduzierten, 2mM Glucose und 1,8 mM Ca^{2+} -haltigem Medium für 24 h kultiviert. Anschließend wurden sie für 3 h mit oder ohne ZnCl_2 (100 μM) in serumreduziertem Medium vorinkubiert und dann mit KCl/FPL64176 mit oder ohne ZnCl_2 stimuliert. Die Abbildung 15A zeigt, dass Zn^{2+} -Ionen die Aktivierung von AP-1 nach Stimulation der $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} -Kanäle signifikant reduzierten.

Das vorherige Experiment fand unter Anwesenheit von Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium statt. Deshalb wurde im folgenden Experiment untersucht, ob Zn^{2+} -Ionen Ca^{2+} -Ionen in Bezug auf die Induktion der AP-1 vermittelten Genexpression ersetzen können. INS-1 832/13 Zellen wurden wieder mit einem Lentivirus infiziert, der das Coll.luc Reportergen enthielt. Dann wurden die Zellen in serumreduziertem Ca^{2+} -freiem Medium gehalten - in An- oder Abwesenheit von ZnCl_2 (100 μM) - und anschließend für 24 h mit KCl/FPL64176 inkubiert. Abbildung 15B zeigt, dass Zn^{2+} -Ionen Ca^{2+} -Ionen in der Regulation der Gentranskription nicht ersetzen konnten. Man sieht sogar, dass die zelluläre AP-1 Aktivität in Anwesenheit von Zn^{2+} erniedrigt war. Als Kontrolle wurde zu den Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium 100 μM CaCl_2 anstelle von ZnCl_2 hinzugefügt. Abbildung 15C zeigt, dass die Gegenwart von 100 μM Ca^{2+} bereits ausreichte, um die durch AP-1 vermittelte Genexpression nach Stimulation der Zellen mit KCL/FPL64176 auszulösen.

A

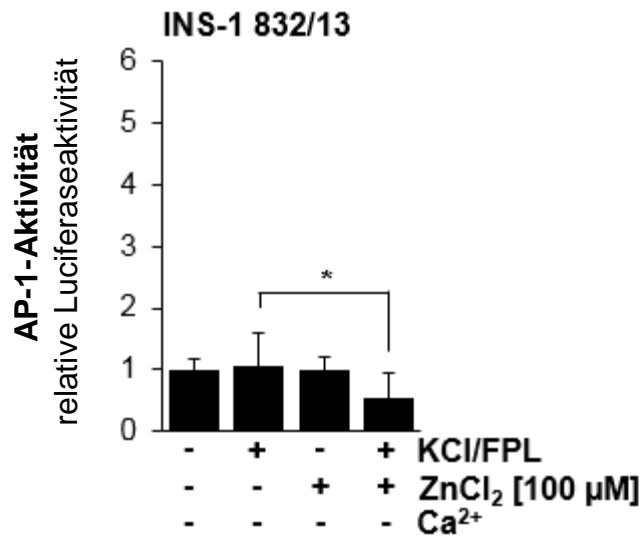
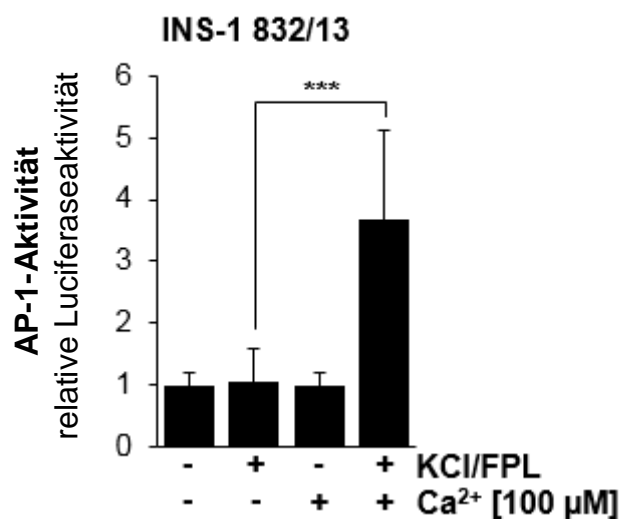
B**C**

Abbildung 15: Zn²⁺-Ionen blockieren die durch die Stimulation der Ca_v1.2-Kanäle hervorgerufene Aktivierung des AP-1

A: INS-1 832/13 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der das Coll.luc Reporter gen enthielt. Die Zellen wurden für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten, welches 2 mM Glucose und 1,8 mM Ca²⁺ enthielt. Außerdem wurde das Medium, wie angegeben, mit Zn²⁺ versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 µM) für 24 h stimuliert, dann geerntet, und letztendlich die Luciferase-Aktivität, sowie die Proteinkonzentration der Zellextrakte festgestellt. Die Luciferase wurde ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gebracht. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte +/- SD dreier unabhängiger Experimente, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (**, $P < 0,01$).

B und C: INS-1 832/13 Zellen, die das Coll.luc Reporter gen enthielten, wurden für 24 h in serumreduziertem Ca²⁺-freiem Medium inkubiert. Das Medium war entweder mit Zn²⁺ (100 µM) (**B**) oder Ca²⁺ 100 µM (**C**) versetzt. Die Zellen wurden dann für 24 h mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 µM) stimuliert. Die geernteten Zellen wurden für die Analyse vorbereitet und die Luciferase-Aktivität analysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gesetzt. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte +/- SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,01$).

3.6 Die Stimulation des Kationenkanals TRPM3 triggert die Aktivierung von AP-1

Um die erhaltenen Ergebnisse durch die Analyse der $Ca_v1.2$ -Kanäle zu bestätigen, wurde ein weiterer Ca^{2+} -Kanal untersucht. Der TRPM3-Kanal ist ein nicht-selektiver Kationen-Kanal, der als relativ effizienter Ca^{2+} -Kanal fungiert [46,59]. Wie in der Einleitung beschrieben, ist der molekulare Aufbau des TRPM3-Kanals und $Ca_v1.2$ -Kanals sehr unterschiedlich. TRPM3-Kanäle können durch das Steroid Pregnenolonsulfat aktiviert werden. INS-1 Insulinomazellen exprimieren TRPM3-Kanäle [39]. Die Stimulation der Insulinomazellen mit Pregnenolonsulfat involviert jedoch sowohl TRPM3-Kanäle, als auch L-Typ spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle [39,58]. Dies macht es schwierig, den jeweiligen Einfluss der Kanäle bezüglich der Stimulation zu differenzieren. In T-REx-TRPM3-Zellen ist der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen als Folge der Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat unabhängig von den L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen [33,65]. Um die Beeinflussung der Signaltransduktion durch Stimulation der L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle zu vermeiden, wurde das HEK293 Expressionssystem benutzt. Die T-REx TRPM3 Zelllinie ist eine genetisch veränderte Zelllinie, bei der die Expression von TRPM3 durch Tetrazyklin induziert wird. Abbildung 16 zeigt, dass die Stimulation der Zellen mit Pregnenolonsulfat zu einer AP-1 Aktivierung führt. Die Aktivierung von AP-1 in T-REx-TRPM3 Zellen durch Pregnenolonsulfat erfordert den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle und einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [28].

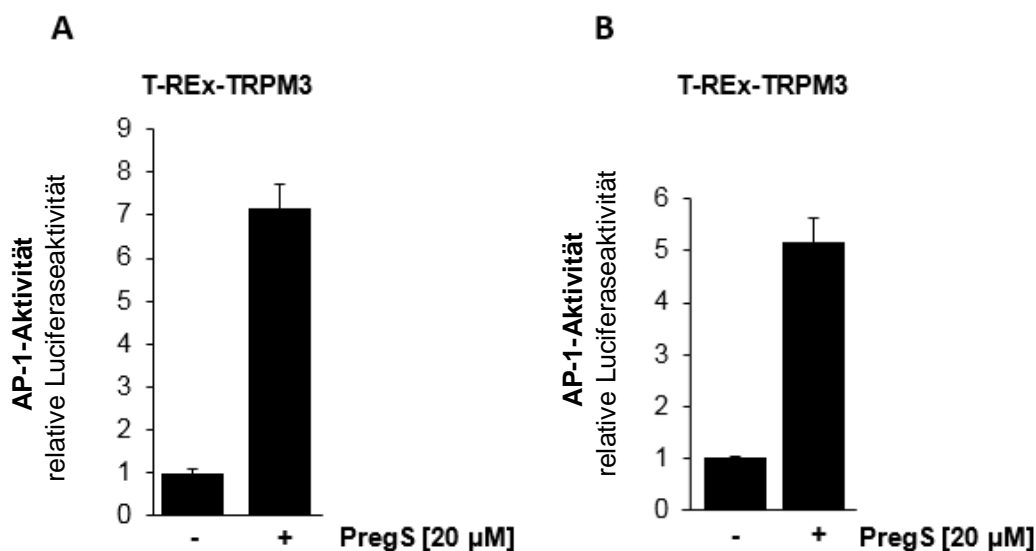


Abbildung 16: Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat

HEK293 Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthalten (T-REx-TRPM3 Zellen), wurden mit einem Coll.luc Reportergen enthaltenden Lentivirus infiziert. Anschließend wurden die Zellen in serumreduziertem DMEM Medium für 24 h inkubiert und dann für weitere 24 h in serumreduziertem Medium mit Pregnenolonsulfat (20 µM) stimuliert. Die geernteten Zellen wurden für die Analyse vorbereitet und die Luciferase-Aktivität analysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gesetzt. Die gezeigten Abbildungen A und B zeigen zwei voneinander unabhängige Experimente, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden.

3.7 Die zelluläre Toxizität von Zn^{2+} -Konzentrationen auf T-REx-TRPM3 Zellen

Als Voraussetzung dafür, dass der Effekt der Zn^{2+} -Ionen auf die TRPM3-induzierte Gentranskription untersucht werden konnte, musste die Toxizität von extrazellulärem Zink im Kulturmedium bestimmt werden. Die T-REx-TRPM3-Zellen wurden für 24 h in serumreduziertem Medium, versetzt mit Tetrazyklin, kultiviert. Danach wurden die Zellen für weitere 24 h in serumreduziertem Medium mit Tetrazyklin und verschiedenen $ZnCl_2$ -Konzentrationen kultiviert. T-REx-TRPM3 Zellen tolerierten eine Konzentration von bis zu 100 μM Zn^{2+} -Ionen gut. Bei einer Konzentration von 150 μM konnte man bereits die Ablösung einiger Zellen von der Zellkulturschale beobachten. Bei einer Konzentration von 200 μM $ZnCl_2$ hafteten kaum noch Zellen am Boden der Schale (Abbildung 17C). Der MTT-Assay zeigte, dass sich die Stoffwechselaktivität der Zellen in Anwesenheit von 75 μM Zn^{2+} nicht veränderte, sich jedoch bei einer Konzentration von 100 μM Zn^{2+} eine kleine Reduktion dieser abzeichnete. Beim Hinzufügen von 150 μM Zn^{2+} wurde der Metabolismus der T-Rex-TRPM3 Zellen stark eingeschränkt (Abbildung 17D). Diese beiden Assays zusammengenommen, zeigen, dass T-Rex-TRPM3 Zellen empfindlicher auf die Zugabe von extrazellulärem Zink reagierten, als dies bei den INS-1 832/13 Zellen der Fall war. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten, in denen die Rolle von Zn^{2+} -Ionen in Bezug auf die, durch den TRPM3-Kanal induzierte Gentranskription untersucht wurde, eine Konzentration von 75 μM Zn^{2+} gewählt.

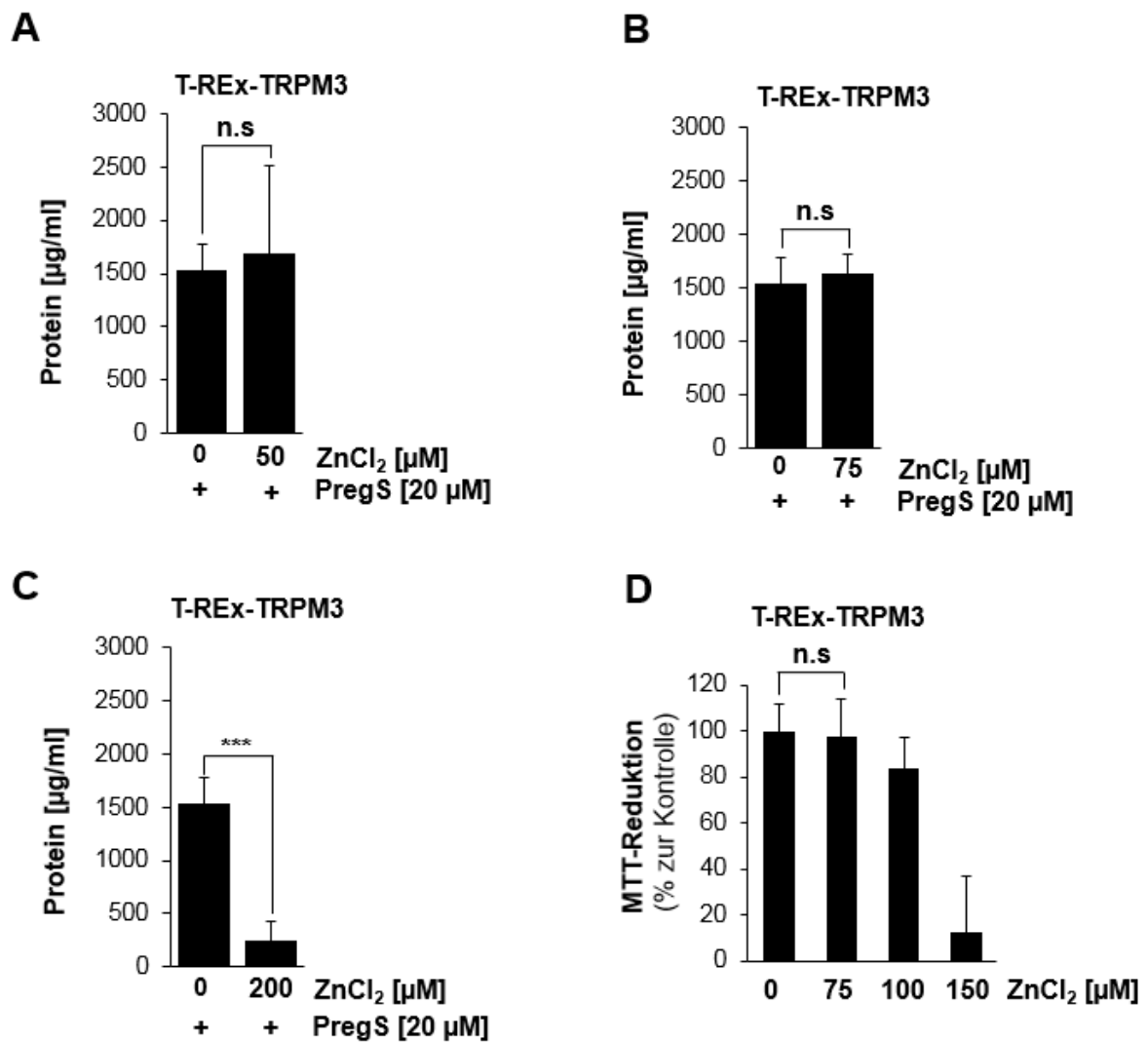


Abbildung 17: Die Toxizität von extrazellulärem Zn²⁺ auf T-REx-TRPM3 Zellen

A-C: T-REx-TRPM3 Zellen wurden für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten. Anschließend wurden sie für weitere 24 h in serumreduziertem Medium gehalten, welches mit 50 (**A**), 75 (**B**) oder 200 μM Zn²⁺ (**C**) versetzt wurde. Zellextrakte wurden vorbereitet und die Proteinkonzentration gemessen. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten in jeweils vierfacher Ausführung (***, $P < 0,001$; n.s., nicht signifikant). **D:** Die enzymatische Reduktion von MTT zu Formazan wurde, wie bei Abbildung 14B beschrieben, durchgeführt, mit dem Unterschied, dass 5000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Die Werte sind die Mittelwerte \pm SEM von je vier Wells aus drei unabhängigen Experimenten (n.s., nicht signifikant). Die MTT-Assays wurden zusammen mit Tobias M. Backes durchgeführt.

3.8 Zn²⁺-Ionen hemmen die Aktivierung von AP-1 nach der Stimulation von TRPM3-Kanälen

Es wurde beschrieben, dass Zn²⁺-Ionen durch TRPM3-Kanäle in die Zellen gelangen [66]. In diesen Experimenten wurde jedoch mit einer hoch toxischen Konzentration von Zn²⁺ (10 mM) gearbeitet. In dem nachfolgend beschriebenen Experiment wurde untersucht, ob eine Konzentration von 75 µM Zn²⁺ einen Einfluss auf die Aktivierung des AP-1 durch die mit Pregnenolonsulfat stimulierten TRPM3-Kanäle hat. Hierbei wurden die T-REx-TRPM3 Zellen mit einem Luciferase codierendem Lentivirus infiziert. Die Luciferase stand unter der Kontrolle des Kollagenase Promotors (Coll.luc). Die Zellen wurden wieder in serumreduziertes Medium, das 1.8 mM Ca²⁺, sowie Tetrazyklin enthielt, gehalten. Außerdem wurde 75 µM Zn²⁺ hinzugefügt und die Zellen mit Pregnenolonsulfat in An- oder Abwesenheit von Zn²⁺-Ionen stimuliert. Abbildung 18A zeigt, dass die Aktivität von AP-1 in T-REx-TRPM3-Zellen, hervorgerufen durch die Stimulation der TRPM3-Kanäle mit Pregnenolonsulfat, durch den Zusatz von Zn²⁺ signifikant reduziert wurde.

Um festzustellen, ob Zn²⁺ Ca²⁺-Ionen in diesem Zellsystem ersetzen kann, wurden Zellen in Ca²⁺-freiem Medium kultiviert, und anschließend Zn²⁺ in der Konzentration von 75 µM und der Stimulator Pregnenolonsulfat hinzugefügt. Die Abbildung 18B zeigt, dass Zn²⁺-Ionen Ca²⁺-Ionen bezüglich der Aktivierung von AP-1 nicht ersetzen konnten. Um dieses Ergebnis besser bewerten zu können, wurde in einer Kontrolle Ca²⁺ anstelle von Zn²⁺ in der gleichen Konzentration zum Ca²⁺-freiem Medium hinzugefügt und die durch Pregnenolonsulfat induzierte Aktivierung von AP-1 gemessen. Die Abbildung 18C zeigt, dass die Ca²⁺-Konzentration von 75 µM nicht ausreichte, um eine zu messende AP-1 Aktivität durch, mit Pregnenolonsulfat stimulierte T-REx-TRPM3-Kanäle, auszulösen. Ein Hinzufügen der physiologischen Konzentration von 1,8 mM Ca²⁺ in das Ca²⁺-freie Medium stellte die Fähigkeit der Zellen eine Gentranskription, durch die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat, zu aktivieren, wieder vollständig her (Abbildung 18D).

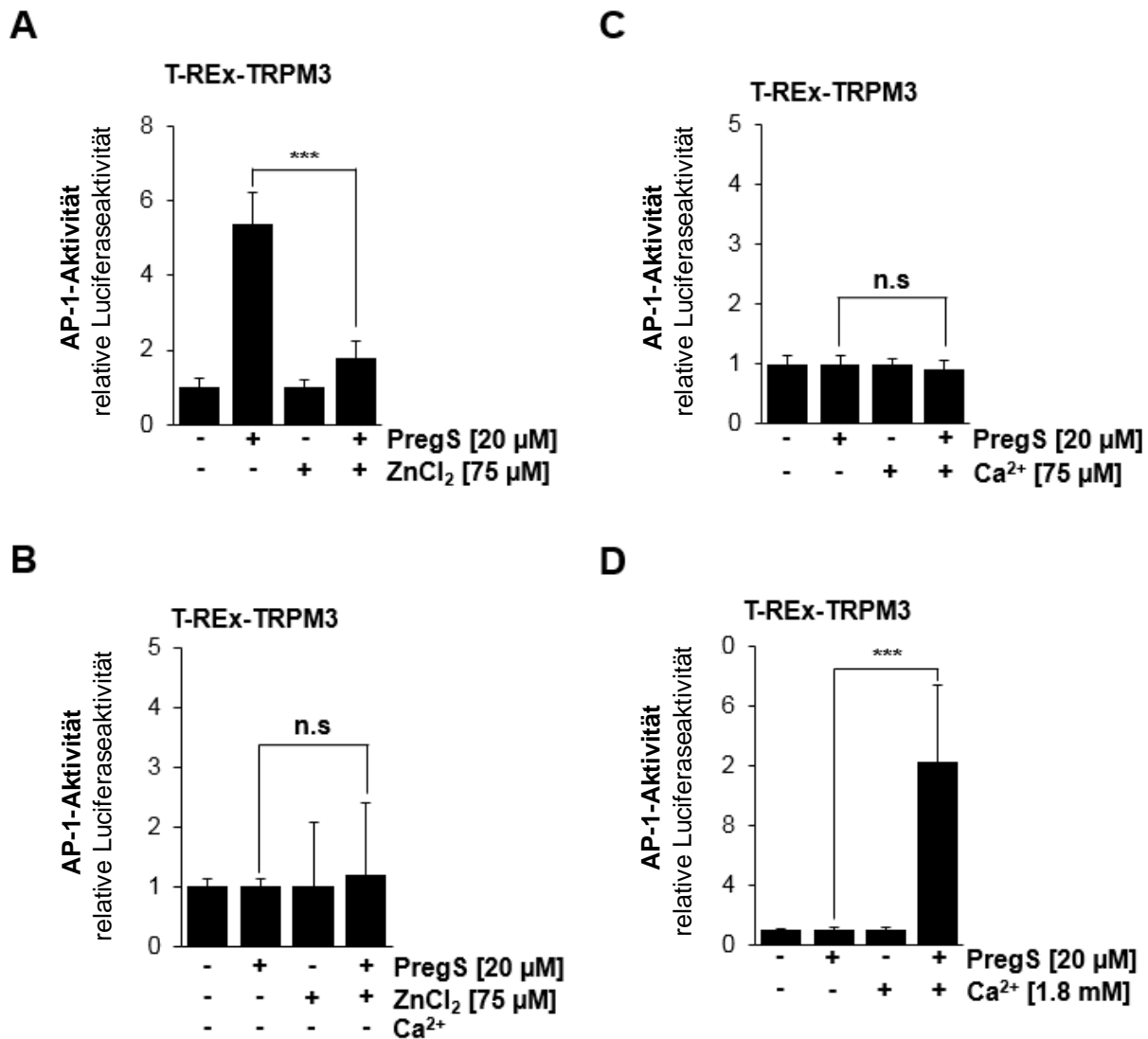


Abbildung 18: Zn²⁺-Ionen blockieren die durch die Stimulation der TRPM3-Kanäle hervorgerufene Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors

A: T-Rex-TRPM3 Zellen, welche das Coll.luc Reporter gen enthielten, wurden für 24 h in serumreduziertem Medium gehalten, welches 1,8 mM Ca²⁺ und Tetracyclin (1 µg ml⁻¹) enthielt. Anschließend wurde zusätzlich Zn²⁺ (75 µM) dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden für 24 h mit Pregnenolonsulfat (20 µM), in Anwesenheit von Tetracyclin, stimuliert. Wie im Diagramm ersichtlich, geschah dies in An- oder Abwesenheit von Zn²⁺. Die Zellen wurden geerntet und die Proteinkonzentration, sowie die Luciferase-Aktivität bestimmt, und ins Verhältnis gesetzt. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte +/- SD von vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$). **B:** T-Rex-TRPM3 Zellen, welche das Coll.luc Reporter gen enthielten, wurden für 24 h in serumreduziertem Ca²⁺-freiem Medium gehalten, zu dem ebenfalls Tetracyclin (1 µg ml⁻¹) hinzugefügt wurde. Danach wurde das Medium zusätzlich mit Zn²⁺ (75 µM) versehen. Die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat (20 µM) stimuliert, jeweils in Anwesenheit von Tetracyclin und in An- oder Abwesenheit von Zn²⁺ (75 µM). **C und D:** T-Rex-TRPM3 Zellen, die das Coll.luc Reporter gen enthielten, wurden in serumreduziertem Ca²⁺-freiem Medium mit Tetracyclin (1 µg ml⁻¹) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der An- oder Abwesenheit von Ca²⁺ (75 µM oder 1,8 mM) im Medium kultiviert. Die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat (20 µM) in Anwesenheit von Tetracyclin und in An- oder Abwesenheit von Ca²⁺ (75 µM oder 1,8 mM) für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und für die Analyse vorbereitet. Die Luciferase wurde gemessen und ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gebracht. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte +/- SD dreier, voneinander unabhängiger Experimente, jeweils in vierfacher Ausführung (***, $P < 0,001$, n.s., nicht signifikant).

4. Diskussion

Zink ist ein notwendiger Kofaktor für viele Proteine, indem es enzymatische und strukturelle Funktionen erfüllt. Um die genannten Funktionen ausführen zu können, müssen die Zn^{2+} -Ionen in die Zelle transportiert werden. Die Tatsache, dass es 24 Proteine gibt, die den Einstrom und den Ausstrom von Zn^{2+} regulieren, unterstreicht die Wichtigkeit eines ausreichenden Vorrats von Zn^{2+} für die Zellen [36]. Zn^{2+} Mangel könnte in der Pathogenese von Krankheiten beteiligt sein [8,37,54].

4.1 Toxizität von Zn^{2+} -Ionen

Höhere Konzentrationen von Zn^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium sind zytotoxisch. Bisher wurde Zn^{2+} als „bona fide“ zytotoxisches Ion beschrieben [34]. Um dies genauer zu untersuchen, wurde für diese Doktorarbeit die Toxizität von Zn^{2+} in Zellkulturmedium gemessen. Aufgrund der Ergebnisse wurde entschieden, die Versuche mit 100 μM Zn^{2+} bei den INS-1 832/13 Zellen und 75 μM bei den T-REx-Zellen zu benutzen. Bei den INS-1 832/13 Zellen führte die Konzentration von 100 μM Zn^{2+} nicht zum Ablösen der Zellen von ihrem Untergrund, jedoch wurde die metabolische Aktivität der Zellen dadurch schon um etwa 30 % verringert. Andere Arbeitsgruppen benutzten diese Zn^{2+} -Konzentration [9,10,12,22,48]. Deshalb ermöglicht die Verwendung einer Konzentration von 100 μM Zn^{2+} einen direkten Vergleich der hier beschriebenen Experimente mit bereits vorher veröffentlichten Arbeiten anderer Forschungsgruppen. Eine Konzentration von 100 μM Zn^{2+} wurde auch im Medium von Moosfasern im Hypocampus nach der Exozytose gemessen [63]. Außerdem wurde beschrieben, dass eine Konzentration von 100 μM Zn^{2+} den Zn^{2+} -sensitiven Rezeptor GPR39 stimuliert [4]. GPR39 aktiviert den Inositoltriphosphat Signalweg und führt zur Freisetzung von Calcium. Allerdings ist nicht klar, ob Zink ein Agonist oder ein Modulator an diesem Rezeptor ist [36]. Dieselbe Konzentration wurde angewandt, um Methallothioprotein Promotor-basierte Expressionsvektoren zu stimulieren [21].

T-REx-TRPM3 Zellen reagieren sensibler auf extrazelluläres Zink als INS-1 832/13 Zellen. Deshalb wurde für die Experimente mit diesen Zellen eine Konzentration von 75 Zn^{2+} benutzt. Natürlicherweise sind höhere Zinkkonzentrationen, sogar im millimolaren Bereich für diese Zellen toxisch, sodass die Ergebnisse von Experimenten mit höheren Konzentrationen mehr als fragwürdig erscheinen [66].

4.2 Einstrom von Zn^{2+} -Ionen in die Zellen

Zn^{2+} -Ionen können entweder mithilfe spezifischer Transportproteine oder über Ca^{2+} -Kanäle in die Zellen gelangen. Es gibt 14 Transporter Proteine (ZIPs), die am Transport von Zn^{2+} in die Zellen beteiligt sind. L-Typ spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle wurden als verantwortlich für einen stabilen Einstrom von Zn^{2+} in Insulinomazellen beschrieben [10,12,49]. Dementsprechend wurde auch beschrieben, dass TRPM3-Kanäle sehr durchlässig für Zn^{2+} -Ionen seien, basierend auf fluorometrischen Messungen. Diese Schlussfolgerung wurde jedoch aus einem Experiment gezogen, in dem mit hochtoxischen Zinkkonzentrationen (1 - 10 mM) gearbeitet wurde [66]. Außerdem wurde die Spezifität und Sensitivität von fluoreszierenden Farbstoffen und Sonden für die Messung von „freien“ intrazellulären Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen in Frage gestellt [6,35].

4.3 Extrazelluläre Zn^{2+} -Ionen inhibieren intrazelluläre Signalkaskaden

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Zn^{2+} -Ionen in der Regulierung von Gentranskription durch die Stimulation von L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und TRPM3-Kanälen zu untersuchen. Die Stimulation dieser beiden Kanäle führt zur Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors. Die Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung der extrazellulären Zinkkonzentration die Signaltransduktion, hervorgerufen durch die Stimulation von L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen oder TRPM3-Kanälen, inhibiert. Ich denke nicht, dass Zn^{2+} -Ionen mit Ca^{2+} -Ionen um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, geschuldet der Tatsache, dass die Konzentration von Zn^{2+} -Ionen im Vergleich zur Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Zytosol 100-1000-fach kleiner ist. Eher ist es so, dass Zn^{2+} -Ionen an intrazelluläre Signalmoleküle binden und über diesen Mechanismus die intrazelluläre Signalkaskade von Ca^{2+} verändern. Zum Beispiel modulieren Zn^{2+} -Ionen die Insulin- und Leptinkommunikation, indem sie die Proteintyrosinphosphatase 1B mit einer Affinität im pico- bis nanomolarem Bereich hemmen. Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) sind Schlüsselenzyme in der Zellregulation. PTP1B KO und heterozygote Mäuse zeigten eine Reduktion der Gewichtszunahme und Insulinresistenz im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps. Die 107 humanen PTPs werden durch Redoxreaktionen, Phosphorylierung, Dimerisierung und Proteolyse reguliert [1].

4.4 Überlegungen zum mechanistischen Wirkprinzip der hemmenden Aktivität von Zn^{2+} -Ionen

Es gibt verschiedene vorstellbare Möglichkeiten bezüglich der Hemmung der Ca^{2+} -Kanal induzierten Kommunikation durch Zn^{2+} . Es könnte sein, dass Zn^{2+} -Ionen $Ca_v1.2$ und TRPM3-

Kanäle direkt inhibieren, so wie es bei den NMDA-Rezeptoren der Fall ist. Tatsächlich wurde eine Punktmutation in der NR2A Untereinheit (L812M) gefunden, die die Hemmung der Rezeptoren durch Zink verhindert [72]. Bezüglich kortikaler Neurone wurde gezeigt, dass Zn^{2+} -Ionen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen eindringen können, aber dass sich die Konzentration von Ca^{2+} -Ionen in diesem Fall reduzieren kann [24]. Bei den Neuronen des Bulbus olfactorius wurde festgestellt, dass eine extrazelluläre Konzentration von $100 \mu M Zn^{2+}$ den Fluss durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle hemmt [19]. Es wurde auch gezeigt, dass Zn^{2+} -Ionen den Ca^{2+} -Einstrom durch speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (SOC) hemmen [10]. Die Hypothese, dass Zn^{2+} -Ionen den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen reduzieren, mag wahr sein für TRPM3-Kanäle, nicht aber für $Ca_v1.2$ -Kanäle, welche nur eine geringe Konzentration von Ca^{2+} benötigen, um eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Unterstützend zu dieser Beobachtung wurde gezeigt, dass eine starke Reduktion des Ca^{2+} Einstroms die Kommunikation zwischen Kanal und Zellkern nur marginal beeinflusste. Dem gegenüberstehend ist ein Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in Neuronen absolut notwendig, um eine CREB-Phosphorylierung auszulösen [70]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, dass sich die physiologisch aktive „freie“ Zn^{2+} -Konzentration wahrscheinlich im picomolaren Bereich befindet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bereits ein geringer Einstrom von Zn^{2+} durch ZIP-Transporter oder Ca^{2+} -Kanäle ausreichend sein könnte, um physiologische Effekte hervorrufen zu können.

Die intrazellulären Angriffspunkte von Zink sind noch nicht ausreichend erforscht [36]. Beispielsweise wurde die Aktivität der Proteintyrosinphosphatase 1B als ein intrazelluläres Ziel für die Modulation durch Zn^{2+} identifiziert. Sie ist beteiligt bei Insulin- und Leptininduzierten Signalkaskaden [1]. Intrazelluläre Moleküle, die für die durch Ca^{2+} -Kanäle ausgelöste Signalkaskade zum Zellkern benötigt werden, könnten ein Angriffspunkt von Zn^{2+} -Ionen darstellen. Beispiele für Kandidaten dieser Angriffspunkte sind die Proteinkinasen, wie die Proteinkinase C (PKC) oder Raf. Die Proteinkinase C (PKC) ist ein häufiger Punkt des Zusammenflusses verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. Auch intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Spiegel könnten Ca^{2+} -abhängige Isoformen der PKC aktivieren. Die Rolle der PKC in der $Ca_v1.2$ und TRPM3- induzierten Signaltransduktion ist noch nicht vollständig geklärt, doch zeigte sich, dass die Inkubation der Zellen mit dem PKC- Inhibitor Bisindolylmaleimid III (BisIII) die zelluläre AP-1 Aktivität in mit KCl/FPL stimulierten INS-1 832/13 Zellen über 70 % reduzierte. Auch in mit Pregnenolonsulfat stimulierten HEK293 Zellen, die den TRPM3-Kanal exprimierten und mit BisIII behandelt wurden, fiel die Aktivierung der AP-1regulierten Gentranskription beinahe vollständig aus. Bei Inkubation von HEK293 Zellen mit Tetradeconylphorbolacetat (TPA), welches ein starker Aktivator der PKC Isoenzyme ist, zeigte sich eine hohe Aktivierung der AP-1. In der Anwesenheit von Zn^{2+} reduzierte sich die AP-1 Aktivität um über 90 % in TPA behandelten Zellen [30].

Eine erhöhte Konzentration von Zn^{2+} -Ionen im Kulturmedium beeinträchtigt somit die durch PKC- induzierte Signalweiterleitung zum Zellkern. Daraus lässt sich ableiten, dass PKC ein intrazelluläres Ziel für Zn^{2+} -Ionen bilden könnte. Um die von uns aufgestellte Hypothese – dass PKC ein Ziel von Zn^{2+} -Ionen in der intrazellulären Kommunikation ist - zu unterstützen, sind jedoch eine detaillierte Analyse der verschiedenen PKC-Isoformen, Experimente mit Überexpression dieser verschiedenen Isoformen und in vitro PKC-Aktivitätsassays in Gegenwart und Abwesenheit von Zn^{2+} -Ionen notwendig.

4.5 Haben Zn^{2+} -Ionen eine Funktion in der negativen Rückkopplungsschleife bei Stimulus-induzierter Exozytose?

Sekretorische Zellen, also Neurone, pankreatische β -Zellen, Brustdrüsenepithelzellen sowie Prostataepithelzellen miteingeschlossen, setzen bei der Exozytose Zn^{2+} -Ionen frei. In Neuronen ist Zn^{2+} konzentriert in Vesikeln und wird bei Aktivität der Neurone freigesetzt. In pankreatischen β -Zellen bilden die Zn^{2+} -Ionen einen Komplex mit Insulin in den sekretorischen Granula und werden, zusammen mit Insulin, bei der Exozytose freigesetzt. Der Einfluss von Zink auf die Erregbarkeit von Zellen und Ionenleitfähigkeit wurde bei RINm5F Insulinomazellen mit der Patch-Clamp-Technik gemessen [2]. Es wurde festgestellt, dass eine extrazelluläre Konzentration von 10-20 μM Zn^{2+} reversibel das durch Ca^{2+} -Ströme hervorgerufene Aktionspotential aufhob und zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials führte. Die durch Zn^{2+} hervorgerufene Hyperpolarisation wurde durch einen dosisabhängigen Anstieg von einer spannungsunabhängigen K^+ - Leitfähigkeit hervorgerufen, welche pharmakologisch als ATP-sensitive Leitfähigkeit identifiziert wurde. Damit wurde die Hypothese unterstützt, dass Zn^{2+} an eine K_{ATP} Proteinuntereinheit bindet und die Kanäle somit aktiviert. So könnten Zinkionen das Ruhemembranpotential regulieren und die Erregbarkeit der Zellen erniedrigen. Es wurde schon damals vorgeschlagen, dass Zn^{2+} die Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas durch eine negative Rückkopplungsschleife beeinflusst, welche sowohl K_{ATP} als auch spannungsabhängige Kanäle beinhaltet.

Sowohl Neurone, als auch pankreatische β -Zellen benötigen Ca^{2+} -Kanäle für die Aktivierung der Exozytose. Ich postuliere, dass die freigesetzten Zn^{2+} -Ionen als negative Rückkopplungsschleife bei der Stimulus-induzierten Exozytose dienen, indem sie die durch Ca^{2+} -Kanäle hervorgerufene Signalkaskade inhibieren. Zn^{2+} -Ionen könnten auch einen autokrinen Effekt auf pankreatische β -Zellen ausüben, indem sie den, durch den $Ca_v1.2$ Ca^{2+} -Kanal hervorgerufenen Signalweg inhibieren. Zusätzlich könnte Zn^{2+} auch einen parakrinen Effekt auf pankreatische α -Zellen haben und somit die Glucagonsekretion hemmen [73]. Es ist auch möglich, dass das Versiegen der Zn^{2+} -Sekretion während der Hypoglykämie als Signal

zur Stimulation der Glucagonsekretion der α -Zellen fungiert [50]. In Neuronen könnten Zn^{2+} -Ionen als Bremse in der durch den NMDA-Rezeptor hervorgerufenen Signalisierung bilden [40].

4.6 Zn^{2+} und Diabetes

Diabetes Mellitus ist eine weit verbreitete Stoffwechselerkrankung, von der etwas 9 % der erwachsenen Weltbevölkerung betroffen sind [3]. Die Krankheit wird über einen erhöhten Blutzuckerspiegel über eine anhaltende Zeit diagnostiziert und führt zu zahlreichen Langzeitschäden, vor allem mikrovaskuläre Komplikationen der Augen, peripheren Nerven und Nieren [31]. Diabetes Mellitus Typ 1 (DMT1) hat seine Genese in der autoimmunen Zerstörung der insulinsekretierenden β -Zellen des Pankreas [3]. Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) ist durch periphere Insulinresistenz und der Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen charakterisiert. Einer der größten Risikofaktoren, einen DMT2 zu entwickeln, stellt das Übergewicht dar. Eine Dysregulation des Zinkgehaltes im Körper ist für beide Krankheitsentitäten bekannt [8].

Scott und Fisher (1938) waren die Ersten, welche Zink in den Zusammenhang mit Diabetes brachten. Bei einer Autopsie von 18 diabetischen und 14 gesunden Pankreaten stellten sie eine durchschnittlichen Zinkgehalt von nur $\frac{1}{4}$ bei den Bauchspeicheldrüsen Erkrankter im Vergleich zu denen Gesunder fest [53]. Da β -Zellen sehr viel ATP synthetisieren, macht es sie auch anfällig für oxidativen Stress, was einen Zellschaden verursachen kann. Zink wird für eine Vielzahl antioxidativer Enzyme benötigt. Somit kann ein Zinkmangel zu weiterem Schaden der β -Zellen des Pankreas führen [8]. Eine prospektive Kohortenstudie aus den USA mit 82 000 Frauen ergab, dass Frauen mit einer geringen Aufnahme von Zink ein 17 % erhöhtes Diabetesrisiko, im Vergleich zu Frauen mit ausreichender Zinkaufnahme hatten [55].

Es wurde ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Varianten des SLC30A8-Gens, welches für den ZnT8 kodiert, und einem erhöhten Risiko, DMT2 zu entwickeln, festgestellt. Dieser Transporter bringt Zink ins Zytoplasma der Zelle. In einer Studie mit Knockout Mäusen, die einer SLC30A8 Deletion wurde eine erhöhte Insulinsekretion der β -Zellen, jedoch ein erniedrigter peripherer Insulinblutspiegel festgestellt. Auch wurde herausgefunden, dass, wenn Zink gemeinsam mit Insulin ausgeschüttet wird, die hepatische Insulinclearance unterdrückt wird [56].

5. Literaturverzeichnis

1. Bellomo E, Massarotti A, Hogstrand C, Maret W (2014). Zinc ions modulate protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Metallomics* 6:1229-1239.
2. Bloc A, Cens T, Cruz H, Dunant Y (2000). Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells: Activation of ATP-sensitive K^+ channels. *J Physiol* 529:723-734.
3. Chabosseau P, Rutter GA (2016). Zinc and diabetes. *Arch Biochem Biophys* 611:79-85.
4. Cohen L, Sekler I, Hershinkel M (2014). The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, controls proliferation and differentiation of colonocytes and thereby tight junction formation in the colon. *Cell Death Dis* 5:e1307.
5. Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel- calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294:333-339.
6. Figueroa JAL, Vignesh KS, Deepe GS, Caruso J (2014). Selectivity and specificity of small molecule fluorescent dyes/probes used for the detection of Zn^{2+} and Ca^{2+} in cells. *Metallomics* 6:301-315.
7. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T (2011). Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J Biol Inorg Chem* 16:1123-1134.
8. Fukunaka A, Fujitani Y (2018). Role of zinc homeostasis in the pathogenesis of diabetes and obesity. *Int J Mol Sci* 19:476.
9. Gibon J, Tu P, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2011). The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochim Biophys Acta* 1808:2807-2818.
10. Gore A, Moran A, Hershinkel M, Sekler I (2004). Inhibitory Mechanism of Store-operated Ca^{2+} Channels by Zinc. *J Biol Chem* 279:11106-11111.
11. Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Hellson JR, Delsseroth K, Tsien RW, Crabtree GR (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401:703-708.
12. Gyulkhandanyan A V., Lee SC, Bikopoulos G, Dai F, Wheeler MB (2006). The Zn^{2+} -transporting pathways in pancreatic β -cells: A role for the L-type voltage-gated Ca^{2+} channel. *J Biol Chem* 281:9361-9372.
13. Hara T, Takeda T aki, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T (2017). Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 67:283-301.
14. Hardyman JEJ, Tyson J, Jackson KA, Aldridge C, Cockell SJ, Wakeling LA, Valentine RA, Ford D (2016). Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1). controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics* 8:337-343.
15. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. vollständig überarbeitete Auflage. Springer Berlin Heidelberg.
16. Held K, Kichko T, De Clercq K, Klaassen H, Van Bree R, Vanherck JC, Marchand A, Reeh PW, Chaltin P, Voets T, Vriens J (2015). Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1363-E1372.

17. Hillen W, Berens C (2002). Tetracyclin-gesteuerte Genregulation : Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *BIOspektrum* 4:355-358.
18. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424-430.
19. Horning MS, Trombley PQ (2001). Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. *J Neurophysiol* 86:1652-1660.
20. Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A (2009). Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* 5:183-190.
21. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-94.
22. Inoue K, Branigan D, Xiong ZG (2010). Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem* 285:7430-7439.
23. Keim A, Müller I, Thiel G (2012). Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J Neurosci Methods* 206:138-142.
24. Kerchner GA, Canzoniero LMT, Yu SP, Ling C, Choi DW (2000). Zn²⁺ current is mediated by voltage-gated Ca²⁺ channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurones. *J Physiol* 528:39-52.
25. Langfermann DS, Rössler OG, Thiel G (2018). Stimulation of B-Raf increases c-Jun and c-Fos expression and upregulates AP-1-regulated gene transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 472:126-139.
26. Langfermann DS, Schmidt T, Rössler OG, Thiel G (2019). Calcineurin controls gene transcription following stimulation of a Gαq-coupled designer receptor. *Exp Cell Res* 383:111553.
27. Lesch A, Rubil S, Thiel G (2014). Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol* 171:2645-2658.
28. Lesch A, Hui X, Lipp P, Thiel G (2015). Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Mol Pharmacol* 87:617-628.
29. Lesch AC (2018). Signalverarbeitung auf der zellulären und molekularen Ebene: Pankreatische β-Zellen und TRPM3-Kanalproteine. *Naturwissenschaftliche Fakultät III der Universität des Saarlandes*.
30. Loviscach L, Backes TM, Langfermann DS, Ulrich M, Thiel G (2020). Zn²⁺ions inhibit gene transcription following stimulation of the Ca²⁺channels Cav1.2 and TRPM3. *Metallomics* 12:1735-1747.
31. Luppi P, Cifarelli V, Wahren J (2011). C-peptide and long-term complications of diabetes. *Pediatr Diabetes* 12:276-292.
32. Luthman H, Magnusson G (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res* 11:1295-1308.
33. Majeed Y, Agarwal AK, Naylor J, Seymour VAL, Jiang S, Muraki K, Fishwick CWG, Beech DJ (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *Br J Pharmacol* 161:430-441.
34. Manna PT, Munsey TS, Abuarab N, Li F, Asipu A, Howell G, Sedo A, Yang W, Naylor J, Beech DJ, Jiang LH, Sivaprasadarao A (2015). TRPM2-mediated intracellular Zn²⁺

- release triggers pancreatic β -cell death. *Biochem J* 466:537-546.
35. Maret W (2015). Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics* 7:202-211.
 36. Maret W (2017). Zinc in cellular regulation: The nature and significance of “zinc signals.” *Int J Mol Sci* 18:2285.
 37. Maret W (2017). Zinc in pancreatic islet biology, insulin sensitivity, and diabetes. *Prev Nutr Food Sci* 22:1-8.
 38. Maverakis E, Lynch PJ, Fazel N (2007). Acrodermatitis enteropathica. *Dermatol Online J* 13:11.
 39. Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: Activation of EGR-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, erk, and ternary complex factors. *J Biol Chem* 286:10084-10096.
 40. Molnár P, Nadler JV (2001). Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Res* 910:205-207.
 41. Müller I, Endo T, Thiel G (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* 110:1481-1494.
 42. Müller I (2011). Regulation der Genexpression in Insulinomazellen und β -Zellen des Pankreas. Naturwissenschaftliche Fakultät III der Universität des Saarlandes.
 43. Müller I, Lipp P, Thiel G (2012). Ca^{2+} signaling and gene transcription in glucose-stimulated insulinoma cells. *Cell Calcium* 52:137-151.
 44. Naylor J, Li J, Milligan CJ, Zeng F, Sukumar P, Hou B, Sedo A, Yuldasheva N, Majeed Y, Beri D, Jiang S, Seymour VAL, McKeown L, Kumar B, Harteneck C, O'Regan D, Wheatcroft SB, Kearney MT, Jones C, Porter KE, Beech DJ (2010). Pregnenolone sulphate-and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ Res* 106:1507-1515.
 45. Nettleship JE, Watson PJ, Rahman-Huq N, Fairall L, Posner MG, Upadhyay A, Reddivari Y, Chamberlain JMG, Kolstoe SE, Bagby S, Schwabe JWR, Owens RJ (2015). Transient expression in HEK 293 cells: An alternative to *E. coli* for the production of secreted and intracellular mammalian proteins. *Methods Mol Biol* 1258:209-222.
 46. Nilius B, Flockerzi V (2014). What do we really know and what do we need to know: Some controversies, perspectives, and surprises. *Handb Exp Pharmacol* 223:1239–1280
 47. Nitert MD, Nagorny CLF, Wendt A, Eliasson L, Mulder H (2008). Cav1.2 rather than Cav1.3 is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. *J Mol Endocrinol* 41:1-11.
 48. Noh J, Chung JM (2019). Modulation of dopaminergic neuronal excitability by zinc through the regulation of calcium-related channels. *Exp Neurobiol* 28:578-592.
 49. Priel T, Hershinkel M (2006). Zinc influx and physiological consequences in the β -insulinoma cell line, Min6. *Biochem Biophys Res Commun* 346:205-212.
 50. Robertson RP, Zhou H, Slucca M (2011). A role for zinc in pancreatic islet β -cell cross-talk with the α -cell during hypoglycaemia. *Diabetes, Obes Metab* 13:106-111.
 51. Schmidt T (2020). Die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin reguliert die Genexpression nach Stimulation eines G α q-gekoppelten Designerrezeptors in HEK293-Zellen. Naturwissenschaftliche Fakultät III der Universität des Saarlandes.

52. Ściskalska M, Oldakowska M, Marek G, Milnerowicz H (2020). Changes in the activity and concentration of superoxide dismutase isoenzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD). in the blood of healthy subjects and patients with acute pancreatitis. *Antioxidants* 9:1-16.
53. Scott DA, Fisher AM (1938). THE INSULIN AND THE ZINC CONTENT OF NORMAL AND DIABETIC PANCREAS. *J Clin Invest* 17:725-728.
54. Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I (2009). Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci* 10:780-791.
55. Sun Q, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB (2009). Prospective study of zinc intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 32:629-634.
56. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi MO, Abe T, Kiyonari H, Hojyo S, Fukada T, Kawauchi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H (2013). The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* 123:4513-4524.
57. Thiel G, Rössler O (2007). Viren als Werkzeuge der Gentherapie. Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht. *Biol Unserer Zeit* 37:241-248.
58. Thiel G, Müller I, Rössler OG (2013). Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic β -cells. *J Mol Endocrinol* 50:R75-83.
59. Thiel G, Rubil S, Lesch A, Guethlein LA, Rössler OG (2017). Transient receptor potential TRPM3 channels: Pharmacology, signaling, and biological functions. *Pharmacol Res* 124:92-99.
60. Thiel G, Lesch A, Rubil S, Backes TM, Rössler OG (2018). Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP). *Channels. Int Rev Cell Mol Biol* 335:167-189.
61. Thiel G, Backes TM, Welck J, Steinhausen S, Fischer AL, Langfermann DS, Ulrich M, Wissenbach U, Rössler OG (2019). Pharmacological inhibition of TRPM8-induced gene transcription. *Biochem Pharmacol* 170:113678.
62. Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T (2018). A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 555:662-666.
63. Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000). The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26:187-196.
64. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* 70:482-494.
65. Wagner TFJ, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat Cell Biol* 10:1421-1430.
66. Wagner TFJ, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, Oberwinkler J (2010). TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 460:755-765.
67. Weick JP, Groth RD, Isaksen AL, Mermelstein PG (2003). Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J Neurosci* 23:3446-3456.

68. Weiss MA, Lawrence MC (2018). A thing of beauty: Structure and function of insulin's "aromatic triplet." *Diabetes Obes Metab* 20:51-63.
69. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8). is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17040-17045.
70. Wheeler DG, Barrett CF, Groth RD, Safa P, Tsien RW (2008). CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation - transcription coupling. *J Cell Biol* 183:849-863.
71. Wikimedia Foundation Governance Wiki contributors (2016). File:MTT test formazan.jpg. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_test_formazan.jpg.
72. Yuan H, Hansen KB, Zhang J, Mark Pierson T, Markello TC, Fajardo KVF, Holloman CM, Golas G, Adams DR, Boerkoel CF, Gahl WA, Traynelis SF (2014). Functional analysis of a de novo GRIN2A missense mutation associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Nat Commun* 5:3251.
73. Zhou H, Zhang T, Harmon JS, Bryan J, Robertson RP (2007). Zinc, not insulin, regulates the rat α -cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes* 56:1107-1112.

6. Publikation

Loviscach L, Backes TM, Langfermann DS, Ulrich M, Thiel G. (2020). Zn²⁺ ions inhibit gene transcription following stimulation of the Ca²⁺ channels Ca_v1.2 and TRPM3. *Metallomics* 12:1735-1747.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gerald Thiel bedanken, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Hilfe beim Festlegen des Themas und dafür, dass er sich immer Zeit nahm, meine Fragen zum Thema zu beantworten. Danke für die Anregungen und die Unterstützung beim Schreiben der Doktorarbeit!

Auch dem Laborteam danke ich herzlich: Maximilian Backes, der mir beigebracht hat, wie ein MTT-Assay funktioniert und mir mit seiner Hilfe immer zur Seite stand. Auch Myriam Ulrich, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und Oliver Rössler, der mir zeigte, wie man eine Statistik erstellt, danke ich vielmals! Frau Iris Dlugosch, unserer Sekretärin danke ich, dass sie mich immer über wichtige Informationen und Termine unterrichtet hat. Danke für alle Unterstützung!

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Mattias und Christine Loviscach bedanken, die mich in allem während des gesamten Studiums unterstützt und ermutigt haben, und denen ich auch immer fachliche Fragen stellen konnte.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich vielmals! Danke, dass ihr mir geholfen habt, nicht aufzugeben! Ganz besonders gilt mein Dank Andrea Meyer und meinem besten Freund Jonathan Siegel. Danke für das Durchsehen und Gegenlesen des Manuskriptes!

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.