

Aus dem Bereich der Pharmakologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Calcium-Abhängigkeit von TRPV6-Varianten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Tobias Schaffrath

geboren am 26.08.1998 in Stolberg

Tag der Promotion: 18.12.2023
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstattende: PD Dr. Ulrich Wissenbach
Univ.-Prof. Dr. med. Frank Schmitz

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Abstract.....	6
1.1	Calcium-Abhängigkeit von TRPV6-Varianten.....	6
1.2	Calcium-dependence of TRPV6-variants	8
2	Abkürzungsverzeichnis.....	10
3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	14
3.1	Abbildungsverzeichnis	14
3.1.1	Anmerkung.....	15
3.2	Tabellenverzeichnis.....	16
4	Einleitung	17
4.1	Calcium	17
4.2	Calmodulin.....	18
4.3	Ionenkanäle	18
4.3.1	Calciumkanäle	19
4.3.2	Transient receptor potential (TRP)-Kanäle.....	19
4.3.3	Aktivierung und Modulation von TRP-Kanälen.....	21
4.4	TRPV-Familie	22
4.5	TRPV6.....	23
4.5.1	Struktur.....	23
4.5.2	Lokalisation & Funktion.....	25
4.5.3	Modulation	25
4.5.4	Rolle in Pathologien	27
4.6	Fragestellung	29
5	Material und Methoden.....	30
5.1	Material	30
5.1.1	Geräte	30
5.1.2	Software	30
5.1.3	Substanzen und Medien.....	31
5.1.4	Verbrauchsmaterialien	32
5.1.5	Lösungen	32
5.2	Zellen, Kultivierung und Transfektion.....	32
5.2.1	Verwendete Zelllinien	32
5.2.2	Flp-In-Zellkulturen	33
5.2.3	Kultivierung der Zellen.....	34
5.2.4	Transiente Transfektion	34
5.2.5	AMAXA-Protokoll.....	35
5.2.6	Darstellung und Auswertung der Transfektionseffizienz	35

5.3	Messung zytosolischer Ca ²⁺ -Konzentrationen mit Hilfe des Ca ²⁺ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2	37
5.3.1	Fura-2	37
5.3.2	Fura-2-Kalibrierung	38
5.4	Fura-2-basierte zytosolische Ca ²⁺ -Messungen mittels Fluoreszenz-Spektrophotometers	39
5.4.1	Zellvorbereitung für die Calcium Imaging Experimente in der Küvette	40
5.4.2	Calcium Imaging in der Küvette	41
5.5	Spektralscan in der Küvette	44
5.6	Auswertung der Messdaten	46
5.6.1	Isolierung der TRPV6-abhängigen zytosolischen Ca ²⁺ -Signale	47
5.6.2	Abhängigkeit der zytosolischen Ca ²⁺ -Amplituden vom extrazellulären Ca ²⁺	48
5.6.3	Analyse der Kinetik der Ca ²⁺ -Signale	49
5.6.4	Auswertung des inversen Calciumprotokolls	50
5.6.5	Auswertung der Effekte pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die TRPV6-abhängigen Ca ²⁺ -Signale	51
5.7	Statistik	51
6	Ergebnisse	52
6.1	Etablierung des Fluoreszenz-Spektrophotometers FL6500 von Perkin Elmer	52
6.1.1	Optimierung der Signalerfassung	52
6.1.2	Küvetten-Varianten	53
6.1.3	Optimierung der Fura-2-Beladung	55
6.1.4	Zellzahl	56
6.1.5	Vorversuche	56
6.2	Extrazelluläre Ca ²⁺ -Abhängigkeit von TRPV6	59
6.2.1	Transiente Expression von TRPV6	59
6.2.2	Stabil TRPV6-exprimierende Zelllinien	64
6.2.3	Calciumkinetik beim „inversen Protokoll“	72
6.3	Rolle von Calmodulin in Bezug auf die TRPV6-Funktion	73
6.4	Rolle der Protein Kinase C in Bezug auf die TRPV6-Funktion	80
6.5	Effekt von Hexylresorcinol	85
6.6	Einfluss von TRPV6-Modulatoren nach Vorinkubation	87
6.7	Funktionelle Untersuchung eines TRPV6-ähnlichen Proteins aus dem Proteobakterium	89
6.8	Fura-2-Kalibration	90
7	Diskussion	93
7.1	Zytosolische Ca ²⁺ -Messung mithilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers	93
7.2	Transiente vs. stabile / Tetracyclin-induzierte Expression von TRPV6 in HEK Zellen	94
7.3	Ca ²⁺ -, CaM- und PKC-abhängige Modulation von humanem TRPV6	96
7.4	hTRPV6 vs. myotisTRPV6	100

8	Literaturverzeichnis	102
9	Danksagung	109
10	Lebenslauf	110

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Calcium-Abhängigkeit von TRPV6-Varianten

Das "transient receptor potential" Protein TRPV6 bildet in der Plasmamembran calciumselektive Ionenkanäle, welche durch intrazelluläre Calciumionen inhibiert werden. TRPV6-Proteine besitzen eine C-terminale Calcium/Calmodulin-Bindestelle, welche an der Calcium-abhängigen Inhibition beteiligt ist. Die Calcium/Calmodulin-Bindestelle beinhaltet zudem eine Sequenz, welche mit einer Protein Kinase C bedingten Phosphorylierungsstelle übereinstimmt. Aufgrund der Tatsache, dass der Ionenkanal TRPV6 in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen wurde, nimmt sowohl die Charakterisierung, als auch die Modulation und Hemmung dieses Ionenkanals, eine wichtige Stellung in Bezug auf eine mögliche Tumorthherapie ein.

In dieser Arbeit wurden die initial publizierte humane Variante von TRPV6 (hTRPV6_{short}) (725 Aminosäuren) (Wissenbach et al., 2001), die später entdeckte, von einem nicht-AUG-Codon-startende, längere Variante (hTRPV6_{long}) (765 Aminosäuren) (Fecher-Trost et al., 2013) und der TRPV6-Kanal der großen Bartfledermaus „Myotis brandtii“ (TRPV6_{Myotis}) (763 Aminosäuren) in „Human Embryonic Kidney“ (HEK293) Zellen exprimiert. Zu Beginn erfolgte die Etablierung des Fluoreszenz-Spektrophotometers. Hierbei wurden mithilfe von Testexperimenten sowohl die optimalen Programmeinstellungen und Umgebungsfaktoren für die Messungen, als auch die Handhabung und Fura-2-Beladung der Zellen, ermittelt. Anschließend erfolgte die Messung der Calcium-Abhängigkeit der einzelnen Varianten mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM. Neben der Verwendung von HEK Zellen, die stabil die TRPV6-Varianten hTRPV6_{long}, hTRPV6_{short} und TRPV6_{Myotis} exprimierten, fand auch eine transiente Expression von hTRPV6_{long} in HEK Zellen statt. Zuletzt genannte Methode führte bei der gleichzeitigen Messung der Zellpopulation im Fluoreszenz-Spektrophotometer zu kaum einen Unterschied zwischen hTRPV6_{long} und der Kontrolle, weshalb die stabil TRPV6-exprimierenden Zelllinien im weiteren Verlauf verwendet wurden. Es konnte festgestellt werden, dass die beiden humanen Varianten von TRPV6 sowohl in der extrazellulären Calcium-Abhängigkeit, als auch in der Kinetik der intrazellulären Calcium-Signale identisch sind. Während die extrazelluläre Calcium-Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Signale zwischen humanem und myotis TRPV6 keine Unterschiede aufweist, ist die Kinetik des intrazellulären Calcium-Anstieges und -Abfalls bei TRPV6_{Myotis} signifikant langsamer. Für die Modulierung von TRPV6 mittels Calmodulin-Inhibitoren wurden die Substanzen Calmidazolium, Ophiobolin A und Trifluoperazin verwendet. Einzig bei Trifluoperazin wurde eine dosis-abhängige (mittlere inhibitorische Konzentration = 30-50 µM) Inhibition der intrazellulären Calcium-Signale in HEK Zellen mit jeweils humanem oder myotis TRPV6 festgestellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass über die Modulation der Protein Kinase C eine Inhibition des TRPV6-abhängigen Calcium-Signals stattfindet. Hierbei inhibiert die Substanz Chelerythrin, welche als Protein Kinase C Inhibitor gehandhabt wird, das intrazelluläre Calcium-Signal, in HEK293 Zellen mit jeweils humanem oder myotis TRPV6, dosis-abhängig (mittlere inhibitorische

Konzentration = 2-5 μM). Währenddessen konnten der Protein Kinase C Inhibitor Gö 6983 und der Protein Kinase C Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat keinen Effekt auslösen. Zudem wurde der Effekt der Substanz Hexylresorcinol auf die unterschiedlichen Kanal-Varianten untersucht. Dabei wurde keine Modulierung des intrazellulären Calcium-Signals festgestellt, obwohl in meiner Arbeitsgruppe mittels anderer Messverfahren eine Inhibition von TRPV6 bereits beschrieben worden war. Des Weiteren wurde ein Protein aus dem Proteobakterium, welches eine Aminosäuresequenz ähnlich derer mit der Porenregion von hTRPV6_{long} aufweist, in einer stabilen HEK-Zelllinie untersucht. Es konnte jedoch kein verändertes Verhalten in der Ca^{2+} -Aufnahme, im Vergleich zur Kontrolle, detektiert werden.

1.2 Calcium-dependence of TRPV6-variants

The “transient receptor potential” protein TRPV6 forms calcium selective ion channels in the plasma membrane which are inhibited by intracellular calcium ions. TRPV6 proteins exhibit a C-terminal calcium/calmodulin binding site, suggested to be responsible for the calcium dependent inhibition. This calcium/calmodulin binding site also includes a consensus sequence for a protein kinase C dependent phosphorylation site. Because of the fact that TRPV6 was detected in many different tumor tissues, the characterization as well as the modulation and inhibition of this ion channel takes an important status according to a possible tumor therapy.

In this work the initially published human variant of TRPV6 (hTRPV6_{short}) (725 amino acids) (Wissenbach et al., 2001), the later discovered, from a non-AUG-codon starting, longer variant of TRPV6 (hTRPV6_{long}) (765 amino acids) (Fecher-Trost et al., 2013) and the TRPV6 channel of the brandt's bat „Myotis brandtii“ (TRPV6_{Myotis}) (763 amino acids) were expressed in „Human Embryonic Kidney“ (HEK293) cells. In the beginning the establishment of the fluorescence spectrophotometer took place. Using test experiments, the ideal program settings and environmental factors for the measurements as well as the handling and fura-2 loading of the cells were determined. Next the calcium dependence of the respective variants was measured with the fluorescent dye fura-2-AM. In addition to HEK cells stable expressing the TRPV6-variants hTRPV6_{long}, hTRPV6_{short} and TRPV6_{Myotis}, HEK cells transiently expressing hTRPV6_{long} were used. The latter method demonstrated that the simultaneous measurement of the cell populations in the fluorescence spectrophotometer barely showed a difference between hTRPV6_{long} and the control. This is the reason for using the stable TRPV6 expressing cell lines in further experiments. Some of those experiments demonstrated that the comparison of both human TRPV6 variants according to the extracellular calcium dependence and the intracellular calcium kinetic could show no differences. While there was also no difference between the human and myotis TRPV6 when looking at the extracellular calcium dependence of the intracellular calcium signals, the kinetics of the intracellular calcium increase and decrease were significant slower in cells expressing TRPV6_{Myotis}. For the modulation of TRPV6 via calmodulin inhibitors the substances calmidazolium, ophiobolin A and trifluoperazine were used. Only with trifluoperazine a dose-dependent (half-maximal inhibitory concentration = 30-50 μ M) inhibition of the intracellular calcium signal in HEK cells expressing human or myotis TRPV6 could be determined. Moreover, the modulation of the protein kinase C showed an inhibition of the TRPV6-dependent calcium signal. According to this the substance chelerythrine, handled as a protein kinase C inhibitor, inhibited the intracellular calcium signal in HEK293 cells with human or myotis TRPV6 in a dose-dependent manner (half-maximal inhibitory concentration = 2-5 μ M). In contrast to this result the protein kinase C inhibitor Gö 6983 and the protein kinase C activator phorbol-12-myristate-13-acetate had no effect. In addition to this the effect of the substance hexylresorcinol on the different channel variants was investigated. Although my work group described via different measuring methods an inhibition of TRPV6 through hexylresorcinol, no

modulation of the intracellular calcium signal could be shown. Moreover, a protein from the proteobacterium whose amino acid sequence resembles the pore region of hTRPV6_{long} was investigated in a stable HEK cell line. Compared to a control group no difference in the calcium uptake could be shown.

2 Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
° C	Grad Celsius
x g	Vielfaches der Schwerebeschleunigung
A	Ampere
AM	Acetoxymethylgruppe
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Adenosin, Uracil, Guanin
Bad	Badlösung
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAL	Calmidazolium
CaM	Calmodulin
CaR	Calcium sensing receptor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
e	Eulersche Zahl
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum

<i>et al.</i>	<i>et alii / aliae / alia</i>
FKS	Fetales Kälberserum
Flp	Recombinase flippase
FRT	Flippase recognition target
g	Gramm
Gd ³⁺	Gadoliniumion
GFP	green fluorescent protein
Gö	Gö6983
h	human
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hill	Hill-Koeffizient
H ₂ O	Wasser
HR	4-Hexylresorcinol
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IEC-6	Intestinal Epithelioid Cell line 6
IGFP	internal ribosome entry site green fluorescent protein
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kd _{eff}	effektiven Dissoziationskonstante
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kW	Kilowatt
l	Liter
m	mouse / Maus
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgATP	Adenosintriphosphat-Magnesium-Salz

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mio.	Million
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
μOR	μ-Opioidrezeptor
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OA	Ophiobolin A
PBS	phosphate buffered saline
pcDNA5/FRT/TO	Plasmid für „Gene of interest“, FRT-Region, CMV/TetO2-Promotor und Hygromycinresistenz-Gen
pcDNA6/TR	Plasmid für CMV-Promotor, Tetracyclin-Repressor-Protein und Blasticidinresistenz-Gen
PDZK2	PDZ (Post-synaptic Density Protein 95 / Synapse-associated Protein 90; Disc large 1; Zonula occludens 1) domain containing protein 2
pFRT/lacZeo	Plasmid for flippase recognition target / β-galactosidase and Zeocin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C

PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pOG44	Plasmid mit Rekombinase Flippase und CMV-Promotor
r	rat / Ratte
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
R_{\max}	Ratio von Fura-2 in der Ca^{2+} -gebundenen Form
R_{\min}	Ratio von Fura-2 in der Ca^{2+} -freien Form
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunden
siRNA	small interfering ribonucleic acid
Sb2	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei 380 nm in der Ca^{2+} -gebundenen Form
SCC	squamous cell carcinoma
SERCA	sarcoplasmic / endoplasmic reticulum calcium ATPase
Sf2	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei 380 nm in der Ca^{2+} -freien Form
SOCE	store-operated calcium entry
SOR	Soricidin
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	stromal interaction molecule
SV40	Simian-Virus 40
τ	tau
TetO2	tetracycline operator
TFP	Trifluoperazin
TG	Thapsigargin
THCV	Δ^9 -tetrahydrocannabivarin
TRP	transient receptor potential
V	Volt
VL	very long
Vol	Volumen
vs.	versus
w	Wert
z.B.	zum Beispiel

3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

3.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 4.1: Phylogenetik und schematischer Aufbau der TRP-Kanäle</i>	20
<i>Abbildung 5.1: Mikroskopische Aufnahmen von HEK hTRPV6_{long} IGFP Zellen</i>	36
<i>Abbildung 5.2: Fura-2 Anregungsspektrum & Schema des Zellbeladungsvorganges</i>	37
<i>Abbildung 5.3: Aufbau Zählkammer</i>	41
<i>Abbildung 5.4: Aufbau Fluoreszenz-Spektrophotometer</i>	43
<i>Abbildung 5.5: Vorbereitung der Messdaten zur Auswertung</i>	48
<i>Abbildung 5.6: Bearbeitung der Messdaten zur Darstellung der Abhängigkeit der zytosolischen Ca²⁺-Amplituden vom extrazellulären Ca²⁺</i>	49
<i>Abbildung 5.7: Analyse von Anstiegssteilheit und Abfallkinetik</i>	49
<i>Abbildung 5.8: Auswertung des inversen Ca²⁺-Protokolls</i>	50
<i>Abbildung 6.1: Verwendete Küvetten</i>	53
<i>Abbildung 6.2: Vergleich der Fluoreszenzintensität von Fura-2 beladenen HEK Zellen in den beiden verschiedenen Küvetten</i>	54
<i>Abbildung 6.3: Vergleich der Fluoreszenzintensität von Fura-2 beladenen HEK Zellen bei unterschiedlicher Fura-2-Inkubation</i>	55
<i>Abbildung 6.4: Fura-2-Messung des „Speicheraktivierten Ca²⁺-Einstroms“ in HEK Zellen</i>	57
<i>Abbildung 6.5: Fura-2-Messung des „Speicheraktivierten Ca²⁺-Einstroms“ und einer entsprechenden Kontrolle in RPMI Zellen</i>	58
<i>Abbildung 6.6: Fura-2-Messungen in HEK Zellen mit / ohne TRPC4</i>	59
<i>Abbildung 6.7: Extrazelluläre Ca²⁺-Abhängigkeit des intrazellulären Ca²⁺-Signals in transient TRPV6-exprimierenden HEK Zellen</i>	60
<i>Abbildung 6.8: Mikroskopische Aufnahmen von mittels AMAXA transient transfizierten HEK Zellen</i>	62
<i>Abbildung 6.9: Fura-2-Messungen von mittels AMAXA transient transfizierten HEK Zellen</i>	63
<i>Abbildung 6.10: Zeitlicher Aspekt von Wartezeit auf Fura-2-Messungen</i>	64
<i>Abbildung 6.11: Western Blot verschiedener TRPV6 Myotis Klone</i>	65
<i>Abbildung 6.12: Extrazelluläre Ca²⁺-Abhängigkeit intrazellulärer Ca²⁺-Signale in HEK Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren</i>	67
<i>Abbildung 6.13: Dosis-Wirkungs-Kurven der extrazelluläre Ca²⁺-Abhängigkeit intrazellulärer Ca²⁺-Signale in HEK Zellen, die verschiedenen TRPV6-Varianten exprimieren</i>	68
<i>Abbildung 6.14: Kinetik des Ca²⁺-Anstiegs in Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren</i>	70

<i>Abbildung 6.15: Kinetik der intrazellulären Ca²⁺-Abnahme in Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren</i>	72
<i>Abbildung 6.16: Ca²⁺-Kinetik in HEK Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren, beim „inversen Ca²⁺-Protokoll“</i>	73
<i>Abbildung 6.17: Effekt von Trifluoperazin auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	75
<i>Abbildung 6.18: Untersuchung der Eigenfluoreszenz von Trifluoperazin</i>	76
<i>Abbildung 6.19: Effekt von Calmidazolium & Ophiobolin A auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	78
<i>Abbildung 6.20: Kinetik der TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Signale bei Applikation verschiedener Konzentrationen von Calmidazolium und Ophiobolin A</i>	79
<i>Abbildung 6.21: Effekt von Chelerythrin auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	81
<i>Abbildung 6.22: Effekt von Gö 6983 & PMA auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	83
<i>Abbildung 6.23: Kinetik der TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Signale in Anwesenheit verschiedener Gö 6983-Konzentrationen</i>	84
<i>Abbildung 6.24: Effekt von Hexylresorcinol auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	87
<i>Abbildung 6.25: Effekte von verschiedenen Substanzen nach 30-minütiger Inkubation auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom</i>	88
<i>Abbildung 6.26: Gegenüberstellung der entsprechenden Sequenz eines TRPV6-ähnlichen Proteins aus Proteo und hTRPV6_{long}</i>	89
<i>Abbildung 6.27: Ca²⁺-Messungen in TRPV6_{proteo}-exprimierenden HEK Zellen</i>	89
<i>Abbildung 6.28: Mikroskopische Aufnahme von TRPV6_{proteo}-GFP-exprimierenden HEK Zellen</i>	90
<i>Abbildung 6.29: Darstellung eines Experimentes mit Umrechnung der Fura-2-Intensität in intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen</i>	92

3.1.1 Anmerkung

Abbildung 6.11, Abbildung 6.26 und Abbildung 6.28 wurden von Christine Wesely und Ulrich Wissenbach zur Verfügung gestellt.

3.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 4.1: Modulatoren von TRPV6</i>	26
<i>Tabelle 5.1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Geräte</i>	30
<i>Tabelle 5.2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Software</i>	31
<i>Tabelle 5.3: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Substanzen</i>	32
<i>Tabelle 5.4: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien</i>	32
<i>Tabelle 5.5: Auflistung und Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Lösungen</i>	32
<i>Tabelle 5.6: Zelllinien und Nährmedien</i>	33
<i>Tabelle 5.7: Applikationen bei der Ca²⁺-Stimulation von TRPV6-Varianten</i>	44
<i>Tabelle 5.8: Applikationsvorgehen bei der modulatorabhängigen Ca²⁺-Stimulation von TRPV6-Varianten</i>	44
<i>Tabelle 5.9: Substanzkonzentrationen in Bezug auf die Applikationskonzentration</i>	46
<i>Tabelle 5.10: Substanzkonzentrationen in Bezug auf die Applikationskonzentration inklusive Ca²⁺</i>	46
<i>Tabelle 6.1: Prozentueller Anteil der effektiven transient transfizierten Zellen</i>	61
<i>Tabelle 6.2: Prozentueller Anteil der mittels AMAXA effektiven transient transfizierten Zellen</i>	62
<i>Tabelle 6.3: Berechnung der K_{d,eff} für Fura-2</i>	91

4 Einleitung

4.1 Calcium

Calcium ist das fünfthäufigste Element im menschlichen Körper. Der Großteil dieses Minerals, nämlich 99 %, liegt als hydroxyliertes Calciumphosphat-Salz (Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) in Knochen und Zähnen vor. Nur 1 % des Calciums befindet sich in anderen Geweben und Körperflüssigkeiten. Der Calciumhaushalt unterliegt einer strengen Regulation, wobei vor allem Darm, Niere und Knochen eine außerordentlich wichtige Rolle spielen. Im Darm findet sowohl die Absorption von Calcium aus der Nahrung, als auch die Sekretion in Form von Körperflüssigkeiten, statt. Die Funktion der Niere besteht darin, die Reabsorption von Calcium aus dem Urin zu koordinieren (Pape et al., 2018). Währenddessen fungiert die Knochensubstanz unter anderem als Calciumspeicher, der bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Plasma mobilisiert werden kann. Die Regulation dieser Prozesse wird dabei durch calciumsensitive Rezeptoren gesteuert. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Blutplasma vermitteln diese Rezeptoren die Freisetzung von Parathormon. Ein weiterer essentieller Regulator ist Calcitriol, welches aus der Vorstufe Cholecalciferol (Vitamin D3) gebildet wird (Rassow et al., 2016).

Die Calciumkonzentration im Plasma beträgt ca. 2,5 mmol/l (Pape et al., 2018). Dabei liegen 5-10 % in Komplexen gebunden mit Anionen wie Bicarbonat, Citrat, Phosphat und Sulfat vor (Zheng et al., 2015). Weitere 40-45 % sind gebunden an Plasmaproteine wie Albumin, sodass ca. 50 % der Gesamtkonzentration (1,25 mmol/l) im Plasma als ionisiertes Ca^{2+} vorliegt und somit als aktive Fraktion bezeichnet werden kann (Nordin, 1990).

Die physiologische Wirkung von Ca^{2+} spiegelt sich sowohl in der Erregungsweiterleitung zwischen Zellen in Form von Aktionspotentialen (APs), als auch als intrazellulärer Second Messenger wider. Die, durch schnellen Einstrom in das Zytosol entstehenden Signale, sind beispielsweise essentiell beim Aufrechterhalten der AP-Plateauphase und somit der Kontraktion in Kardiomyozyten (Pape et al., 2018). Des Weiteren kann Ca^{2+} mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren und somit Signalkaskaden auslösen. Ein Beispiel hierfür ist die Exozytose von Neurotransmittern in der Präsynapse, bei der Ca^{2+} über die Bindung an Synaptotagmin zur Fusion der Neurotransmitter enthaltenden Vesikel führt (Pape et al., 2018). Eine wichtige Voraussetzung für beide Mechanismen ist, dass, wenn Ca^{2+} -Kanäle öffnen, auch eine treibende Kraft für einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vorhanden ist. Diese wird bereitgestellt durch ein negatives Membranpotential und einen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulär. Während extrazellulär eine Ca^{2+} -Konzentration von ungefähr 1-2 mmol/l vorzufinden ist, werden intrazellulär 20000-fach niedrigere Konzentrationen (50-100 nmol/l) detektiert (Zheng et al., 2015). Kommt es nun zum Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, kann sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration lokal um das zehnfache bis hundertfache erhöhen und hierdurch ihre Wirkung erzeugen. Neben dem Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär existiert auch die Möglichkeit, dass Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern ins Zytosol einströmt. Bei diesen Speichern handelt es sich vor allem um das

endoplasmatische und sarkoplasmatische Retikulum. Diese enthalten Ca^{2+} -Konzentrationen, die 1000- bis 10000-fach höher sind als im Zytosol, sodass auch hier ein Konzentrationsgradient zum Zytosol vorhanden ist (Zheng et al., 2015).

4.2 Calmodulin

Das Protein Calmodulin (CaM), welches in einer Vielzahl von eukaryontischen Zellen vorkommt, besitzt ein Molekulargewicht von 16,7 kDa. Für seine Funktion charakteristisch sind vier EF-Hand-Motive mit einer „Helix-Loop-Helix-Struktur“, die jeweils ein Calciumion binden kann. Unter normalen intrazellulären Calciumbedingungen, bindet CaM größtenteils kein Ca^{2+} und ist somit inaktiv. Wird jedoch ein Zellsignal durch Ca^{2+} vermittelt und die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol steigt, so bindet Ca^{2+} an die EF-Hand-Motive von CaM. Es folgt eine Konformationsänderung in die aktive Form des Proteins (Rassow et al., 2016). Die Übertragung der Wirkung kann nun auf mehrere Arten erfolgen: 1. Der Ca^{2+} -CaM-Komplex reguliert direkt ein Zielprotein. 2. Der Ca^{2+} -CaM-Komplex entfaltet seine Wirkung durch eine Ca^{2+} -CaM-abhängige Kinase, die wiederum Proteine phosphorylieren kann. 3. Der Ca^{2+} -CaM-Komplex ist eine integrierte Untereinheit eines Proteins und wirkt somit ortsspezifisch (Stevens, 1983). Aus diesen Gründen ist CaM an wichtigen Ca^{2+} -abhängigen Prozessen, wie der Regulation von Stoffwechselwegen, Rezeptoren und auch Ionenkanälen beteiligt.

4.3 Ionenkanäle

Bei Ionenkanälen handelt es sich um Transmembranproteine, die durch ihre strukturelle Anordnung eine ionenselektive Pore formen. Hierdurch ermöglichen sie, dass ein Ionenaustausch über die Zellmembran stattfinden kann. Die Leitfähigkeit für verschiedene Ionen hängt von den Aminosäurenresten ab, die die Pore bilden und kann stark variieren, wodurch unter anderem die Selektivität und Spezifität des Kanals entsteht. Zudem werden die Ionenkanäle je nach Funktion in verschiedenen Zellen und sogar innerhalb einer Zelle, an der apikalen und basolateralen Membran, unterschiedlich stark exprimiert.

Ionenkanäle besitzen zudem verschiedene Arten der Aktivierung und Regulation anhand derer sie sich einteilen lassen. Zum einen existieren spannungsgesteuerte Ionenkanäle, die durch eine Veränderung des Membranpotentials aktiviert werden. Eine andere Art der Regulation wird durch ligandengesteuerte Ionenkanäle vermittelt. Diese reagieren durch direkte Bindung eines Liganden und fungieren somit gleichzeitig als Rezeptor. Dem gegenübergestellt existieren Second Messenger-aktivierte Ionenkanäle, bei denen ein Ligand an einen unabhängigen Rezeptor bindet und eine Signalkaskade auslöst. Durch diese Signalkaskade wird der Kanal dann letzten Endes über einen intrazellulären Botenstoff aktiviert (Pape et al., 2018). Eine weitere Form der Regulation von Ionenkanälen besteht in der Kopplung mit physikalischen Reizen. Somit können Ionenkanäle beispielsweise mechano-/ temperatur-/ licht-/ oder pH-sensitiv sein und durch diese Reize aktiviert werden. Neben dieser Aufteilung von Ionenkanälen gibt es auch Mischformen der Aktivierung. Zudem kann auch eine Regulation der Ionenkanalaktivität

durch Phosphorylierung von Kanälen, durch Beeinflussung der Transkription oder Translation und durch kontrollierten Ein- und Ausbau des Kanals in die Plasmamembran stattfinden.

4.3.1 Calciumkanäle

Ca^{2+} kann sowohl von extrazellulär in die Zelle gelangen, als auch aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern (endoplasmatisches (ER) / sarkoplasmatisches Retikulum (SR)), wird hauptsächlich durch den Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3)-Rezeptor und den Ryanodin-Rezeptor vermittelt (Zheng et al., 2015). Der Transport über die Zellmembran wird durch verschiedene Gruppen von Kanälen gewährleistet: Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, Speicher-aktivierte Orai-Kanäle und nicht-selektive Kationenkanäle zu denen unter anderem die Kanäle aus der „transient receptor potential“ (TRP)-Familie zählen.

Durch die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle können schnelle elektrische Signale übertragen werden. Dies spielt eine Rolle bei der Entstehung von Aktionspotentialen (APs) und deren Fortleitung über Synapsen. Auch chemische Substanzen können über Aktivierung nicht-selektiver Kationenkanäle unter anderem Ca^{2+} in das Zytosol lassen. Hierdurch bewirken sie eine Veränderung des Membranpotentials der entsprechenden Zelle, als auch die Aktivierung von Ca^{2+} -vermittelten Abläufen. Als Beispiel sind hier der nikotinerge Acetylcholinrezeptor und der ionotrope Glutamatrezeptor zu nennen (Zheng et al., 2015). Die Gruppe der TRP-Kanäle umfasst eine Vielzahl von Kanälen, die Ca^{2+} -permeabel sind und durch unterschiedliche physikalische und chemische Stimuli aktiviert werden können. Als letztes ist der Orai-Kanal zu erwähnen, der für den sogenannten Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich ist. Dabei führt das Feststellen eines Ca^{2+} -Defizites im ER über das Protein „stromal interaction molecule“ (STIM), welches als Ca^{2+} -Sensor im ER dient, zu einer Aktivierung des Orai-Kanals, sodass Ca^{2+} von extrazellulär in die Zelle einströmen kann (Zheng et al., 2015).

Da Ca^{2+} ein an vielen Prozessen beteiligtes Signalmolekül ist, muss die Konzentration innerhalb der Zelle streng reguliert und auch wieder normalisiert werden können, um Überreaktionen zu verhindern. Hierfür gibt es zum einen den Transport von Ca^{2+} aus der Zelle über die Zellmembran, welcher durch Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter, Na^+ - Ca^{2+} - K^+ -Antiporter und Ca^{2+} -Adenosintriphosphatasen (ATPasen) gewährleistet wird. Für den Transport von Ca^{2+} entgegen seines Konzentrationsgradienten, der aus der Zelle führt, wird entweder direkt Energie in Form von ATP verbraucht oder der Na^+ -Gradient in die Zelle ausgenutzt. Mithilfe von Ca^{2+} -ATPasen können Calciumionen auch in das endoplasmatische Retikulum „gepumpt“ werden. Des Weiteren besitzt die Mitochondrienmembran Uniporter, mit deren Hilfe Ca^{2+} energieunabhängig in die mitochondriale Matrix gelangen kann (Zheng et al., 2015).

4.3.2 Transient receptor potential (TRP)-Kanäle

Ursprünglich entdeckt wurden die TRP-Kanäle in einer Defektmutante der Fruchtfliege „*Drosophila melanogaster*“. Namensgebend für das defekte Gen und Protein war, dass die Photozellen der Fliege bei einem Lichtreiz statt eines kontinuierlichen Rezeptorpotentials und Ca^{2+} -Einstroms nur ein transientes Signal auslösten. Bisher wurden TRP-Kanäle in Hefepilzen, wirbellosen Spezies (Würmer,

Fruchtfliegen) und Wirbeltieren (z.B. Zebrafisch, Maus, Mensch) nachgewiesen. Des Weiteren kommen sie in beinahe jedem Zelltyp vor und sind in allen Membranen, mit Ausnahme der Mitochondrienmembran und der Kernhülle, vertreten.

Die Gruppe der TRP-Kanäle umfasst eine Vielzahl an Ionenkanälen, die sich in ihrer Struktur ähneln (Abbildung 4.1 A). Alle, dieser Gruppe zugehörigen Proteine, besitzen sechs Transmembrandomänen, bilden als Tetramer einen funktionsfähigen Ionenkanal, und sind permeabel für Kationen. Dabei sind die meisten TRP-Kanäle unspezifische Kationenkanäle und nur einige wenige sind selektiv für divalente Kationen wie beispielsweise Ca^{2+} (TRPV5, TRPV6) und Mg^{2+} (Nilius and Owsianik, 2011). Zudem existieren ausschließlich für monovalente Kationen permeable TRP-Kanäle (TRPM4, TRPM5).

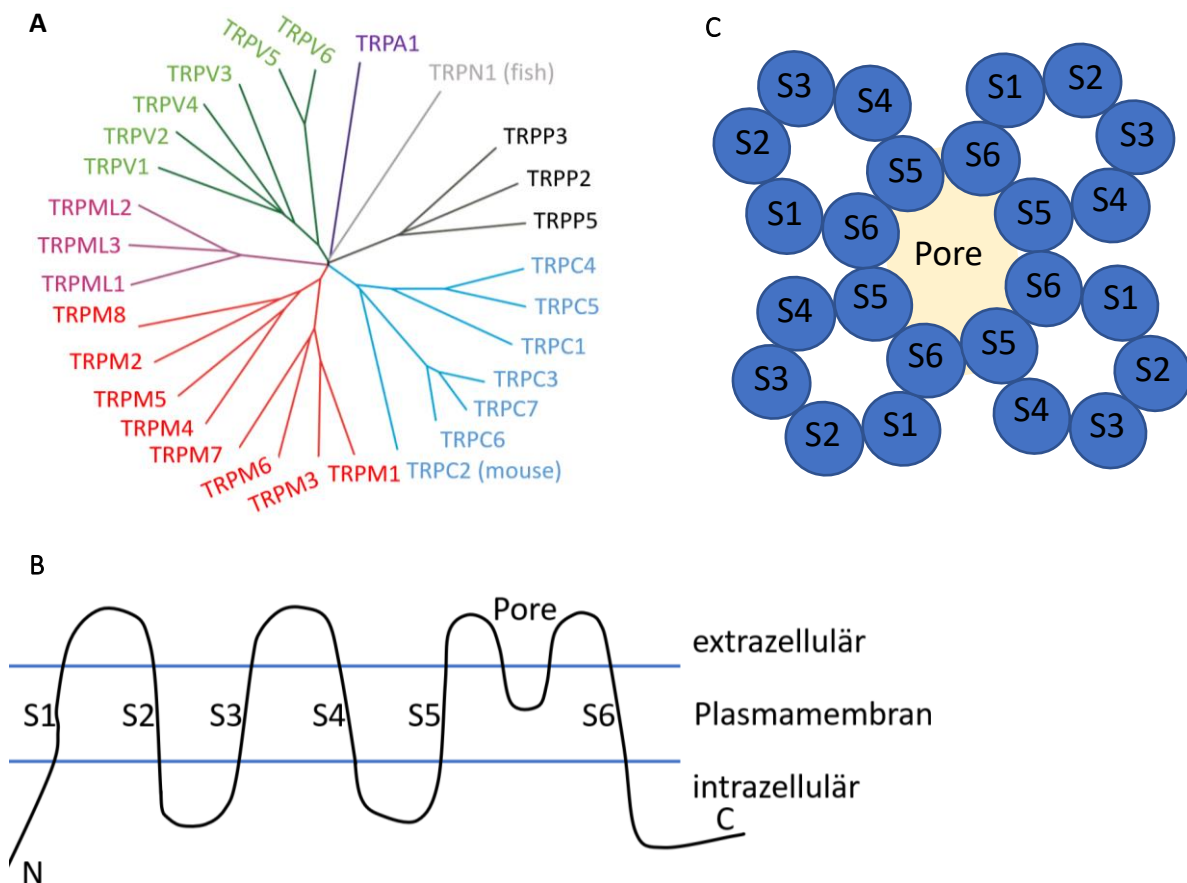


Abbildung 4.1: Phylogenetik und schematischer Aufbau der TRP-Kanäle

Phylogenetische Darstellung der sieben TRP-Kanal-Gruppen (A). Dabei ist zu beachten, dass TRPC2 und TRPN1 nicht im Menschen vorkommen (adaptiert nach: (Nilius and Owsianik, 2011)). Ein TRP-Protein weist sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6) mit intrazellulären N- und C-Terminus auf und besitzt zwischen Transmembrandomäne S5 und S6 eine Porenregion (B). Es müssen vier TRP-Proteine zu einem Tetramer multimerisieren, damit ein funktionsfähiger Kanal entsteht (C).

Die Familie der TRP-Kanäle lässt sich, anhand von Homologien in den Transmembrandomänen, in zwei Gruppen mit Subfamilien einteilen. Zur ersten Gruppe, die eine hohe Übereinstimmung zum ursprünglich entdeckten TRP-Kanal in *Drosophila* (dTRP) zeigt, gehören TRPA1 (Ankyrin), TRPC1-7 (Canonical), TRPN (NOMP), TRPM1-8 (Melastatin), und TRPV1-6 (Vanilloid). Die zweite Gruppe wird durch TRPML1-3 (Mucolipine) und TRPP2, 3 und 5 (Polycystine) repräsentiert. Eine zusätzliche Gruppe wurde ausschließlich in der Vakuolenmembran von Hefepilzen entdeckt und ist für diese charakteristisch. Dabei handelt es sich um TRPY1 (Yeast) (Li, 2017).

4.3.3 Aktivierung und Modulation von TRP-Kanälen

Aufgrund ihrer Diversität übernehmen TRP-Kanäle im menschlichen Körper eine Vielzahl an Funktionen. Hierzu zählen beispielsweise die Thermozeption, die Schmerz Wahrnehmung und die Geschmackswahrnehmung. Hergeleitet werden können diese Funktionen, indem physikalische und chemische Stimuli der Kanäle betrachtet werden. Manche TRP-Kanäle reagieren auf Veränderungen des pH-Wertes, sowohl in Bezug auf eine pH-Wert-Abnahme (z.B. TRPC4) (Semtner et al., 2007), als auch eine pH-Wert-Zunahme (z.B. TRPP3) (Shimizu et al., 2009). Auch Veränderungen in der Osmolarität, welche mit Zellschwellung und Scherkräften einhergehen (z.B. TRPC6, TRPM7) sind bekannt (Inoue et al., 2009; Numata et al., 2007). Ein weiterer wichtiger Stimulus sind Temperaturen, welche meist Kanal-spezifisch sind und in Hitze (z.B. TRPV2) (Caterina et al., 1999) und Kälte (z.B. TRPA1, TRPM8) (Story et al., 2003), bezogen auf die physiologische Temperatur, eingeteilt werden können. Neben der Art der Kanalaktivierung spielt für die Funktion eines Kanals auch die Selektivität der Ionenpermeation eine Rolle. Beispielsweise ist TRPV6 ein Ca^{2+} -selektiver Ionenkanal, der während der Embryonalentwicklung des Menschen und der Maus eine essentielle Rolle im transplazentären Ca^{2+} -Transport und der damit verbundenen Skelettentwicklung einnimmt (Burren et al., 2018; Fecher-Trost et al., 2021; Li et al., 2019; Suzuki et al., 2018). Ein zusätzlicher Mechanismus, der z.B. bei TRPM4 und TRPM8 zu beachten ist, ist die Spannungsabhängigkeit (Nilius et al., 2005; Voets et al., 2007), bei der vermutet wird, dass vor allem die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin, die in der vierten Transmembrandomäne und dem Verbindungsstück von Transmembrandomäne vier und fünf vorhanden sind, beteiligt sind (Voets et al., 2007). Die Protein Kinase C (PKC) und Protein Kinase A (PKA) sind maßgeblich an der Modulation von TRP-Kanälen beteiligt. Hierbei werden z.B. TRPC3, 4, 5 durch die PKC inhibiert (Venkatachalam et al., 2003), während sowohl die PKC, als auch die PKA bei TRPV4 zu einer Verstärkung der Kanalaktivierung führen (Fan et al., 2009). Auch in der Membran vorkommenden Phospholipide, wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2), welches von der Phospholipase C (PLC) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) gespalten werden kann, übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation von TRP-Kanälen (z.B. TRPV6) (Thyagarajan et al., 2008). Bei all diesen Mechanismen handelt es sich nicht um eine abrupte Aktivierung oder Inhibition der Kanäle, sondern um sich gegenseitig beeinflussende Regulationsarten. So wird beispielsweise durch einen Abbau von PIP_2 , durch die PLC, die Spannungsabhängigkeit des Kanals TRPM4 in positive Richtung erhöht, wodurch der Kanal schwerer aktivierbar wird (Nilius et al., 2006).

Weiterhin können die TRP-Kanäle durch eine Vielzahl von pflanzlichen und synthetisch hergestellten Substanzen aktiviert oder inhibiert werden. Dabei existieren Substanzen, die sehr selektiv nur auf eine TRP-Kanal-Unterart wirken (z.B. Olvanil auf TRPV1) (Iida et al., 2003), genauso, wie Substanzen, die Effekte auf mehrere Untergruppengruppen von TRP-Kanälen haben (z.B. 2-APB auf TRPC6, TRPM8, TRPV1) (Hu et al., 2004).

Kommen unterschiedliche TRP-Kanäle in derselben Zelle vor, können, neben der Bildung von Homomultimeren, auch Heteromultimere gebildet werden. Innerhalb der Gruppe von TRPV-Kanälen konnte eine solche Multimerisation zwischen TRPV1 mit TRPV2 und TRPV5 mit TRPV6 nachgewiesen werden (Hellwig et al., 2005; Hoenderop et al., 2003). Durch diesen Mechanismus könnten die Funktion, die Lokalisation, die Eigenschaften und auch die Beeinflussbarkeit des Kanal-Multimeres durch die oben genannten Punkte verändert werden.

4.4 TRPV-Familie

Die Familie der TRPV-Kanäle setzt sich aus sechs Mitgliedern (TRPV1-6) zusammen. TRPV1-4 sind dabei allesamt nicht selektive Kationenkanäle und mäßig permeabel für Ca^{2+} . Sie sind zudem wärmesensibel und übernehmen eine wichtige Funktion bei der Temperaturwahrnehmung. TRPV1 kommt unter anderem im Spinalganglion, dem Ganglion trigeminale und in spinalen und peripheren Nervenendigungen vor (Caterina et al., 1997) und dient dort, aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch chemische Substanzen, niedrigen pH-Werten ($\leq 5,5$) (Hellwig et al., 2004) und höheren Temperaturen ($\geq 42^\circ\text{C}$) (Liu et al., 2003), der Nozizeption. Zudem scheint dieser Kanal wichtig für die Funktion der Blase zu sein, wie an Knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte: Eine Funktionslosigkeit des Kanals führte zu einem gesteigerten Harnblasenvolumen und einer ineffizienten Blasenentleerung (Birder et al., 2002). Der Kanal TRPV2 kommt in einer Vielzahl von Geweben, beispielsweise im Gehirn (Nedungadi et al., 2012), im Spinalganglion (Caterina et al., 1999), in der Milz (Caterina et al., 1999) und in Zellen aus Magen, Duodenum, Pankreas und Speicheldrüsen (Kowase et al., 2002) vor. Er wird einerseits durch Temperaturen von über 52°C (Caterina et al., 1999) und zum anderen durch Scherkräfte bzw. Zellschwellung (Muraki et al., 2003) aktiviert. TRPV3 wird in gewissen Bereichen des Gehirns und in den temperaturregulierenden Spinalganglien und dem Ganglion trigeminale exprimiert (Xu et al., 2002). In Koexpression mit TRPV4, welcher in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen vorkommt, ist TRPV3 auch in Keratinozyten vorzufinden. Auch in diesem Gewebe findet durch die Thermosensibilität von TRPV3 ($> 34^\circ\text{C}$) (Peier et al., 2002) und TRPV4 ($> 27^\circ\text{C}$) (Watanabe et al., 2002) eine Temperaturwahrnehmung statt. TRPV4 wird außerdem auch durch Scherkräfte und Zellschwellung aktiviert und ist somit ein wichtiger Mechanosensor (Wissenbach et al., 2000).

Im Gegensatz zu TRPV1-4 sind TRPV5 und 6 höchst selektiv für Ca^{2+} . Nichtsdestotrotz können sie in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} auch monovalente Kationen leiten (Yue et al., 2001). Im Menschen kommt in einer Vielzahl von Geweben (Gehirn, Plazenta, Prostata, Ovar, Hoden, Lunge, Milz, Nebenniere, Pankreas, Thymus, Leber, Niere, Darm, Haut, Knochen) TRPV6-mRNA vor (Peng

et al., 2000; Weber et al., 2001). Das gemeinsame Vorkommen von TRPV5- und TRPV6-mRNA hingegen konnte jedoch nur in den Geweben von Darm, Pankreas, Plazenta, Hoden und Prostata festgestellt werden (Hoenderop et al., 2001). Die Koexpression der eigentlichen Proteine von TRPV5 und TRPV6 konnte in Mäusenieren im Bereich des Verbindungstubulus und der pars convoluta des distalen Tubulus nachgewiesen werden und lässt auf eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Resorption schließen (Bianco et al., 2007; Hoenderop et al., 2003). Des Weiteren kommen die TRPV6-mRNA oder das TRPV6-Protein auch in Karzinomgewebe von Prostata, Ovar, Brust, Schilddrüse, Darm und Pankreas vor (Bolanz et al., 2008; Fixemer et al., 2003; Song et al., 2018; Zhuang et al., 2002). Auch ein essentieller Einfluss von TRPV6 auf die Fertilität männlicher Mäuse, welche bei Knock-out-Mäusen vermindert ist, konnte festgestellt werden (Weissgerber et al., 2012; Weissgerber et al., 2011).

4.5 TRPV6

4.5.1 Struktur

Das Gen, welches TRPV6 kodiert, ist beim Menschen auf dem siebten Chromosom zu finden (7q33-q34). Die Transkription des physiologischen TRPV6-Proteins beginnt, statt üblicherweise mit einem AUG-Codon, bei einem ACG-Codon, welches trotz Abweichung vom genetischen Code, in Methionin translatiert wird und führt zur Entstehung eines insgesamt 765 Aminosäuren langen Ca^{2+} -Kanals (Fecher-Trost et al., 2013). Vor dieser Feststellung wurde vermutet, dass die Transkription bei einem 120 Basenpaare stromabwärts liegenden AUG-Codon beginnt, weshalb der Kanal TRPV6 zunächst mit einer Länge von 725 Aminosäuren angegeben wurde (Wissenbach et al., 2001). Aufgrund dieses Sachverhaltes wird in der vorliegenden Arbeit die physiologisch vorkommende Version von TRPV6 auch als hTRPV6_{long} bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird die zu Beginn unvollständig ermittelte, kürzere Form dieses Ca^{2+} -Kanals, hTRPV6_{short} genannt.

Wie alle TRP-Proteine weist TRPV6 sechs Transmembrandomänen und einen intrazellulären N- und C-Terminus auf. Vier dieser Untereinheiten formen zusammen als Homotetramer einen funktionsfähigen Ionenkanal (siehe Abbildung 4.1 B, C). Die Transmembranhelices eins bis vier weisen viele hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten auf. Hierdurch kann angenommen werden, dass während des Ionenflusses keine große Formationsänderung in diesem Bereich stattfindet. Zur Bildung der Pore kommt es dadurch, dass Transmembrandomäne fünf, der „pore-loop“ und Transmembrandomäne sechs der jeweiligen Untereinheiten miteinander interagieren (Yelshanskaya et al., 2021).

Hierbei wird die Leitfähigkeit von TRPV6 durch acht saure Aminosäurereste gewährleistet, die im Verbindungsabschnitt der Transmembrandomäne fünf und sechs liegen. Diese sorgt im homotetramerisierten TRPV6-Protein dafür, dass eine stark negativ geladene Porenregion entsteht, die zur Anreicherung von positiv geladenen Ionen führt (Saotome et al., 2016). Diese allgemeine Voraussetzung wird durch weitere Selektionsmechanismen ergänzt. Bei Untersuchungen der Kristallstruktur des TRPV6-Kanals konnten vier potentielle Kationen-Bindestellen in der Pore ermittelt

werden. Die Bindestellen sind für das Verständnis der Ionenpermeation über den Kanal essentiell (Saotome et al., 2016).

Eine fehlende Bindung von Ca^{2+} an die erste Kationen-Bindestelle würde, aufgrund einer gegenseitigen Abstoßung der Aspartatringe an Position 542 im Menschen / Position 541 in der Ratte, energetisch ungünstig sein (Saotome et al., 2016). Diese Annahme legt nahe, dass bei der Permeation von Ca^{2+} ein direkter Ersatz eines Calciumions durch ein anderes Calciumion stattfinden muss („knock-off“-Mechanismus). Die Überwindung der hohen Energie für das Ersetzen von Ca^{2+} bei normalem Membranpotential, kann ausschließlich durch „hohe“ Ca^{2+} -Konzentrationen gewährleistet werden (Sakipov et al., 2018).

Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen leitet TRPV6 ausschließlich Ca^{2+} . Hingegen findet bei der Abwesenheit von Ca^{2+} eine Verschiebung der Selektivität zu Natriumionen statt (Yue et al., 2001). Erklärt werden kann dies dadurch, dass Na^+ nicht dem knock-off-Mechanismus folgt. Nichtsdestotrotz sorgt die Bindung von Ca^{2+} an die Kationen-Bindestelle eins dafür, dass der Strom von monovalenten Kationen unterbunden wird. Eine ähnliche Funktionsweise wurde bereits bei dreiwertigen Kationen wie Gd^{3+} festgestellt. Diese können ebenfalls an die Kationen-Bindestelle eins binden und blockieren durch die dreifache positive Ladung die Permeation von Ca^{2+} (Sakipov et al., 2018).

Des Weiteren ist bereits bekannt, dass hTRPV6_{long} an seinem C-Terminus eine Ca^{2+} -Calmodulin-Bindestelle (Aminosäure 731 bis 751 in der humanen Sequenz) besitzt, die für eine Ca^{2+} -abhängige Inhibition des Kanals verantwortlich zu sein scheint. Innerhalb der Ca^{2+} -Calmodulin-Bindestelle existiert auch eine bekannte Sequenz für eine Phosphorylierungsstelle der Protein Kinase C (PKC) (Aminosäure 739 bis 745) (Niemeyer et al., 2001).

Wie bereits erwähnt, wird in der Literatur eine kurze Variante von TRPV6 („short“) und eine längere Variante von TRPV6 („long“) beschrieben, wobei letztere die Variante ist, welche *in vivo* exprimiert wird. Zwischen den beiden Varianten konnten keine funktionellen Unterschiede festgestellt werden. Sie unterscheiden sich lediglich in den ersten 40 Aminosäuren und dem damit verbundenen Translationsbeginn (Fecher-Trost et al., 2013). In Experimenten mit „human embryonic kidney“ (HEK) Zellen konnte gezeigt werden, dass bei der short-Variante eine 5-fach effektivere Initiierung der Translation stattfindet, als bei der long-Variante. Außerdem zeigt der längere N-Terminus von TRPV6-long eine Ähnlichkeit mit Ankyrin-Wiederholungen und spielt damit sowohl bei der Lokalisation des Kanals in die Plasmamembran eine Rolle, als auch bei der Homomultimerisierung des Kanals (Fecher-Trost et al., 2013). In Zellen muss die Ca^{2+} -Konzentration streng reguliert werden, um toxische Effekte, die mit einer Überladung der Zelle mit Ca^{2+} in Zusammenhang stehen, zu vermeiden. Die beiden genannten Mechanismen stellen dabei eine mögliche Regulation der Ca^{2+} -Aufnahme auf Ebene der Synthese, Lokalisation und Multimerisierung von TRPV6 dar.

4.5.2 Lokalisation & Funktion

Die mRNA des TRPV6-Kanals konnte bisher in vielen unterschiedlichen humanen Geweben nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem: Plazenta, Pankreas, Speicheldrüsen, Duodenum, Magen und Prostata (Peng et al., 2000; Wissenbach et al., 2001). Zusätzlich konnte in der Maus TRPV6, zumindest in kleinen Mengen, in folgenden Organen gefunden werden: Ösophagus, Magen, Darm, exokrines Pankreas, Knochen, Gehirn, Lunge, Milz, Thymus, Leber, Haut, Prostata, Plazenta, Uterus, Niere und Epididymidis (Hirnet et al., 2003; Weber et al., 2001). Ein Knock-out von TRPV6 führte mit Blick auf die Expression im Epididymidis zu einer gestörten Spermienreifung mit verminderten Beweglichkeit der Spermien, was eine wichtige Rolle von TRPV6 dort vermuten lässt (Weissgerber et al., 2011). Beim Menschen hingegen gelang ein Nachweis dieses Calciumkanals physiologisch nur in Plazenta, dem exokrinen Pankreas und anderen exokrinen Drüsen (Wissenbach et al., 2001). Anscheinend übernimmt TRPV6 eine Rolle beim Ca^{2+} -Austausch zwischen Mutter und Kind in der Schwangerschaft und trägt somit zur skelettalen Entwicklung des Kindes bei (Burren et al., 2018; Suzuki et al., 2018). Ein Anhaltspunkt besteht zudem darin, dass bei Frauen, die an Präeklampsie leiden, TRPV6 in der Plazenta herunterreguliert ist (Hache et al., 2011). In Bezug auf pathologisches Auftreten von TRPV6 beim Menschen ist sein verstärktes Vorkommen in Tumoren von Ovar, Brust, Darm, Pankreas, Schilddrüse und Prostata zu verzeichnen (Bolanz et al., 2008; Song et al., 2018; Zhuang et al., 2002). Welche genaue Rolle TRPV6 dabei jedoch spielt ist bisher ungeklärt.

4.5.3 Modulation

Die durch TRPV6 bedingte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und der damit im Zusammenhang stehende Ionenfluss können durch unterschiedliche Substanzen beeinflusst werden (Tabelle 4.1).

In Kryo-Elektronenmikroskopaufnahmen wurden im humanen TRPV6-Kanal sechs mögliche Interaktionsstellen für Lipide festgestellt (Hughes et al., 2018; McGoldrick et al., 2018). Dabei kommen die Struktur betrachtend sowohl Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine und Cholesterol, als auch Phosphatidylinositole in Frage. Letztere rücken vor allem unter physiologischen Bedingungen vermehrt in den Fokus (McGoldrick et al., 2018). Obwohl der genaue Mechanismus der Beeinflussung von TRPV6 durch Lipide noch nicht geklärt ist, scheinen sie eine entscheidende Rolle in der Regulation dieses Kanals zu spielen.

In einem Lipidbilayer-Modell konnte in Bezug darauf gezeigt werden, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) zu einer Aktivitätssteigerung von humanem TRPV6 führt. Experimente, in denen eine Zugabe von MgATP zu einer Reaktivierung des TRPV6-Stroms führte, unterstützen dies. MgATP wird nämlich als Cofaktor für Lipidkinasen, wie die Phosphatidylinositol 4-Kinase und die Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase, benötigt, welche die Umwandlung von Phosphatidylinositol in PIP_2 übernehmen (Zakharian et al., 2011). Zusätzlich konnte in Patch-Clamp-Experimenten gezeigt werden, dass die alleinige Applikation des Nukleotids ATP die Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle verhindert (Al-Ansary et al., 2010).

	Auswirkung auf die $[Ca^{2+}]_{intrazellulär}$ bzw. Ionenfluss	Quelle
Endogene Modulatoren		
Calciumionen (intrazellulär)	↓	Cao et al., 2013
Calmodulin	—	Cao et al., 2013
Calmodulin + Calciumionen	↓	Niemeyer et al., 2001 Cao et al., 2013
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	↑	Thyagarajan et al., 2008
Proteinkinase C	↑	Niemeyer et al., 2001
Adenosintriphosphat (ATP)	↑	Al Ansary et al., 2010
PDZK2	↑	Kim et al., 2007
Weitere modulatorische Moleküle		
2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)	↓ ↑	Kovacs et al., 2012 Singh et al., 2018 Voets et al., 2001
Ruthenium-Rot	↓	Hoenderop et al., 2001
Soricidin / SOR-C13 / SOR-C27	↓	Bowen et al., 2013
Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV)	↓	Janssens et al., 2018
Xestospongin C	↓	Vassilev et al., 2001
Modifiziertes TH-1177 (#03)	↓	Haverstick et al., 2000 Landowski et al., 2011
Phenyl-Cyclohexyl-Piperazin cis-22a bzw. 3OG	↓ ↓	Cunha et al., 2020
Tamoxifen	↓	Bolanz et al., 2008 Bolanz et al., 2009

Tabelle 4.1: Modulatoren von TRPV6

Darstellung der Beeinflussung der TRPV6 bedingten $[Ca^{2+}]_{intrazellulär}$ bzw. des Ionenflusses durch unterschiedliche Substanzen. (↑ = vermehrt; ↓ = vermindert; — = kein Einfluss)

Humaner TRPV6 wird zudem sowohl durch Ca^{2+} , als auch durch Calmodulin beeinflusst (Cao et al., 2013). Bei „inside-out“ Patch-Clamp-Experimenten konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre, unphysiologisch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen alleine zu einer Inhibition des Ca^{2+} -Stromes führen ($IC_{50} = 20 \mu M$). Des Weiteren konnte bei $3 \mu M Ca^{2+}$ eine Dosisabhängigkeit von Calmodulin auf die Inhibition

des Kanals nachgewiesen werden. Wurde jedoch ausschließlich Calmodulin, ohne die Zugabe von Ca^{2+} , benutzt, fand keine Hemmung des Ca^{2+} -Stromes statt. Auch werden mehrere Calmodulin-Bindestellen im zytoplasmatischen N-Terminus, C-Terminus und dem Verbindungsloop zwischen Membrandomäne zwei und drei im Protein von humanem TRPV6 vermutet (Cao et al., 2013). Das Erzeugen einer Mutation am C-Terminus hatte eine fehlende Bindung von Calmodulin an den Kanal zur Folge. Bestätigt wurde dies durch Experimente, bei denen eine Zugabe von Ca^{2+} zu einer bei der Mutante verminderten Inaktivierung von humanem TRPV6 führte. Dem hemmenden Effekt des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes konnte außerdem durch Zugabe von PIP_2 entgegengewirkt werden, wobei Calmodulin und PIP_2 sich am ehesten allosterisch beeinflussen (Cao et al., 2013). Des Weiteren verhindert die Proteinkinase C, durch Phosphorylierung von Threonin an einer Calmodulin-Bindestelle von humanem TRPV6, die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Inhibierung und führt dadurch zu einer Steigerung der TRPV6-Aktivität (Niemeyer et al., 2001).

Ein weiterer endogener Modulator von TRPV6 der Maus ist das Protein PDZK2, welches über die C-terminale PDZ-Domäne von TRPV6 bindet und einen verstärkenden Effekt auf den Ca^{2+} -Strom von TRPV6 besitzt (Kim et al., 2007).

Neben den oben genannten endogenen Modulatoren von TRPV6 existiert noch eine Vielzahl an weiteren exogen applizierbaren Substanzen, welche einen Einfluss auf TRPV6 haben (Tabelle 4.1). Das kleine membranpermeable Molekül 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) ist ein Modulator von einer Vielzahl an TRP-Kanälen. In Bezug auf humanen TRPV6 wurde eine Bindung von 2-APB in eine von den Transmembrandomänen S1-S4 gebildeten „Tasche“ beschrieben, welche zu einer Inhibition von TRPV6 durch dessen Schließung führt (Kovacs et al., 2012; Singh et al., 2018b). Im Kontrast hierzu fand Voets et al. heraus, dass 2-APB einen potenzierenden Effekt auf den Ionenfluss von mouse TRPV6 besitzt (Voets et al., 2001). Bei weiteren Substanzen, wie Ruthenium-Rot, Soricidin, THCv, Xestospongine C, modifiziertes TH-1177, Phenyl-Cyclohexyl-Piperazin cis-22a und 3OG, konnte ein inhibitorischer Effekt auf humanen/mouse/rat TRPV6 nachgewiesen werden (Bowen et al., 2013; Cunha et al., 2020; Haverstick et al., 2000; Hoenderop et al., 2001; Janssens et al., 2018; Landowski et al., 2011). Selbiges gilt für den selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen, welcher über einen möglicherweise Östrogenrezeptor-unabhängigen Weg zu einer Inhibition von TRPV6 führt (Bolanz et al., 2008; Bolanz et al., 2009).

4.5.4 Rolle in Pathologien

Ein grundlegender Punkt besteht darin, dass, im Vergleich zum gesunden Gewebe, in einer Vielzahl von Tumorgeweben das TRPV6-Protein oder dessen Transkript exprimiert wird. Beispielsweise konnte in Tumoren von Prostata-, Brust- und Pankreasgewebe das TRPV6-Protein nachgewiesen werden (Song et al., 2018; Zhuang et al., 2002). Weiter darauf eingehend, konnte ermittelt werden, dass höhere mRNA-Level von TRPV6 mit einer Erhöhung des Gleason-Scores einhergehen und auch hochmaligne Prostata- und Brusttumore vermehrt TRPV6-positiv sind (Fixemer et al., 2003). Eventuell spielen dabei

Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle, die durch die Beeinflussung der Genexpression unter anderem zu einer Zellproliferation und Angiogenese führen können. Es konnte gezeigt werden, dass eine siRNA-abhängige Hemmung der TRPV6-Genexpression in Pankreastumorzelllinien mit einer verringerten Zellproliferation und erhöhten Apoptose einhergeht (Song et al., 2018). Außerdem konnte in einer klinischen Studie mithilfe des peptidischen TRPV6-Inhibitors SOR-C13 bei 23 Patienten, mit TRPV6-exprimierenden Pankreastumoren, in über 50 % der Fälle eine stabile Tumorphase erreicht werden (Fu et al., 2017).

Zusätzlich zu den Tumoren scheint TRPV6 auch bei anderen Krankheiten eine Rolle zu spielen. In Mausmodellen, in denen das Gen von TRPV6 ausgeschaltet wurde, konnte eine veränderte Calciumhomöostase festgestellt werden, die sich in einer verringerten Ca^{2+} -Absorption im Darm und Ca^{2+} -Resorption in der Niere äußert. Des Weiteren wurde ein verringertes Körpergewicht, eine Reduktion in der Knochenmineralisierung und eine vermehrte Neigung zu Haarausfall und Dermatitis festgestellt (Bianco et al., 2007). Im Gegensatz hierzu konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass bei männlichen Mäusen aufgrund einer niedrigen Ca^{2+} -Aufnahme der epididymalen Epithelzellen und somit erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen im Lumen des Nebenhodens die Fruchtbarkeit und Spermienmotilität reduziert sind (Weissgerber et al., 2012).

Im Menschen konnte eine „gain of function“ Mutation von TRPV6 festgestellt werden, die vermehrt bei Patienten, welche an Nierensteinen leiden, auftritt (Suzuki et al., 2008). Auch mehrere Formen einer „loss of function“ wurden aufgezeichnet, die sich in einer Störung der fetalen Skelettmineralisierung, einem neonatalen Hyperparathyreodismus und gestörtem Ca^{2+} -Austausch zwischen Mutter und Embryo äußern (Burren et al., 2018; Suzuki et al., 2018). Zudem ist das Krankheitsbild der Präeklampsie mit einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase assoziiert. Hierbei wurde unter anderem in Synzytiotrophoblasten der Präeklampsie-betroffenen Frauen eine verringerte mRNA- und Proteinmenge von TRPV6 im Vergleich zu denen von gesunden Frauen festgestellt (Hache et al., 2011). Auch bei der nicht-alkoholischen chronischen Pankreatitis wurden vermehrt funktionell veränderte Varianten von TRPV6 festgestellt (Sahin-Toth, 2020).

All diese Pathologien zeigen, dass TRPV6, in welcher Rolle auch immer, einen maßgeblichen Einfluss auf eine Vielzahl von Krankheitsbildern besitzt. Eine genauere Betrachtung und Charakterisierung des Ca^{2+} -Kanals können maßgeblich zu einem besseren Verständnis und damit zu einer zukünftigen Beeinflussung der Krankheitsdiagnose und des Krankheitsverlaufes beitragen.

4.6 Fragestellung

In meiner Arbeit untersuchte ich, ob die genetisch unterschiedlichen TRPV6-Varianten sich auch phänotypisch unterscheiden. Dafür beschäftigte ich mich mit der Charakterisierung der Calciumabhängigkeit der beiden humanen Varianten hTRPV6_{short} und hTRPV6_{long}, sowie mit der Variante (TRPV6_{Myotis}) aus einer Fledermaus (*Myotis brandtii*; Große Bartfledermaus). Die humanen TRPV6 Proteine unterscheiden sich dadurch, dass hTRPV6_{long} am N-terminus um 40 Aminosäuren länger ist als hTRPV6_{short}. Außerdem startet die Translation von hTRPV6_{long} an einem untypischen Triplett, nämlich ACG, welches jedoch in Methionin translatiert wird. Dieser ungewöhnliche Translationsstart ist in allen Plazentatieren, mit Ausnahme der Fledermäuse und Flughunde, konserviert. Diese beiden Gruppen besitzen als Start-Triplett wiederum ein konventionelles AUG-Triplett. Die Länge des Proteins TRPV6_{Myotis} entspricht dabei aber der Länge des humanen Kanals hTRPV6_{long}. Analysiert wurden dabei sowohl das maximale Ca²⁺ in den Zellen, als auch die Kinetik mit der die jeweiligen TRPV6-Varianten die Calciumionen leiten. Zudem betrachtete ich die Modulierbarkeit des Calciumeinstroms durch bereits dargestellte und vermutete Einflussfaktoren. Dabei benutzte ich Modulatoren von Calmodulin (Trifluoperazin, Calmidazolium, Ophiobolin A) und der Protein Kinase C (Chelerythrin, Gö 6983, Phorbol-12-mystrat-13-acetat (PMA)). Des Weiteren betrachtete ich die mögliche Inaktivierung von TRPV6 mittels der Substanz Hexylresorcinol, welche somit eine Rolle in der Tumorthherapie spielen könnte. Des Weiteres wurde zudem das, in der Aminosäuresequenz der Porenregion von TRPV6 ähnelnde, Protein aus dem Proteobakterium auf eine mögliche Ca²⁺-Leitfähigkeit untersucht.

Das für meine Experimente benutzte Fluoreszenz-Spektrophotometer FL6500 von Perkin Elmer wurde vom Institut neu angeschafft, sodass ich dessen Benutzung und die Feineinstellung der Programme „Fast Filter“ und „Spectra Scan“ in meiner Dissertation etablierte.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaughilfe (Vacuboy Handoperator)	Integra Biosciences
AMAXA	Lonza
Beleuchtungsgerät (Leuchte HAL 100 mit Quarzkollektor)	Zeiss
CO ₂ -Inkubator mit Heißluftsterilisation (CB 150)	Binder
Fluoreszenzlichtquelle (Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C)	Zeiss
Fluoreszenz Spektralphotometer (FL 6500)	Perkin Elmer
Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030-D)	Gonotech
Kamera (Mikroskopie-Kamera AxioCam MRm)	Zeiss
Mikroskop 1 (Axio Observer Z1)	Zeiss
Mikroskop 2 (Wilovert Standard PH 20)	Hund Wetzlar
Mikroliterpipette (Discovery Comfort) (0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl)	Corning HTL
pH-Meter (7110)	WTW inoLab
Pipettierhilfe (Pipetboy comfort, Pipetboy acu2)	Integra Biosciences
Quarzglasküvette groß (1 ml) (B0631104)	Perkin Elmer
Quarzglasküvette klein (0,5 ml) (109.004F-QS)	Hellma
Schüttelinkubator (Heiz-Thermomixer HTMR131)	HLC
Sterilbank (Safe 2020, biologische Sicherheitswerkbank der Klasse 2)	Thermo Scientific
Vakuumpumpe (EcoVac Sicherheits-Absaugsystem)	Schuett-biotech
Wärmethermostat	Lauda Alpha
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R)	Heraeus Sepatech
Zeiss EPLAX VP232-2 Power Supply	Zeiss

Tabelle 5.1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Geräte

5.1.2 Software

Software	Entwickler
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 5.00	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	NIH (Entwickler: Wayne Rasband)

Origin 2020	OriginLab
Spectrum FL 1.1.0.	Perkin Elmer
Webmaxc Standard (UC Davis)	Chris Patton

Tabelle 5.2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Software

5.1.3 Substanzen und Medien

Substanz / Medium	Hersteller
BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	Biotium
Calmidazolium	Cayman Chemical
Cell Avalanche Transfection Reagent (HEK 293)	EZ Biosystems
Chelerythrin	Calbiochem
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41965-039)	Gibco / Thermo Fisher Scientific
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41966-029)	Gibco / Thermo Fisher Scientific
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Acros Organics
Englerin A	Merck
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco / Thermo Fisher Scientific
Fura-2-AM	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific
G418	Sigma-Aldrich
GlutaMAX	Gibco / Thermo Fisher Scientific
Gö6983	Cayman Chemical
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	AppliChem
Hexylresorcinol	Merck
Hygromycin B	Roth
Ionomycin	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific
MEM (Minimum Essential Medium, 31095-029)	Gibco / Thermo Fisher Scientific
Ophiobolin A	ChemCruz
Optimem	Gibco / Thermo Fisher Scientific
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Biomol / LC Laboratories
RPMI 1640 Medium (21875-034)	Gibco / Thermo Fisher Scientific
Tetracyclin Hydrochlorid	Invitrogen / Life Technologies / Thermo Fisher Scientific
Thapsigargin	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific

Trifluoperazin	Cayman Chemical
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich

Tabelle 5.3: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Substanzen

5.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Greiner

Tabelle 5.4: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

5.1.5 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -freie Ringerlösung	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose; pH = 7,2
Zusatz von variablen Ca ²⁺ -Konzentrationen für die jeweiligen Versuche	300 mM CaCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ , 30 mM CaCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 3 mM CaCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 300 µM CaCl ₂ , 100 µM CaCl ₂
2 mM Ca ²⁺ -Ringerlösung	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose; pH = 7,2
PBS (Phosphate-buffered Saline)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O; pH = 7,4

Tabelle 5.5: Auflistung und Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Lösungen

5.2 Zellen, Kultivierung und Transfektion

5.2.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Bezeichnung	Kulturbedium
HEK 293 Wildtyp (ATCC CRL-1573)	humane embryonale Nierenzelllinie	MEM 31095-029 + 10 % FKS
HEK µOR	+ stabile Expression µ-Opioid Rezeptor	DMEM 41966-029 + 10 % FKS + 100 µg/ml Hygromycin B
HEK µOR mTRPC4β	+ stabile Expression µ-Opioid Rezeptor und Maus TRPC4β	DMEM 41966-029 + 10 % FKS + 100 µg/ml Hygromycin B + 400 µg/ml G418
Flp-In 293 TRPV6b	+ stabile Expression Mensch TRPV6 (short)	DMEM 41965-039 + 10 % FKS + 1 % Glutamax + 100 µg/ml Hygromycin B
Flp-In T-Rex 293	(ThermoFisher)	DMEM 41965-039 + 10 % FKS + 1 % Glutamax + 100 µg/ml Hygromycin B
Flp-In T-Rex hTRPV6vl	+ Tetracyclin-induzierbare Expression Mensch TRPV6 (very long)	DMEM 41965-039 + 10 % FKS + 1 % Glutamax + 100 µg/ml Hygromycin B

Flp-In T-Rex myTRPV6	+ Tetracyclin-induzierbare Expression <i>Myotis Brandtii</i> TRPV6	DMEM 41965-039 + 10 % FKS + 1 % Glutamax + 100 µg/ml Hygromycin B
Flp-In T-Rex prTRPV6	+ Tetracyclin-induzierbare Expression Proteobakterium TRPV6	DMEM 41965-039 + 10 % FKS + 1 % Glutamax + 100 µg/ml Hygromycin B
RPMI 8226 (ATCC CCL-155)	humane B Lymphom Zelllinie	RPMI 1640 Medium + 10 % FKS

Tabelle 5.6: Zelllinien und Nährmedien

Auflistung, der in der Arbeit verwendeten Zelllinien mit den dazugehörigen, in der Zellkultivierung verwendeten, Nährmedien.

Die hauptsächlich in dieser Arbeit verwendete Zelllinie wird durch die „human embryonic kidney“ (HEK293) Zellen repräsentiert. HEK 293 Zellen entstammen humanen embryonalen Nierenzellen, die in den 1970iger Jahren immortalisiert wurden. Sie sind die wohl am meisten verwendeten Zelllinien zur transienten und stabilen Transfektion von heterologer DNA in den Laboren weltweit und sind somit sehr gut etabliert. Die HEK µOR und HEK µOR mTRPC4 Zelllinien wurden im Labor von Prof. Michael X Zhu, Institute for Integrative Biology and Pharmacology, University of Texas, Houston, generiert (Miller et al., 2011) und zur Verfügung gestellt. Die Flp-In TRPV6b (hTRPV6_{short}), Flp-In T-Rex hTRPV6vl (hTRPV6_{long}), Flp-In T-Rex myTRPV6 (TRPV6_{Myotis}) und Flp-In T-Rex prTRPV6 (TRPV6_{Proteo}) Zelllinien wurden von Dr. Ulrich Wissenbach, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, generiert und sind bisher nicht publiziert.

5.2.2 Flp-In-Zellkulturen

Die Flp-In T-Rex 293 Zellen sind die Grundlage zur Generierung von Zelllinien mit denen induzierbare Gene heterolog exprimiert werden können. Durch Kombination eines Gens von Interesse mit dem Flp-In T-Rex System, erhält der Benutzer die Möglichkeit das Expressionsverhalten dieses Gens, durch Zugabe von Tetracyclin, zu steuern. Maßgeblich an dem Endergebnis beteiligt sind dabei folgende Schritte (modifiziert nach Thermofisher Protokoll): Die Plasmide pFRT/lacZeo (Plasmid for flippase recognition target / β-galactosidase and Zeocin), welches durch einen Simian-Virus 40 (SV40)-Promotor reguliert wird, und pcDNA6/TR (Plasmid für CMV-Promotor, Tetracyclin-Repressor-Protein und Blasticidinresistenz-Gen), welches konstitutiv den Tetracyclin-Repressor exprimiert, werden an zufälligen Stellen im Zellgenom integriert. Das pFRT/lacZeo besitzt einerseits eine FRT-Region und zum anderen ein Resistenz-Gen gegenüber Zeocin, wodurch eine erfolgreiche Transfektion überprüft werden kann. Zusätzlich kann die erfolgreiche Transfektion von pcDNA6/TR mittels des Blasticidinresistenz-Gens überprüft werden. Als nächstes werden die Plasmide pOG44 (Plasmid mit Rekombinase Flippase und CMV-Promotor) und pcDNA5/FRT/TO (Plasmid für „Gene of interest“, FRT-Region, CMV/“tetracycline operator” (TetO₂)-Promotor und Hygromycinresistenz-Gen) cotransfiziert. Ersteres wird durch einen Cytomegalievirus (CMV)-Promotor reguliert und exprimiert die Flp-Rekombinase. Das zweite Plasmid besitzt das „Gene of interest“, eine FRT-Region, einen CMV/TetO₂-Promotor und ein Gen welches die Hygromycinresistenz vermittelt. Die Expression der

Rekombinase bewirkt nun eine homologe Rekombination zwischen den beiden FRT-Regionen, sodass das pcDNA5/FRT/TO dem SV40-Promotor nachgeschaltet ist und zusätzlich der lacZeo-Gen inaktiviert wird. Durch diese Rekombination und der Zugabe von Tetracyclin, welches über eine Aktivierung des TetO2-Promotors die Wirkung des Tetracyclin-Repressor-Proteins aufhebt, findet die Expression des Gens von Interesse statt. Ein erfolgreiches Durchführen dieses Protokolls kann mittels der integrierten Hygromycinresistenz, bei gleichzeitiger Zeocin-Sensibilität, nachgewiesen werden (Invitrogen; Thermo-Fisher-Scientific(1); Thermo-Fisher-Scientific(2)).

5.2.3 Kultivierung der Zellen

HEK-Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen in ihrem jeweils passenden Medium (Tabelle 5.6) im Inkubator kultiviert. Nach Erreichen eines nahezu konfluenten Zellrasen wurden sie entweder mit Trypsin abgelöst und verdünnt wieder ausgesät (gesplittet) oder für Experimente verwendet. Zum Splitten wurde das sich in der Zellkulturflasche befindenden Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend folgte ein Waschschrift mit „phosphate buffered saline“ (PBS)-Puffer, um Reste von fetalem Kälberserum (FKS) zu entfernen. Mithilfe von 3 ml Trypsin-Lösung, welche Trypsin in einer Konzentration von 5 g/l und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Konzentration von 2 g/l enthält, konnten die adhärenen HEK Zellen, nach einer Minute Inkubationszeit, von ihrem Untergrund durch leichtes Klopfen gegen die Flasche gelöst werden. Anschließend wurden 7 ml Zellkulturmedium mit FKS hinzugefügt, um die enzymatische Aktivität von Trypsin zu beenden. Es folgte ein Scheren der Zellen, durch zehnmaliges Pipettieren der Zellsuspension gegen die Flaschenwand, um eine Vereinzlung der Zellen zu erreichen. Nun konnte eine beliebige Menge an Zellsuspension in eine neue Kulturflasche, die bereits mit 13 ml Zellkulturmedium befüllt wurde, transferiert werden.

Wenn Zellen für Messungen gebraucht wurden, erfolgten die gleichen Schritte, wie beim Splitten. Jedoch wurde die Zellsuspension nicht in eine neue Kulturflasche, sondern in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zur weiteren Verwendung überführt. Um sicher zu gehen, dass möglichst alle Zellen überführt wurden, wurde die Zellkulturflasche noch einmal mit 5 ml Zellkulturmedium befüllt, welches viermal geschüttelt wurde, um übrig gebliebene Zellen auch mit aufzunehmen.

Bei den Flp-In T-Rex Zelllinien, wurde zur Expression des gewünschten Gens bzw. Proteins, 16-20 h vor Verwendung der Zellen eine Induktion mit 1 µg/ml Tetracyclin vorgenommen. Hierfür wurde das Medium in der Kulturflasche durch 13 ml Zellkulturmedium + 13 µl Tetracyclin (1 mg/ml) ersetzt.

5.2.4 Transiente Transfektion

Für einige Experimente wurde hTRPV6long in den Vektor „pCAGGS-IGFP („internal ribosome entry site green fluorescent protein“)-pMAX“, welcher nun die unabhängige Bildung des Ionenkanals und des „green fluorescent protein“ (GFP) erlaubt, kloniert. Als Kontrolle diente der Leervektor „IRES-GFP-pMAX“, welcher für die Bildung von GFP verantwortlich ist. Es fand die transiente Transfektion von HEK 293 Zellen mithilfe des Transfektionsreagenzes „Cell Avalanche“ statt. Dabei wurden 2 ml

Optimem in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 16 µl Cell Avalanche, sowie 20 µl des Plasmides mit IRES-GFP (IGFP) oder hTRPV6_{long}-IGFP (Klon 23) im pMAX Vektor (Ulrich Wissenbach) hinzugegeben. Nachdem das Gemisch gevortext und 15 Minuten inkubiert wurde, konnte es einer Zellkultur mit 80 - 90 %iger Konfluenz, welche vorher 16 ml neues Zellkulturmedium erhielt, hinzugefügt werden. Die Zellen wurden 24-48 h nach Transfektion für Ca²⁺ Imaging Experimente verwendet.

5.2.5 AMAXA-Protokoll

Für die Erzeugung einer großen Menge an transient transfizierten Zellen, wurde sich für die Einbringung von cDNA mittels Elektroporation entschieden. Hierbei wird unter Verwendung von elektrischer Spannung und einem spezifischen Reagenz („Nucleofector Solution“) oder alternativ Optimem, die gewünschte cDNA über die Zellmembran in die Zelle eingeschleust, sodass die Zelle anschließend das, zur cDNA gehörende, Protein, produzieren kann. Sowohl das verwendete Gerät, als auch das hierzu passende Protokoll stammte von der Firma AMAXA. Für die Transfektion von Zellen mithilfe von AMAXA wurden 1 Mio. Zellen pro Durchgang benötigt. Diese Zellmenge, die sich in Suspension befand, wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 100 µl Optimem bzw. „Nucleofector Solution“ resuspendiert. Nun folgte das Hinzufügen von 5 µg des gewünschten Plasmides (hTRPV6_{long}-IGFP-pMAX, IGFP-pMAX). Das Gemisch wurde verrührt und in eine Elektroporationsküvette umgefüllt. Nun konnte der eigentliche Prozess der Elektroporation erfolgen, indem das Programm gestartet wurde. Nach diesem Schritt wurde die Zellsuspension in 500 µl 10%-FKS-haltigem Medium aufgenommen und konnte nun in die Zellkulturflasche/-schälchen gegeben werden. Nach 24 und 48 Stunden konnte das Ergebnis der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

5.2.6 Darstellung und Auswertung der Transfektionseffizienz

Wie exemplarisch aufgeführt, wurde von jeder gemessenen Zellpopulation eine Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zunächst fand zur Ermittlung der Zellzahl im Sichtfeld ein Durchlichtsaufnahme statt (Abbildung 5.1 A). Anschließend wurde sowohl die Fura-2-Beladung (Abbildung 5.1 B), als auch die erfolgreiche Transfektion durch Darstellung der GFP-fluoreszierenden Zellen (Abbildung 5.1 C) geprüft. Zuletzt fand ein Zusammenlegen / „Merge“ der drei Bilder statt (Abbildung 5.1 D).

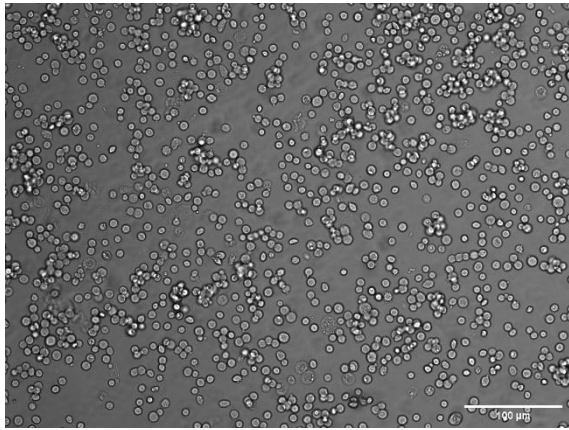
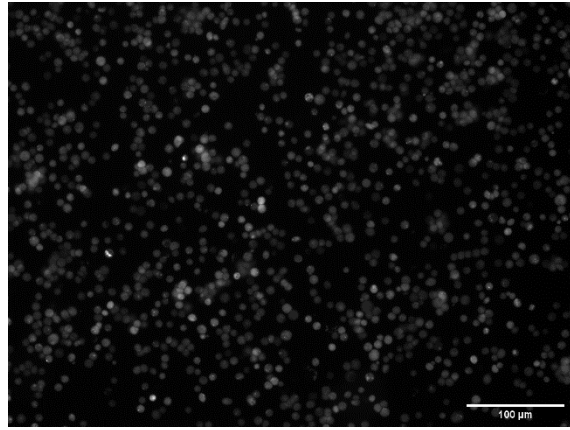
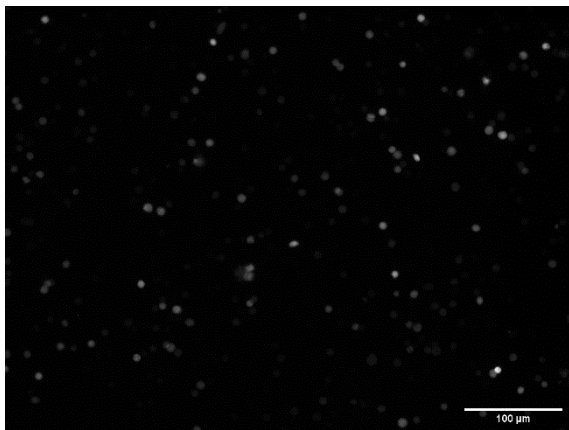
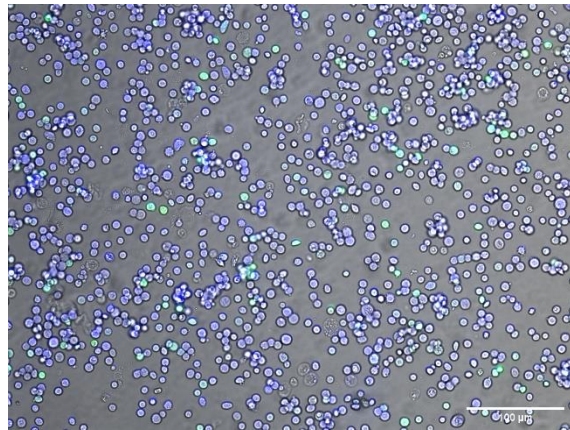
A HEK Durchlicht**B HEK Fura-2****C HEK GFP****D HEK Merge**

Abbildung 5.1: Mikroskopische Aufnahmen von HEK $hTRPV6_{long}$ IGFP Zellen

Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von HEK Zellen, die mit $hTRPV6_{long}$ IGFP transfiziert wurden. Die Aufnahmen fanden unter Anregung des GFP-Farbstoffes (A), Anregung des Fura-2-Farbstoffes (B), Verwendung der Durchlichtfunktion (C) und dem Zusammenlegen („Merge“) aller drei Aufnahmen (D) statt (Durchlicht = grau; Fura-2 = blau; GFP = grün). Der Maßstab ist mittels eines Balkens, der 100 μm entspricht, angegeben.

Zur exakten Quantifizierung wurden die mikroskopischen Aufnahmen mit zwei Methoden ausgewertet. Es erfolgte zum einen die per Hand durchgeführte Zählung der in der Durchlichtaufnahme erkennbaren Zellen, welche anschließend zu der Anzahl der im GFP-Filter darstellbaren Zellen (erfolgreich transfizierte Zellen) ins Verhältnis gesetzt wurde. Zum anderen wurde über die Aufnahme der GFP-transfizierten Zellen, mithilfe des Programms „Fiji“ bzw. „ImageJ“, eine Threshold definiert. Diese bewirkt die Festlegung eines Helligkeitsgrenzwertes mit dem anschließend der prozentuale Anteil aller darüber liegenden Strukturen angegeben werden kann. Der Vorteil bei letzter genannten Methode besteht darin, dass auch die unterschiedlich starke Ausprägung der Fluoreszenz in die Messung mit einfließt.

5.3 Messung zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2

5.3.1 Fura-2

Fura-2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff der abhängig von einer Bindung mit Ca^{2+} sein Anregungsspektrum ändert. Dabei findet die Erfassung der Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm statt. Während Fura-2 Ca^{2+} bindet, kommt es bei einer Anregung mit 340 nm zu einer Zunahme des Emissionssignales. Im Gegensatz dazu nimmt die Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm ab (Abbildung 5.2 A). Die Fluoreszenz bei einer Anregung von 360 nm ist unabhängig von einer Bindung von Ca^{2+} und wird als isosbestische Wellenlänge bezeichnet. Damit bietet Fura-2 die Möglichkeit die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz mit zwei Wellenlängen zu detektieren und die sogenannte Ratiomethode zu verwenden. Dabei findet abwechselnd eine Anregung mit 340 nm und 380 nm Licht statt, während die Fluoreszenz bei 510 nm detektiert wird.

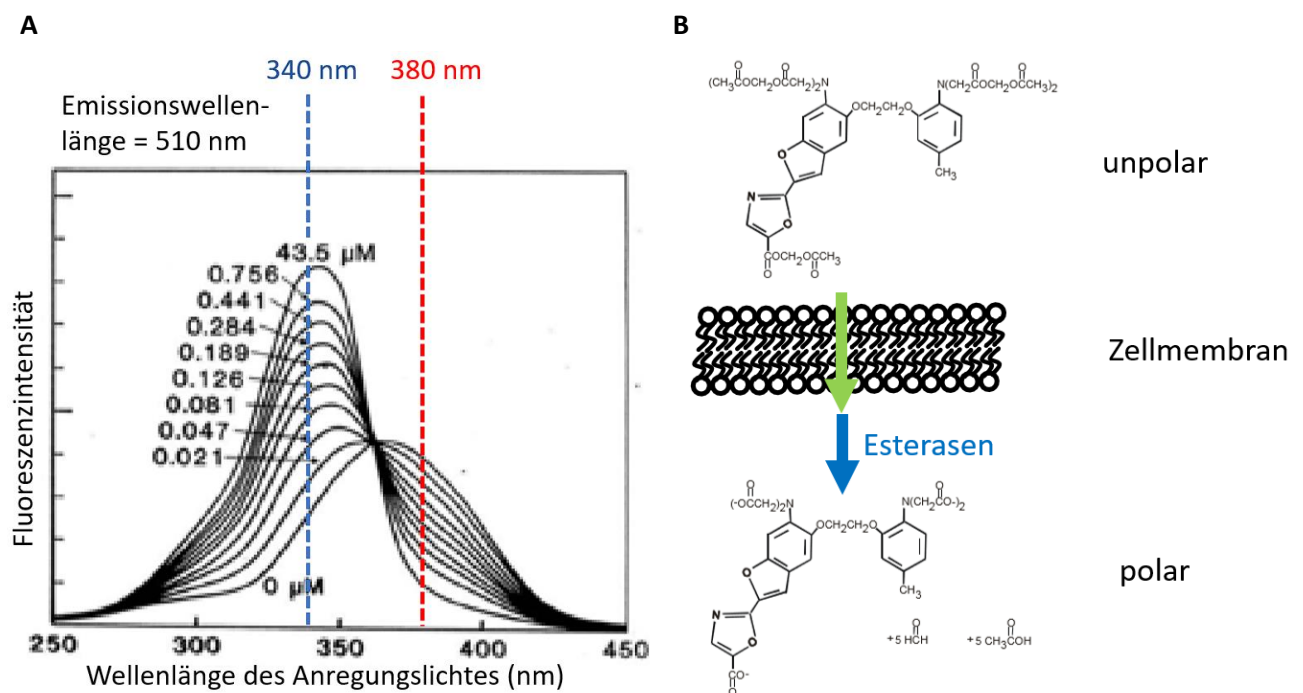


Abbildung 5.2: Fura-2 Anregungsspektrum & Schema des Zellbeladungsvorganges

Anregungsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 und die dabei erhaltenen Fluoreszenzintensitäten, welche bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm, in Anwesenheit verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen, detektiert werden. Die standardmäßigen Anregungswellenlängen von Fura-2 sind in blau (340 nm) und rot (380 nm) verdeutlicht (A) (adaptiert nach (TEFLabs: Fluorescent ion indicator handbook)). Schematische Darstellung der Zellbeladung mit Fura-2 (B) (adaptiert nach (Held, 2006)).

Theoretisch könnte jede Einzelwellenlänge zur Erfassung von Ca^{2+} -Änderungen verwendet werden (Abbildung 5.2 A). Jedoch ist die Fluoreszenz bei Anregung mit nur einer Wellenlänge neben der Ca^{2+} -Konzentration auch von vielen weiteren Faktoren, wie beispielsweise von der Menge an Fluoreszenzfarbstoff in der Zelle, abhängig. Da die Beladung der Zellen mit Fura-2 immer unterschiedlich ist, ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Messungen nicht immer möglich. Beim Ratioverfahren, welches bei Fura-2 angewendet werden kann, werden zwei Wellenlängen zur Anregung verwendet. Durch Bilden des Verhältnisses der Fluoreszenz der beiden Anregungswellenlängen (Ratio), können die Faktoren, welche die Fluoreszenz nach Anregung mit einer Wellenlänge Ca^{2+} unabhängig beeinflussen, vernachlässigt werden. Hieraus ergibt sich, dass die Ratiowerte hauptsächlich Ca^{2+} abhängig sind. Auch Experimente mit unterschiedlicher Beladung an Fluoreszenzfarbstoff können somit besser verglichen werden.

Das Fura-2-Molekül besitzt mehrere negativ geladenen Carboxylgruppen durch die eine Ca^{2+} -Bindung vermittelt wird. Hierdurch ist das Molekül hydrophil und kann die Zellmembran nicht überwinden. Dieser Schritt ist jedoch für die Bestimmung von intrazellulären Ca^{2+} -Veränderungen essentiell. Aus diesem Grund wurde Fura-2-AM für die Experimente verwendet. Dabei handelt es sich um Fura-2-Moleküle, deren geladene Carboxylgruppen durch eine Esterbindung von Acetoxymethylgruppen (AM) neutralisiert wurden. Dies bewirkt eine gesteigerte Lipophilie, sodass der Farbstoff nun die Zellmembran überwinden kann (Takahashi et al., 1999). Durch im Zytosol vorkommende unspezifische Esterasen, kommt es zu einer Hydrolyse des Acetoxymethylesters (Homolya et al., 1993). Das Fura-2-Molekül befindet sich nun wieder in einem hydrophilen Zustand und kann die Zellmembran nicht mehr passieren (Abbildung 5.2 B). Des Weiteren bleibt durch die Hydrolyse des Moleküls der Konzentrationsgradient für die veresterte Form erhalten, sodass, durch passive Diffusion, eine Anreicherung des Farbstoffes in der Zelle stattfinden kann.

5.3.2 Fura-2-Kalibrierung

Es besteht die Möglichkeit, die Ratio-Werte aus den Fura-2-Messungen in intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen umzurechnen. Hierzu wurde von Grynkiewicz et al. (Grynkiewicz et al., 1985) eine Kalibrationsgleichung erstellt. Diese besitzt eine hohe Sensibilität auf sich verändernde Einflussfaktoren (z.B. Lichtintensität, Filterstärke), weshalb sie nur für das Messgerät verwendet werden kann, in der die Kalibration stattgefunden hat.

Die Gleichung lautet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = (\text{Kd} * (\text{R} - \text{Rmin})) / ((\text{Rmax} - \text{R}) * (\text{Sf2} / \text{Sb2}))$$

Mit dieser Gleichung kann die intrazellulär herrschende Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus der gemessenen Ratio F340 / F380 (R) und mithilfe von fünf Parametern ermittelt werden. Zum einen fließt die Dissoziationskonstante (Kd) von Fura-2 ein. Zum anderen wird die ermittelte Ratio von Fura-2 in der

Ca²⁺-freien (R_{min}) und Ca²⁺-gebundenen (R_{max}) Form benötigt, sowie die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei 380 nm in der Ca²⁺-freien (Sf₂) und Ca²⁺-gebundenen (Sb₂) Form.

Um die Kalibration durchzuführen wurden somit drei Lösungen benötigt:

1. Eine Lösung in der die Fura-2-Moleküle in der Ca²⁺-freien Form vorliegen → 10 µM Ionomycin, 10 mM BAPTA (Lösung 1)
2. Eine Lösung in der die Fura-2-Moleküle in der Ca²⁺-gebundenen Form vorliegen → 10 µM Ionomycin, 10 mM Ca²⁺ (Lösung 2)
3. Eine Lösung in der die Ca²⁺-Konzentration definiert ist, sodass eine Bestimmung der effektiven K_d von Fura-2 unter den vorhandenen Messbedingungen möglich ist → 10 µM Ionomycin, 10 mM BAPTA, 5 mM Ca²⁺ (Lösung 3)

In allen drei Lösungen ist der Ionophor Ionomycin enthalten. Dieser bewirkt eine Permeabilitätssteigerung der Zellmembran für Ca²⁺ und erlaubt somit eine Beeinflussung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen durch extrazelluläre Addition von Ca²⁺, d.h. über die Ca²⁺-Konzentration in der Badlösung kann die zytosolische Ca²⁺-Konzentration eingestellt werden.

Beim BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)-Molekül handelt es sich um einen Chelator, der durch seine vier Carboxylgruppen die Fähigkeit besitzt zwei Calciumionen zu binden. Dieses Molekül wird eingesetzt um die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zu minimieren (Lösung 1) oder um eine spezifische Ca²⁺-Konzentration einzustellen (Lösung 3).

Das Einstellen einer spezifischen Ca²⁺-Konzentration wurde für das Ermitteln der gerätespezifischen, effektiven Dissoziationskonstante (K_{d,eff}) von Fura-2 benötigt. Hierfür wurde 5 mM Ca²⁺ und 10 mM BAPTA miteinander kombiniert, um eine freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von 225 nM zu erzeugen. Berechnet wurde dies mithilfe der Software „WEBMAXC STANDARD“. Zur Kalkulation der K_{d,eff} ist eine Umstellung der Kalibrationsgleichung notwendig:

$$K_{d,eff} = ([Ca^{2+}]_i * (R_{max} - R)) / ((R - R_{min}) / (Sf_2 / Sb_2))$$

Kalibrationsmessungen siehe Kapitel 6.8 „Fura-2-Kalibration“.

5.4 Fura-2-basierte zytosolische Ca²⁺-Messungen mittels Fluoreszenz-Spektrophotometers

Zytosolische Ca²⁺-Signale, die auf der Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzänderung von Ca²⁺-sensitiven intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffen beruhen, können entweder auf Einzelzellebene mithilfe bildgebender Verfahren, wie der Fluoreszenzmikroskopie, oder in einer Population von vielen Zellen gleichzeitig („bulk“) detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ca²⁺-Signale vieler Zellen gleichzeitig als Fluoreszenzsignale in einer Küvette mithilfe eines Fluoreszenz-Spektrophotometers erfasst.

5.4.1 Zellvorbereitung für die Calcium Imaging Experimente in der Küvette

Für Calcium Imaging Experimente in der Küvette, wurden die Zellen in einem nach Singh et al. (Singh et al., 2017) adaptierten Protokoll vorbereitet und mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen. Als erstes wurde, die sich in einem Zentrifugenröhrchen befindliche Zellsuspension, bei 68 x g für 5 Minuten zentrifugiert, sodass sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ein Zellpellet bildete. Nun wurde der Überstand entfernt. Je nach subjektiver Einschätzung der Größe des Zellpellets wurde zur Verbesserung der Beladung mit Fura-2 auch ein Teil der Zellen entfernt. Anschließend wurde der Zellpellet in 1 oder 2 ml 37°C warmer 0 Ca^{2+} -Ringerlösung (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7.4) resuspendiert. Hinzu kamen 5 bzw. 10 μl in DMSO gelöstes Fura-2 mit einer Konzentration von 1 mM, sodass zur Beladung der Zellen in der Zellsuspension am Ende eine Fura-2-Konzentration von 5 μM vorlag. Die Zellen im Zentrifugenröhrchen wurden dann für 45 Minuten im Inkubator, Wasserbad oder Schüttelinkubator bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei waren die Zentrifugenröhrchen mit Aluminiumfolie umwickelt, um den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 vor dem Ausbleichen durch das Licht zu schützen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 68 x g für 5 Minuten, das Entfernen des Überstandes, mit dem extrazellulären Fura-2, und die Resuspension des Zellpellets in 1 ml 37°C warmer 0 Ca^{2+} -Ringerlösung. Nun wurden die Zellen bei Raumtemperatur im Dunkeln für 25 Minuten erneut inkubiert, wobei gelegentliches Schütteln dafür sorgte, dass die Zellen sich nicht auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens absetzten. Nach einer dritten Zentrifugation bei 68 x g für 5 Minuten und Resuspendieren in 1 ml neuer 0 Ca^{2+} -Ringerlösung wurde die Zellzahl bestimmt.

In einem Teil der Experimente („inverses Protokoll“) wurde statt der 0 Ca^{2+} -Ringerlösung eine 2 mM Ca^{2+} -Ringerlösung (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7.4) verwendet.

Um die Anzahl der für die Experimente einzusetzenden Zellen zu bestimmen und eine entsprechende Verdünnung zu ermitteln, wurden die Zellen gezählt. Hierbei wurde eine „Neubauer improved“-Zählkammer verwendet (Abbildung 5.3 links). Zu Beginn wurden 10 μl der Zellsuspension oder einer Verdünnung (z.B. 1:10) in die Zählkammer hinein pipettiert. Die Zählkammer zeigt neun Großquadrate, die jeweils eine Fläche von 1 mm^2 besitzen. Da die Kammerhöhe nach Auflage eines Deckglases 0.1 mm beträgt, ist das Volumen über einem Großquadrat 0.1 mm^3 , was 0.1 μl entspricht. Die vier großen Eckquadrate sind in jeweils 16 kleine Quadrate mit einer Fläche von je 0.0625 mm^2 unterteilt (Abbildung 5.3 rechts). Unter Benutzung eines Mikroskops (Wilovert Standard PH 20, hund WETZLAR) und eines 10x Objektivs wurde die Anzahl der Zellen in den vier großen Eckquadraten gezählt, wobei nur zwei der vier Ränder miteinbezogen wurden. Aus den erhaltenen vier Zahlen der vier Eckquadrate wurde der Mittelwert gebildet und die Zelldichte über die Formel Zellzahl pro Eckquadrat (entspricht 0.1 μl) x 10.000 als Zellzahl/ml der Zellsuspension errechnet. Bei initialer Verdünnung (siehe oben) wurde der entsprechende Verdünnungsfaktor miteinbezogen. Für die anschließenden Ca^{2+}

Messungen wurden die Zellen dann mithilfe der 0 Ca^{2+} -Ringerlösung auf 0.5 bis 2.5 Mio. Zellen/ml verdünnt.

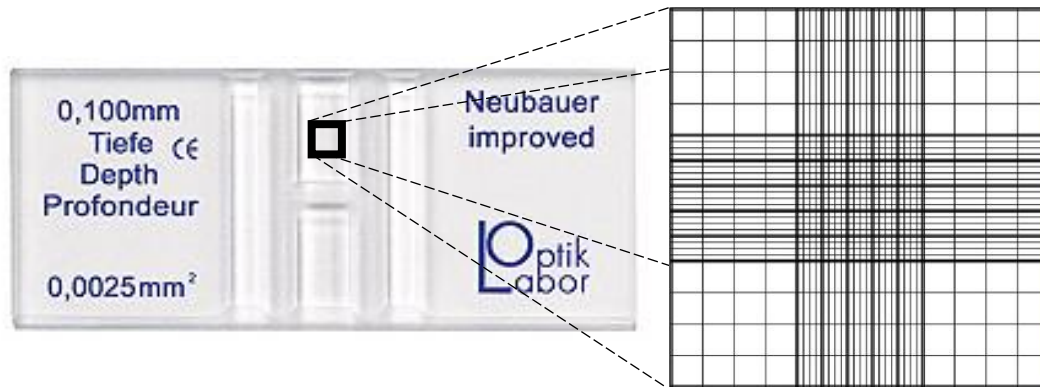


Abbildung 5.3: Aufbau Zählkammer

Die Abbildung zeigt die „Neubauer improved“-Zählkammer (links) und eine Vergrößerung des in das Glas eingefrästen Quadratrasters (rechts). Das Quadratraster wird zum Zählen von Zellen in Suspension benötigt (adaptiert nach Onlinequellen (LO-Laboroptik; MSG-Praxisbedarf))

Teilweise wurden die Zellen vor der Zellzählung mit Trypanblau gefärbt, um die Zellviabilität nach Durchlaufen des Fura-2-Protokolls zu beurteilen. Dafür wurde ein Aliquot von 0.2 ml Zellsuspension nach dem Beladen mit Fura-2 entnommen. Anschließend wurden 0.3 ml „phosphate buffered saline“ (PBS) und 0.5 ml Trypanblau-Färbelösung hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Tote Zellen mit einer beschädigten Zellmembran nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop dunkelblau. Durch Zählung der nichtgefärbten Zellen und der Gesamtzellzahl konnte der Anteil der lebenden Zellen ermittelt werden.

5.4.2 Calcium Imaging in der Küvette

Die zytosolischen Calciummessungen in der Küvette wurden mithilfe des im Institut neu angeschafften Fluoreszenz-Spektrophotometers FL6500 von PerkinElmer (Abbildung 5.4 A) und der dazugehörigen Software (Spectrum FL 1.1.0.) durchgeführt. Im Programm wurde mit der Methode „Fast Filter“ gearbeitet. Vor den eigentlichen Experimenten wurde die Methode zum Ca^{2+} Imaging in der Küvette mit Hilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers etabliert und hierzu verschiedene Einstellungen getestet. Nach Etablieren waren die Einstellungen für die eigentlichen Experimente wie folgt:

Filter Mode → Excitation FFA

Background → On

Immediate Mode → On

Source Setup:

Source Mode → Pulse

Luminescence Mode → Fluorescence

Excitation Error → On

Dark Application → Initial Dark

Flash Power → 80 kW

Frequency → 100 Hz

Excitation Mono Setup:

Excitation Slit Width → 20 nm

Excitation Filter → Air

Accessory Setup:

Accessory → Fast Filter

Extra Accessories → No Accessory

Setup Filter → Fura-2 (Numerator = 340 nm; Denominator = 380 nm)

Stirrer Control → Medium

Emission mono Setup:

Emission Wavelength → 515 nm

Emission Slit Width → 20 nm

Emission Filter → Air

Detector Setup:

Photomultiplier Voltage → Medium, 550 V

Response Time → 0.1 s

Emission Correction → On

PMT Gain → x1

Time Driver Settings:

Duration → variierte je nach Experiment (in Sekunden angegeben)

Data Interval → 1 s

Im Fast Filter Modus wird das Licht durch eine Lichtquelle (Xenon Lampe) in 100 Hz Blitzen generiert. Dieses wird anschließend durch ein Filterrada mit einem 340 nm und einem 380 nm Filter auf die Probe, die sich in der Küvette befindet, gesendet. Das Filterrada dreht sich mit einer Umdrehungsfrequenz von 1 Hz. Die erzeugte Fluoreszenz wird über einen Bandpassfilter von 515 ± 20 nm von einem Photomultiplier, im Winkel von 90° zur Lichtstrecke stehend, detektiert. Während der Messung werden die Zellen in Suspension stetig mit einem kleinen Magnetührer in Bewegung gehalten, sodass sie nicht auf den Boden sinken und gleichmäßig in der Suspension verteilt bleiben (Abbildung 5.4 B, C).

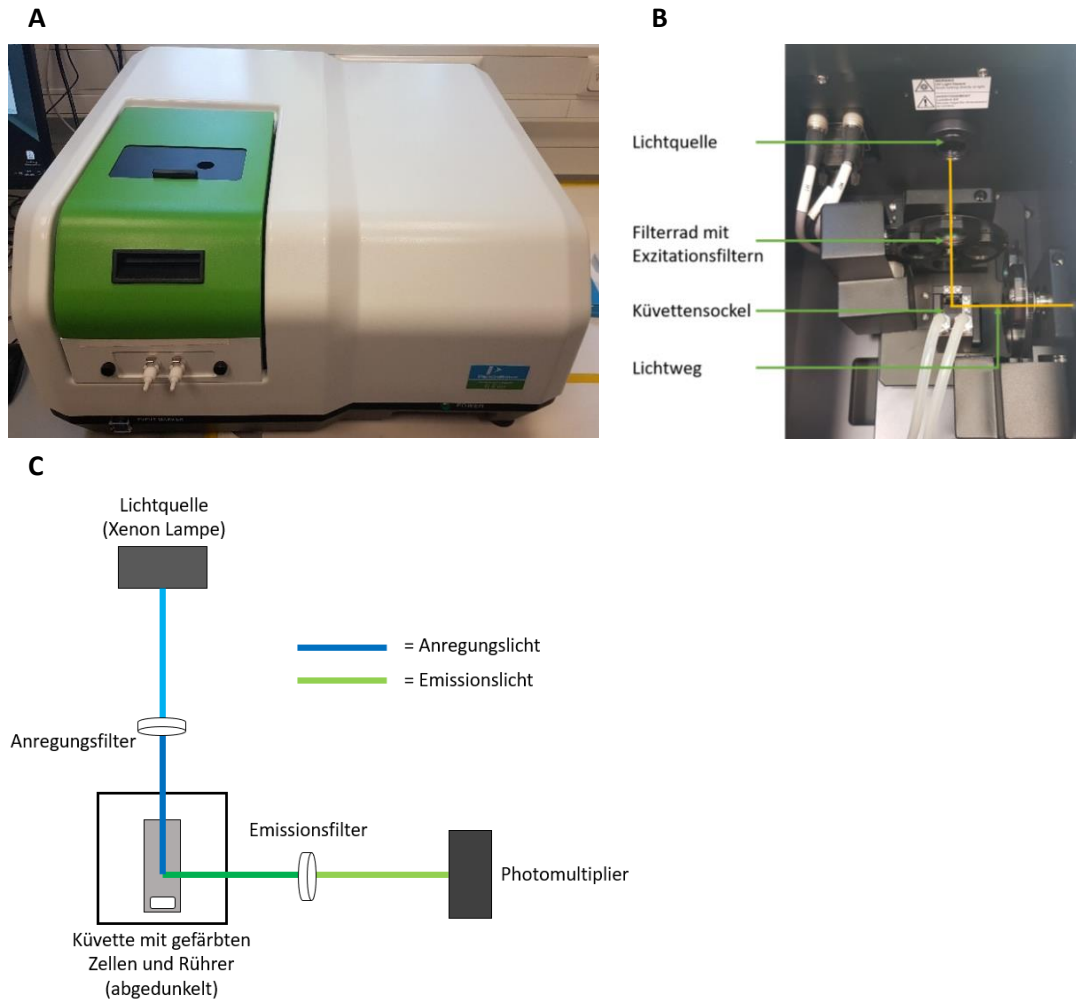


Abbildung 5.4: Aufbau Fluoreszenz-Spektrophotometer

Abbildung des Fluoreszenz-Spektrophotometer FL6500 von PerkinElmer mit grüner Klappe zum Schutz des Küvettenmoduls vor Lichteinstrahlung und schwarzem Applikationsfenster (A). Im Inneren befindet sich der in allen Experimenten benutzte Einsatz „Fast Filter“ (B). Schematische Darstellung des Lichtweges (C).

Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden so verdünnt, dass eine Zellkonzentration zwischen 0,5 und 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. 1 ml der Zellsuspension wurde in die vorher mit 70% Ethanol und destilliertem Wasser gereinigte Quarzglasküvette gegeben (PerkinElmer Part-No. B0631104). Nachdem das Experiment gestartet und benannt wurde, wurde durch eine mit 0 Ca²⁺-Ringerlösung gefüllte zweite Küvette der Hintergrund (Background) bestimmt. Nach einem Küvettenwechsel konnte nun die Messung beginnen. Dabei befindet sich die Küvette im abgedunkelten Photometer. Zur Zugabe von weiteren Substanzen (Tabelle 5.7 & Tabelle 5.8), wurde das Applikationsfenster des Photometers (Abbildung 5.4 A) nur minimal geöffnet, um Signalstörungen durch Licht zu vermeiden. Aus demselben Grund wurde der Raum während der Messung abgedunkelt. Nachdem die Messung abgeschlossen war, wurde die Küvette wieder mit 70 %igem Ethanol und destilliertem Wasser mehrmals ausgespült und getrocknet.

Die zu applizierenden Substanzen wurden in zehnfach konzentrierter Form hinzugegeben, um eine Verdünnung der Zellsuspension so gering wie möglich zu halten. Zu beachten war, dass bei Zugabe der Applikationslösung auch das Gesamtvolumen steigt und hierdurch wiederum die Endkonzentration beeinflusst wird. Deshalb wurde sich dazu entschieden, 10 % des Endvolumens (1,1 ml) als Applikationsvolumen (110 µl) zu wählen. Bei einem anfänglichen Küvetteninhalt von 1 ml sehen die Applikationen von unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen wie folgt aus:

Applikationskonzentration in 110 µl	Endkonzentration in 1,11 ml
300 mM Ca ²⁺	30 mM Ca ²⁺
100 mM Ca ²⁺	10 mM Ca ²⁺
30 mM Ca ²⁺	3 mM Ca ²⁺
10 mM Ca ²⁺	1 mM Ca ²⁺
3 mM Ca ²⁺	300 µM Ca ²⁺
1 mM Ca ²⁺	100 µM Ca ²⁺
300 µM Ca ²⁺	30 µM Ca ²⁺
100 µM Ca ²⁺	10 µM Ca ²⁺

Tabelle 5.7: Applikationen bei der Ca²⁺-Stimulation von TRPV6-Varianten

Bei Zugabe von pharmakologisch wirksamen Substanzen wurden auch diese in einer zehnfach konzentrierten Lösung hinzugegeben. Folgte anschließend eine weitere Applikation mit Ca²⁺, so wurde die Substanzkonzentration so gewählt, dass sie mit denen in der momentanen Küvettenlösung identisch waren:

	Applikationskonzentration in 110 (1.) bzw. 120 µl (2.)	Endkonzentration
1. Applikation	300 µM Trifluoperazin	30 µM Trifluoperazin in 1,11 ml
2. Applikation	30 mM Ca ²⁺ + 30 µM Trifluoperazin	3 mM Ca ²⁺ + 30 µM Trifluoperazin in 1,23 ml

Tabelle 5.8: Applikationsvorgehen bei der modulatorabhängigen Ca²⁺-Stimulation von TRPV6-Varianten

5.5 Spektralscan in der Küvette

Im Verlauf der Experimente ergab sich die Vermutung, dass einige Substanzen, unabhängig von der Ca²⁺ Konzentration in den Zellen, über ihre endogenen spektralen Eigenschaften das Fura-2 Fluoreszenzsignal beeinflussen könnten. Um dies zu überprüfen, wurde beim Fluoreszenz-Spektrophotometer FL6500 von PerkinElmer und der dazugehörigen Software (Spectrum FL 1.1.0.) mit dem Programm „Spectra Scan“ gearbeitet. Hierbei wurde im Verlauf einer Anregung zwischen 200 nm und 480 nm die Fluoreszenz der Substanzen bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm in der Küvette untersucht. Dabei lauteten die Feineinstellungen für die Hauptexperimente wie folgt:

Scan Type → Excitation Scan

Background Correction → On

Source Setup:

Source Mode → Pulse

Luminescence Mode → Fluorescence

Excitation Error → On

Dark Application → Initial Dark

Flash Power → 80 kW

Frequency → 100 Hz

Excitation Mono Setup:

Excitation Start Wavelength → 200 nm

Excitation End Wavelength → 480 nm

Excitation Slit Width → 1 nm

Excitation Filter → Air

Scan Speed → 240 nm / min

Accumulation Number → 1

Accessory Setup:

Accessory → Fast Filter (kein Filter stand im Lichtweg)

Extra Accessories → No Accessory

Stirrer Control → Medium

Emission Mono Setup:

Emission Wavelength → 515 nm

Emission Slit Width → 20 nm

Emission Filter → Air

Detector Setup:

Photomultiplier Voltage → Medium, 550 V

Response Time → 0.5 ns

Emission Correction → On

PMT Gain → x1

Scan Mode:

Single Scan; Intensity

Im Spectra Scan Modus wird Licht einer Lichtquelle (Xenon Lampe) in 100 Hz Blitzen generiert. Mittels eines Emissionsfilters wird ausschließlich ein Bandpass von 1 nm Breite erzeugt. Dieser deckt über die Dauer des Experimentes (70 Sekunden) den Bereich von 200 nm bis 480 nm ab. Die einzelnen Anregungswellenlängen treffen auf die sich in der Küvette befindliche Probe, sodass im 90° Winkel die jeweilige Fluoreszenz über einen Bandpassfilter von 515 ± 20 nm von einem Photomultiplier

aufgezeichnet werden kann. Auch in diesem Modus wurde die Flüssigkeit mithilfe eines Magnetrührers in Bewegung gehalten, um gleiche Bedingungen zum Fast Filter Modus zu gewährleisten.

Applikationskonzentration in 110 µl	Endkonzentration in 1,11 ml
10 mM Trifluoperazin	1 mM Trifluoperazin
3 mM Trifluoperazin	300 µM Trifluoperazin
1 mM Trifluoperazin	100 µM Trifluoperazin
300 µM Trifluoperazin	30 µM Trifluoperazin

Tabelle 5.9: Substanzendkonzentrationen in Bezug auf die Applikationskonzentration

Auflistung der Endkonzentration der jeweiligen Substanz in Bezug auf die Applikationskonzentration, beispielhaft für Trifluoperazin dargestellt.

Applikationskonzentration in 120 µl	Endkonzentration in 1,23 ml
30 mM Ca ²⁺ + 1 mM Trifluoperazin	3 mM Ca ²⁺ + 1 mM Trifluoperazin
30 mM Ca ²⁺ + 300 µM Trifluoperazin	3 mM Ca ²⁺ + 300 µM Trifluoperazin
30 mM Ca ²⁺ + 100 µM Trifluoperazin	3 mM Ca ²⁺ + 100 µM Trifluoperazin
30 mM Ca ²⁺ + 30 µM Trifluoperazin	3 mM Ca ²⁺ + 30 µM Trifluoperazin

Tabelle 5.10: Substanzendkonzentrationen in Bezug auf die Applikationskonzentration inklusive Ca²⁺

Darstellung der zusätzlichen Applikationen von Ca²⁺, welche für die auf der rechten Seite von Tabelle 5.9 gezeigten Trifluoperazin-Lösungen vorgenommen wurden.

Zwei Quarzglasküvetten wurden zu Beginn mit 70% Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurde beide Küvetten mit 1 ml 0 Ca²⁺-Ringerlösung befüllt. Während zur einen Küvette 110 µl 0 Ca²⁺-Ringerlösung hinzugefügt wurden, erhielt die Andere 110 µl der Substanz in 10facher Endkonzentration (Tabelle 5.9). Bei einem Teil der Experimente folgte nach der Messung eine zusätzliche Applikation von Ca²⁺, wobei die Konzentration von Trifluoperazin konstant gehalten wurde (Tabelle 5.10).

Nach Start und Benennung des Experimentes wurde je nach Experiment zuerst der Background anhand der Küvette ohne Substanzzusatz bestimmt. Es erfolgte ein Wechsel der Küvette, sodass die Messung der Ca²⁺ unabhängigen Eigenfluoreszenz stattfinden konnte.

5.6 Auswertung der Messdaten

Aus den Hintergrund-korrigierten (Hintergrund = Küvette mit Badlösung ohne Zellen; siehe 5.4.2) Fura-2-Fluoreszenzwerten der zytosolischen Ca²⁺-Messungen am Spektrophotometer bei Anregung mit 340 nm und 380 nm wurden in Microsoft Excel 2016 Ratiowerte (F340 / F380) berechnet. Diese wurden dann als Fura-2 Ratio (F340 / F380) über die Zeit in IgorPro 6.31 (Wavemetrics) als Grafiken dargestellt (Abbildung 5.5 A, B).

5.6.1 Isolierung der TRPV6-abhängigen zytosolischen Ca²⁺-Signale

Zur Analyse der durch extrazelluläres Ca²⁺ induzierten intrazellulären Fura-2 (Ca²⁺) Signale wurden die F340 / F380-Basiswerte (BW), d.h. der jeweilige Mittelwert 0-90 s vor Applikation von Ca²⁺, abgezogen (Abbildung 5.5 C, D). Um die durch TRPV6 zustande gekommenen Ca²⁺ Signale zu isolieren, wurden anschließend die Kurven der entsprechenden Kontrollzellen (ohne TRPV6) (Abbildung 5.5 D) für die jeweiligen extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen aus mehreren Experimenten gemittelt und deren Signale über die Zeit von den entsprechenden Messungen bei den jeweiligen extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen in den TRPV6-exprimierenden HEK Zellen (Abbildung 5.5 C) abgezogen (Abbildung 5.5 E).

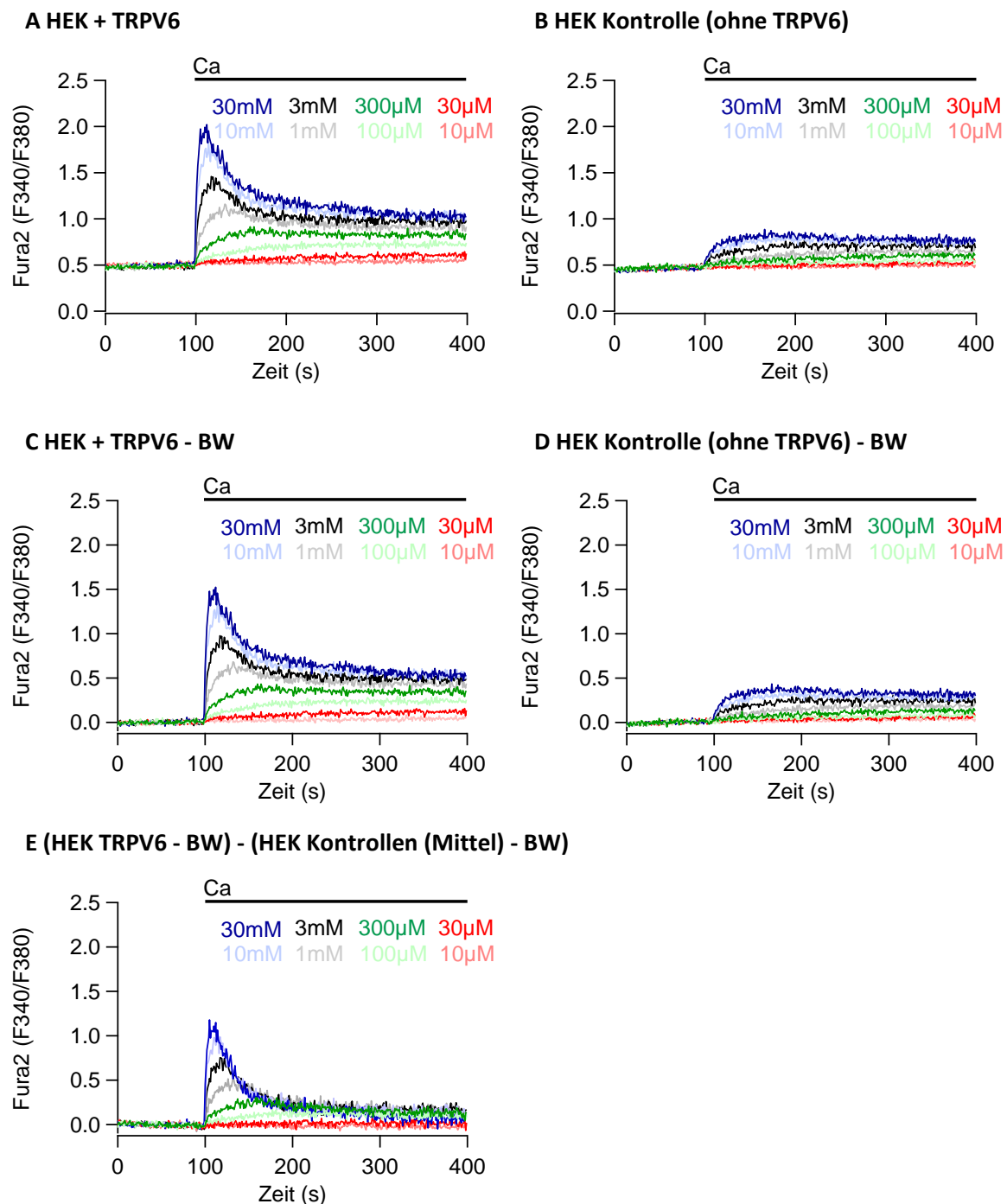


Abbildung 5.5: Vorbereitung der Messdaten zur Auswertung

Beispiele für zytosolische Ca^{2+} -Signale (Fura-2 F340 / F380) bei Applikation verschiedener extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen in TRPV6-exprimierenden HEK Zellen (A) und HEK Kontrollzellen ohne TRPV6 (B). Vor Applikation befanden sich die Zellen in einer Ca^{2+} -freier Lösung. Die Basiswerte (BW) in Ca^{2+} -freier Lösung, errechnet als arithmetisches Mittel der Werte zwischen Sekunde 0 bis 90, wurden anschließend von den einzelnen Kurven abgezogen (C, D). Zur Darstellung und Auswertung der lediglich durch TRPV6-induzierten Ca^{2+} -Signale wurden mehrere Messungen von Kontrollzellen (ohne TRPV6) für die verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen gemittelt und von den entsprechenden Messungen in den TRPV6-exprimierenden HEK Zellen abgezogen (E).

5.6.2 Abhängigkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Amplituden vom extrazellulären Ca^{2+}

Aus den wie oben beschriebenen korrigierten Messungen wurden die Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Signale (Fura-2 F340 / F380) nach Zugabe der verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ermittelt, einfach logarithmisch gegen die jeweilige Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen und eine Dosis-Wirkungs-Kurve ($f(x) = w_0 + (w_1 - w_0) * (1 / (1 + (w_2 / x)^{w_3}))$); $w_0 = y_{\min}$, $w_1 = y_{\max}$, $w_2 = \text{Kd}$, $w_3 = n$ (positiv für eine steigende Funktion, negativ für eine abfallende Funktion)), mithilfe der IgorPro Fitfunktion, erstellt (Abbildung 5.6 A). Da auffiel, dass bei einer maximal eingesetzten extrazellulären Konzentration von 30 mM Ca^{2+} noch kein Maximum der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht war, wurden die Fitparameter so gewählt, dass das Minimum bei 0 lag und das Maximum frei gefittet wurde. Mithilfe des durch den Fit erhaltenen Maximums erfolgte nun eine Normierung der Dosis-Wirkungs-Kurve indem jeder Wert durch das gefittete Maximum geteilt wurde (Abbildung 5.6 B; Fit Minimum = 0 % und Maximum = 100 %). Die so normierten Werte ($[\text{Ca}]_i / [\text{Ca}]_{i \text{ max fit}}$) der zytosolischen Ca^{2+} -Anstiege bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mehrerer Experimente wurden anschließend gemittelt und eine neue Dosis-Wirkungs-Kurve dieser Mittelwerte erstellt. Zum Vergleich der zytosolischen Ca^{2+} -Signale in Abhängigkeit der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellen, die unterschiedliche Varianten von TRPV6 exprimierten, wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven der gemittelten Werte, mithilfe der Fitfunktion (s.o.) in IgorPro, erneut gefittet (Parameter: Minimum = 0 % und Maximum = 100 %) und die EC_{50} Werte und Hill Koeffizienten ermittelt. Dabei bleiben die EC_{50} und der Hill-Koeffizient aufgrund der sich lediglich ändernden Skalierung, bei gleichbleibendem Maximum, identisch.

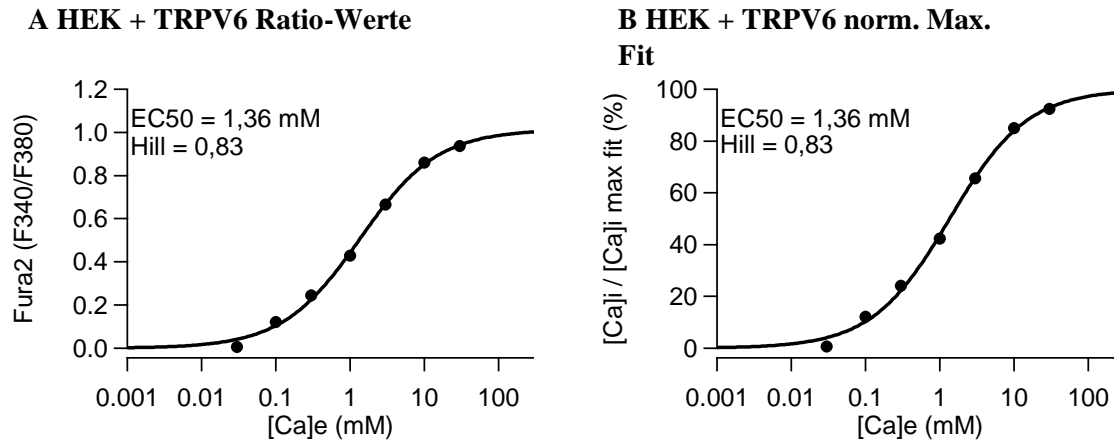


Abbildung 5.6: Bearbeitung der Messdaten zur Darstellung der Abhängigkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Amplituden vom extrazellulären Ca^{2+} .

Einfach logarithmische Darstellung der aus Abbildung 5.5 E ermittelten Kurvenmaxima (Fura-2 F340 / F380) gegenüber der extrazellulär applizierten Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}]_e$), inklusive des in IgorPro errechnetem Fit (Linie) der Dosis-Wirkungs-Kurve (Parameter: Minimum 0 und Maximum frei) (A), und normiert ($[\text{Ca}]_i / [\text{Ca}]_i \text{ max fit}$) auf das durch den Fit in A ermittelte Maximum (100 %) (B).

5.6.3 Analyse der Kinetik der Ca^{2+} -Signale

Zur Analyse der Kinetik des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs und Ca^{2+} -Abfalls nach extrazellulärer Zugabe von Ca^{2+} wurden die Messungen nach Aufbereitung, wie in Abbildung 5.5 E, verwendet.

Für die Bestimmung der Kinetik des Calciumanstiegs wurde die Steilheit des Ratioanstiegs nach Zugabe von Ca^{2+} (Abbildung 5.7) als $(\text{F340} / \text{F380}) / \text{s}$ ermittelt. Zur Charakterisierung der Calciumabnahme wurde eine einfach exponentielle Funktion ($f(x) = y_0 + A \cdot \exp(-1 / \tau \cdot x)$; $y_0 = \text{Basis}$, $A = \text{Faktor}$) durch die Kurve gelegt (Abbildung 5.7). Startpunkt war der Endbereich des maximalen Peaks, während das Ende bei Sekunde 250 der Messung festgelegt wurde. Als Wert wurde tau (τ) festgehalten, welches die Zeit angibt in der das Ca^{2+} -Signal um $1/e$, also ca. 37 %, abgenommen hat. Die Ermittlung der Kinetik fand nur für die extrazelluläre Zugabe von 30 mM, 10 mM, 3 mM und 1 mM Ca^{2+} statt, da hier eindeutige Effekte zu verzeichnen waren. Bei den Ca^{2+} -Konzentrationen 300 μM , 100 μM , 30 μM und 10 μM wurde aufgrund der niedrigen Effekte, die auch in den Kontrollexperimenten zu erkennen waren, darauf verzichtet.

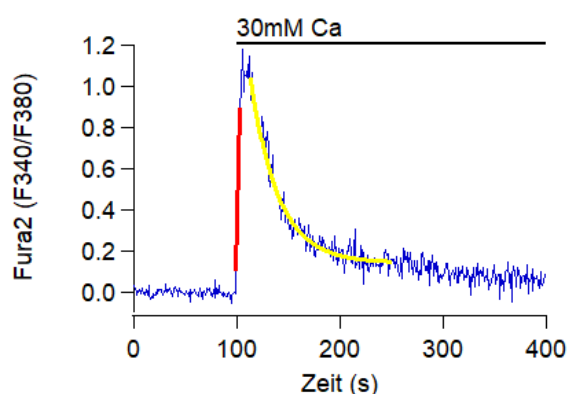


Abbildung 5.7: Analyse von Anstiegssteilheit und Abfallkinetik

Darstellung der Analyse von Anstiegssteilheit (rote Kurve) und Abfallkinetik (exponentielle Funktion, hellblaue Kurve) der zytosolischen Ca^{2+} (Fura) Signale nach Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} .

5.6.4 Auswertung des inversen Calciumprotokolls

Zusätzlich zur Ca^{2+} -Kinetik von TRPV6 unter Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} , wurde sich auch mit der Kinetik des F340 / F380-Abfalls, nach Pufferung einer vorher vorhandenen extrazellulären Ca^{2+} -Umgebung mit BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) und anschließend erneuter Applikation von Ca^{2+} , beschäftigt.

Die aus vier Messreihen ermittelten Ratios wurden, jeweils als arithmetisches Mittel, zusammengefasst (Abbildung 5.8 A). Anschließend folgte die Subtraktion des jeweiligen Minimums und die Normierung auf den, in den ersten 100 Sekunden zu sehenden, Basiswert, sodass ein ähnlicher Start- und Endpunkt der Inhibition erzeugt wurde (Abbildung 5.8 B). Auf diese Weise war es möglich eine vergleichbare Auswertung der Kinetik vorzunehmen. Diese wurde durch Anlegen einer einfach exponentiellen Funktion ($f(x) = y_0 + A * \exp(-1 / \tau * x)$; $y_0 = \text{Basis}$, $A = \text{Faktor}$) von Sekunde 100 bis Sekunde 250 vorgenommen.

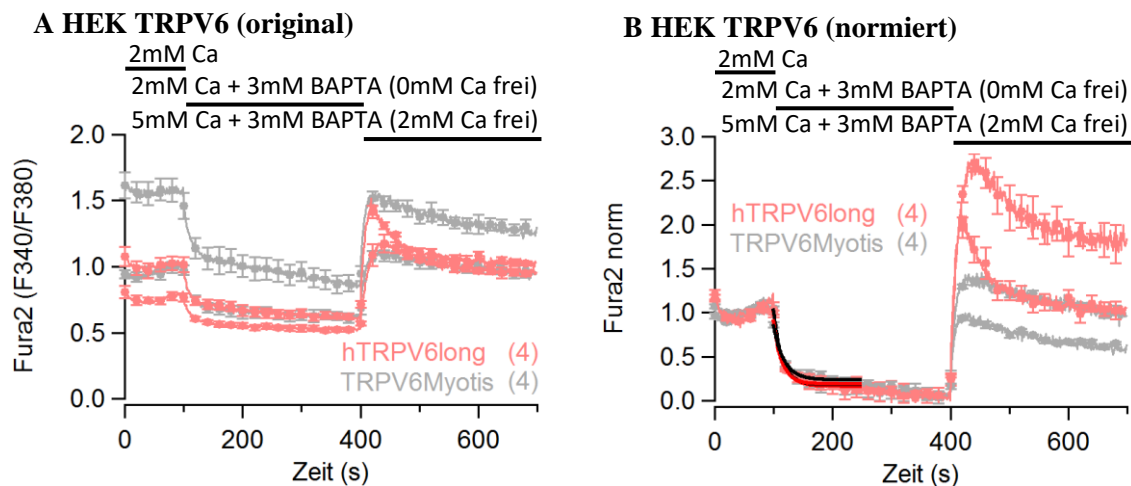


Abbildung 5.8: Auswertung des inversen Ca^{2+} -Protokolls

Darstellung der zytosolischen Ca^{2+} -Signale in originaler (A) und normierter Form (B) am Beispiel von vier exemplarischen Versuchsdurchläufen. Zu Beginn des Experimentes befinden sich die Zellen, welche $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ (hellrot) oder $\text{TRPV6}_{\text{Myotis}}$ (grau) exprimieren, in 2 mM Ca^{2+} -Lösung zu der 3 mM BAPTA hinzugefügt werden. Es folgt die Applikation von 3 mM Ca^{2+} , sodass erneut eine Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM herrscht. Die Balken geben die aktuelle Konzentration von freiem Ca^{2+} an, welche durch Applikation von 3 mM BAPTA und anschließend 3 mM Ca^{2+} entstand. Zudem wurden die Mittelwert-Graphen der normierten Version mithilfe einer einfach exponentiellen Funktion ($\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ = rot; $\text{TRPV6}_{\text{Myotis}}$ = schwarz) auf ihre Kinetik in Bezug auf die Ca^{2+} -Abnahme analysiert (B). Die Mittelwerte sind zur Übersichtlichkeit an jedem 20. Wert \pm Standardfehler dargestellt. In Klammern ist die Anzahl der pro Versuchsdurchlauf zusammengefassten Einzelerperimente angegeben.

5.6.5 Auswertung der Effekte pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Signale

Zur Untersuchung modulatorischer Mechanismen auf die TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Signale in HEK Zellen wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener, pharmakologisch wirksamer Substanzen in Ca²⁺-freier Badlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation von 3 mM extrazellulärem Ca²⁺. Die zytosolischen Ca²⁺-Signale wurden, wie in Kapitel 5.6.1 und 5.6.2 beschrieben, ausgewertet. Die Amplituden der durch 3 mM Ca²⁺-Zugabe induzierten zytosolischen Ca²⁺-Signale in Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen eines Pharmakons wurden anschließend gegen die Pharmakonkonzentration aufgetragen und mithilfe der exponentiellen Fitfunktion ($f(x) = w_0 + (w_1 - w_0) * (1 / (1 + (w_2 / x)^{w_3}))$); $w_0 = y_{\min}$, $w_1 = y_{\max}$, $w_2 = K_d$, $w_3 = n$ (positiv für eine steigende Funktion, negativ für eine abfallende Funktion)) in IgorPro eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt.

Konnten bei der Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen einer Substanz kein Unterschied in den Ca²⁺-Maxima festgestellt werden, erfolgte eine zusätzliche Analyse der Kinetik (Kapitel 5.6.3).

5.7 Statistik

Die Analyse der Ergebnisse nach statistisch relevanten Unterschieden fand mithilfe von GraphPad Prism 5.00 und Origin 2020 statt. Zur statistischen Auswertung von zwei voneinander unabhängigen Stichproben wurde ein „t-Test bei zwei Stichproben“ verwendet. Zum Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde bei beiden Programmen ein „One-way ANOVA“ in Kombination mit „Tukey’s multiple comparison test“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde immer auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Darstellung der Ergebnisse des Signifikanztests erfolgte durch das Vergleichen aller Messgrößen miteinander (Nr. 1 mit Nr. 2, Nr. 1 mit Nr. 3, Nr. 2 mit Nr. 3).

Bei den Experimenten, bei denen das Ca²⁺-Signal einer Variante von TRPV6 durch Modulatoren beeinflusst wurde (z.B. durch Trifluoperazin), fand eine andere Art der Darstellung der Signifikanzen statt. Während die statistische Analyse mit dem „One-way ANOVA“ in Kombination mit „Tukey’s multiple comparison test“ gleich blieb, wurde sich dafür entschieden nur den Unterschied der einzelnen Modulator-Konzentrationen zur Badapplikation darzustellen (Nr. 1 mit Nr. 2, Nr. 1 mit Nr. 3). Grund hierfür ist, dass zur sinnvollen Interpretation der Substanzeffekte der Vergleich der jeweiligen Modulator-Konzentrationen zur Badapplikation (als Negativkontrolle) von Interesse ist.

6 Ergebnisse

6.1 Etablierung des Fluoreszenz-Spektrophotometers FL6500 von Perkin Elmer

Zur Etablierung und Optimierung der zytosolischen Ca^{2+} -Signale mithilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers wurden HEK 293 Zellen, mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, auf unterschiedliche Weise beladen. Zudem wurde in verschiedenen Messküvetten in unterschiedlicher Zellzahl / ml Suspension, bei verschiedenen Einstellungen der Signalerfassung des Fluoreszenz-Spektrophotometers die Fluoreszenz der mit Fura-2-beladenen Zellen bei 380 nm und 340 nm gemessen.

6.1.1 Optimierung der Signalerfassung

Zu Beginn der Arbeit mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer mussten, mit dem Ziel ein möglichst korrektes, hohes und störungsfreies Fluoreszenzsignal zu erhalten, die passenden Einstellungen für den „Fast Filter“-Modus gefunden werden. Dabei gibt es eine Vielzahl an Parametern, die verändert werden können.

Zuerst wurde sich der Lichtquelle gewidmet. Hierbei gibt es die Möglichkeit die Intensität und die Frequenz des ausgesendeten Lichtes zu bestimmen. Mit der Absicht ein effizientes Anregungslicht zu erlangen, welches während der Messungen nicht zu einer Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffes führt, fiel die Wahl auf eine Intensität von 80 kW bei einer Frequenz von 100 Hz. Eine Variation, bei der eine Abnahme der Intensität auf 40 kW zugunsten einer gesteigerten Frequenz von 200 Hz vorgenommen wurde, lieferte niedrigere Fluoreszenzsignale. Die Exzitation-Spaltbreite wurde auf den höchsten Wert (20 nm) eingestellt, damit die größtmögliche Intensität an Anregungslicht die Probe erreichen konnte. Der interne Exzitationsfilter wurde zudem nicht benutzt, da die eigentlichen, sich ständig durch Rotation abwechselnden, Filter im nachgeschalteten Filterrada zu finden sind. Zur Ermittlung der Fura-2-Ratio wurden im Filterrada ein 340 nm und ein 380 nm Filter eingebaut und diese im Programm eingestellt. Die Geschwindigkeit des Magnetrührers wurde auf Medium festgelegt, damit ein Absetzen der Zellen auf dem Boden der Küvette verhindert wird. In Bezug auf das Emissionslicht wurde der interne Filter auf eine Wellenlänge von 515 nm eingestellt. Diese Wellenlänge liegt im Emissionsbereich von Fura-2 und hatte im Vergleich zu 510 bzw. 520 nm ein höheres Fluoreszenzsignal. Zusätzlich wurde die Emission-Spaltbreite auf das Maximum von 20 nm festgelegt, damit ein größerer Ausschnitt des Fura-2-Emissionsspektrums wahrgenommen wird und ein folglich deutlicheres Fluoreszenzsignal erzeugt. Die Anwendung eines weiteren Emissionsfilters fand nicht statt. Für die Detektion des Fluoreszenzsignales ist der Photomultiplier zuständig, der durch drei Faktoren beeinflusst werden kann. Hierbei handelt es sich um die an den Photomultiplier angelegte Spannung, die Reaktionszeit, mit welcher mehrere Signale hintereinander erfasst werden können, und den Verstärker, der die gemessenen Signale in ihrer Gesamtheit steigert. Bei Letzterem bleibt zu beachten, dass neben dem gewünschten Effekt der Verstärkung des gemessenen Signales, auch jegliches Rauschen der

Fluoreszenzsignale verstärkt wird und Messungen dadurch schwerer auszuwerten sind. Letztendlich wurde sich bei der Photomultiplier-Spannung für die Stufe „Medium“ mit 550 V entschieden, während die Reaktionszeit auf den Wert 0,1 eingestellt wurde. Hierdurch konnte ein hohes Fluoreszenzsignal erzeugt werden, obwohl der Verstärker bei 1 gelassen wurde. Des Weiteren wurde die Extinktions- und Emissionskorrektur aktiviert und die Datenwiedergabe auf einen Punkt pro Sekunde eingestellt.

6.1.2 Küvetten-Varianten

Für die Experimente standen zwei unterschiedliche Quarzglas-Küvetten zur Auswahl (Abbildung 6.1). Zum einen eine Küvette, bei der ein Füllvolumen von 1 ml Flüssigkeit notwendig ist, um eine Füllhöhe zu gewährleisten, die vom Anregungslicht erreicht wird. Diese wird von nun an als „Küvette groß“ bezeichnet. Zum anderen eine Küvette, bei der ein Füllvolumen von 0,5 ml Flüssigkeit ausreicht, um eine Anregung der Flüssigkeit zu gewährleisten. Aus diesem Grund wird zweite Küvette als „Küvette klein“ bezeichnet. Während bei der großen Küvette alle vier Seiten gleich dick sind, es spielt somit keine Rolle wie die Küvette in das Gerät eingesetzt wird, besitzt die kleine Küvette zwei jeweils gegenüberliegende dicke und dünne Glasseiten. Diese Konstruktionsweise ist vonnöten, damit die Flüssigkeitssäule bei weniger Flüssigkeit einen höheren Stand erreicht um vom Anregungslicht erfasst zu werden und zudem die Küvette in die Halterung des Spektralphotometers passt. Jedoch kommt nun zu tragen, dass die Anregung und Detektion der Lichtsignale in diesem Gerät im 90° Winkel zueinander liegen und hierdurch, je nach Ausrichtung der Küvette, zwei Varianten zustande kommen.

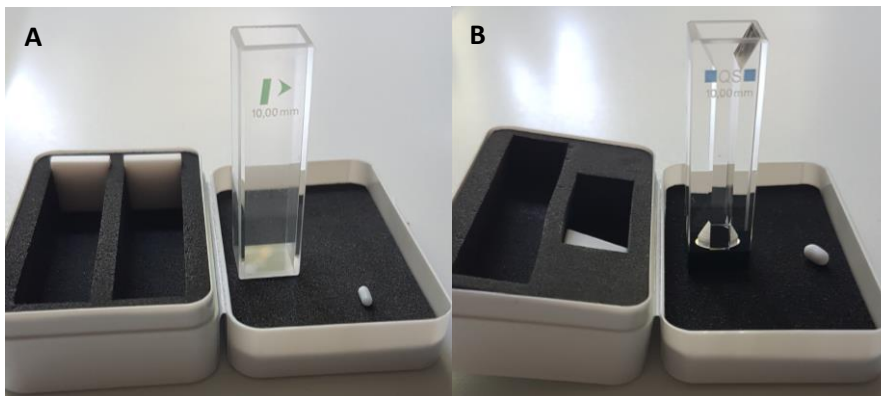


Abbildung 6.1:
Verwendete Küvetten

Darstellung der beiden genutzten Küvettenarten mit dem jeweiligen Magnetührstäbchen.

Links ist die Küvette mit dem größerem Volumen

(A) und rechts die Küvette mit dem kleineren Volumen, welche an zwei sich gegenüberliegenden Seiten eine dickere Glaswand besitzt (B), zu erkennen.

Die Frage war mit welcher Küvette, und deren Ausrichtung, ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal erlangt werden kann, sodass mit möglichst wenig Flüssigkeitsvolumen die vorhandenen Zellen effektiv genutzt werden konnten. Drei Möglichkeiten standen dabei zur Auswahl: 1. große Küvette mit gleich dicken Wänden 2. kleine Küvette, Anregungslicht trifft auf dünne Seite, Emission trifft auf dicke Seite 3. kleine Küvette, Anregungslicht trifft auf dicke Seite, Emission trifft auf dünne Seite.

Werden die beiden Konzentrationen in den jeweiligen Küvetten verglichen, fällt auf, dass eine höhere Zelldichte mit einem eindeutig höheren Fluoreszenzsignal einhergeht (Abbildung 6.2 A, B). Zudem konnte bei der Ausrichtung der kleinen Küvette eine zu favorisierende Methode festgestellt werden. Die

Ausrichtung der kleinen Küvette, bei der die dünne Seite der Küvette zur Lichtquelle zeigt (a), konnte eine leicht höhere Signalintensität hervorrufen, als es bei der anderen Ausrichtung (b) der Fall gewesen ist (Abbildung 6.2 B). Damit nun ein qualitativer Vergleich der beiden Küvettengrößen erfolgen kann, muss sich an der gleichen Zellzahl orientiert werden. Dies bedeutet, dass 1 ml Zellsuspension der Konzentration 0,5 Mio. Zellen / ml in der großen Küvette mit 0,5 ml Zellsuspension der Konzentration 0,9 Mio. Zellen / ml in der kleinen Küvette (schmale Seite zur Lichtquelle) verglichen werden muss. Bei dieser Gegenüberstellung wird deutlich, dass in Bezug auf das Fluoreszenzsignal, die kleine Küvette einen Vorteil aufweist.

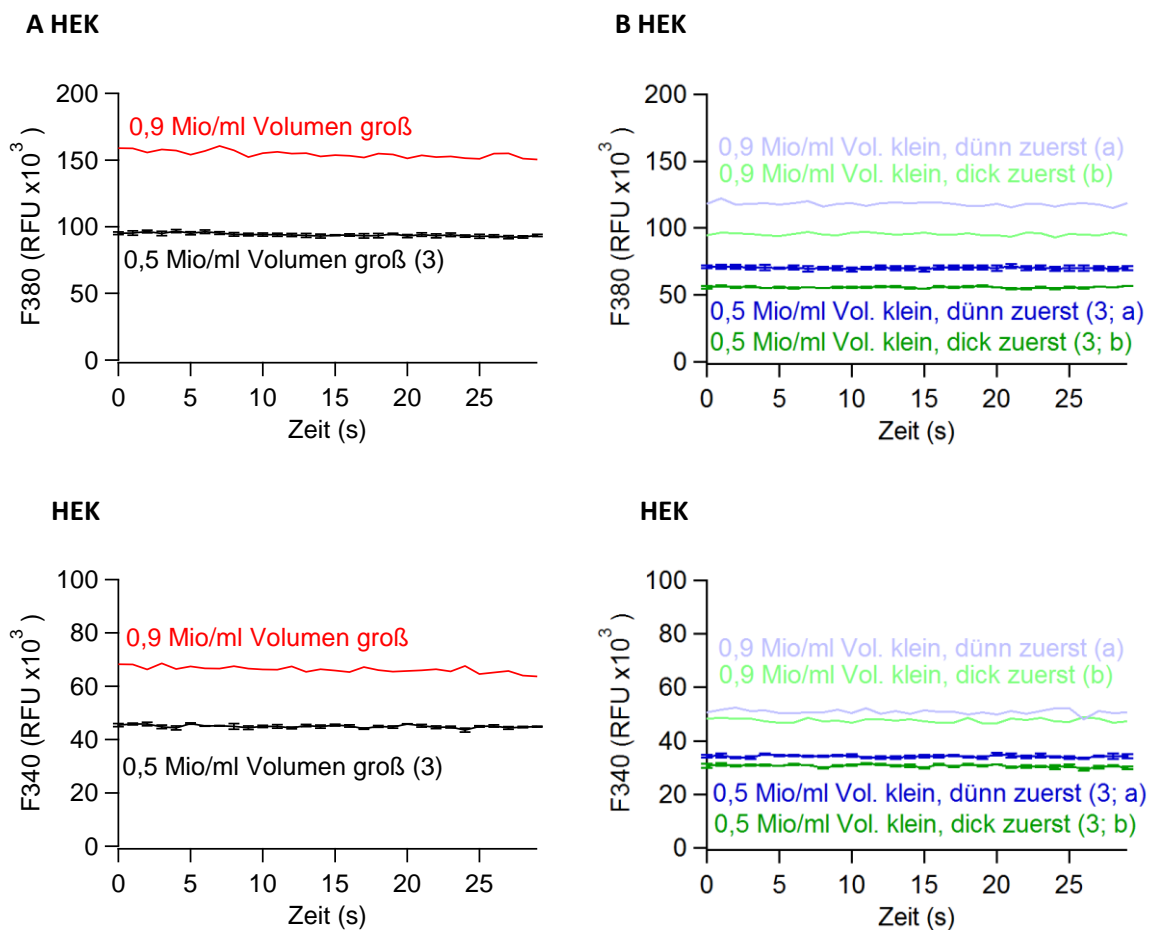


Abbildung 6.2: Vergleich der Fluoreszenzintensität von Fura-2 beladenen HEK Zellen in den beiden verschiedenen Küvetten

Fluoreszenzintensität als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) von Fura-2-beladenen HEK 293 Zellen in einer Konzentration von 0,5 Mio / ml bzw. 0,9 Mio / ml bei Anregung mit 380 nm (oben) und 340 nm (unten), gemessen in einer Küvette mit 1 ml Messvolumen (groß; A) bzw. 0,5 ml Messvolumen (klein; B). Letztere wurde in zwei Positionen verwendet: a) Anregung durch dünne und Emission durch dicke Wandseite bzw. b) Anregung durch dicke und Emission durch dünne Wandseite. Erwähnte Messungen sind, wenn möglich, als Mittelwerte aus jeweils drei Messungen in Form von Linien \pm Standardfehler dargestellt.

Nichtsdestotrotz wurde in den weiteren Experimenten die große Küvette bevorzugt, da diese durch ihre Konstruktionsart eine eindeutig einfachere Reinigung bietet. Außerdem konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass sie der kleinen Küvette nur in geringem Maße unterlegen ist und immer noch ein ausreichendes Fluoreszenzsignal liefert.

6.1.3 Optimierung der Fura-2-Beladung

Bei der Beladung der Zellen mit Fura-2 sollte eine optimale Methode gewählt werden, da bei den Messungen der Zellen in der Küvette ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal erreicht werden muss. Wie im Abschnitt zuvor dargestellt, kann die Beeinflussung beispielsweise durch die Wahl der Zellzahl geschehen. Die Inkubationszeit nimmt einen Großteil des Färbvorgangs ein, sodass hier mehrere Varianten ausgetestet wurden: Im Zellinkubator, im Wasserbad, im Wärmeschüttler. Dabei mussten drei Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen musste für die ganze Zeit eine Temperatur von 37°C herrschen, da dies die Reaktion der Esterasen beschleunigt und somit die Diffusion von Fura-2 verstärkt. Bei allen drei gewählten Methoden konnte dies eingestellt werden. Zum anderen musste der Schutz vor Lichteinstrahlung gewährleistet werden, damit ein Ausbleichen von Fura-2 bereits vor den Experimenten verhindert werden konnte. Dies gelang in allen drei Fällen mithilfe von Aluminiumfolie, die um die Zentrifugenröhrchen gewickelt wurde. Zuletzt mussten die Zellen über die Dauer der Inkubation in Suspension bleiben, da ein Absetzen der Zellen auf den Grund des Zentrifugenröhrchens zu einer verringerten Diffusion des Farbstoffes in die Zellen geführt hätte. Während beim Wärmeschüttler kontinuierliche leichte Impulse abgegeben wurden, mussten die Zentrifugenröhrchen im Inkubator und Wasserbad alle 15 Minuten per Hand geschüttelt werden. Das restliche Prozedere fand bei allen Zellen gleich statt und die Messung der jeweiligen Fluoreszenz konnte erfolgen.

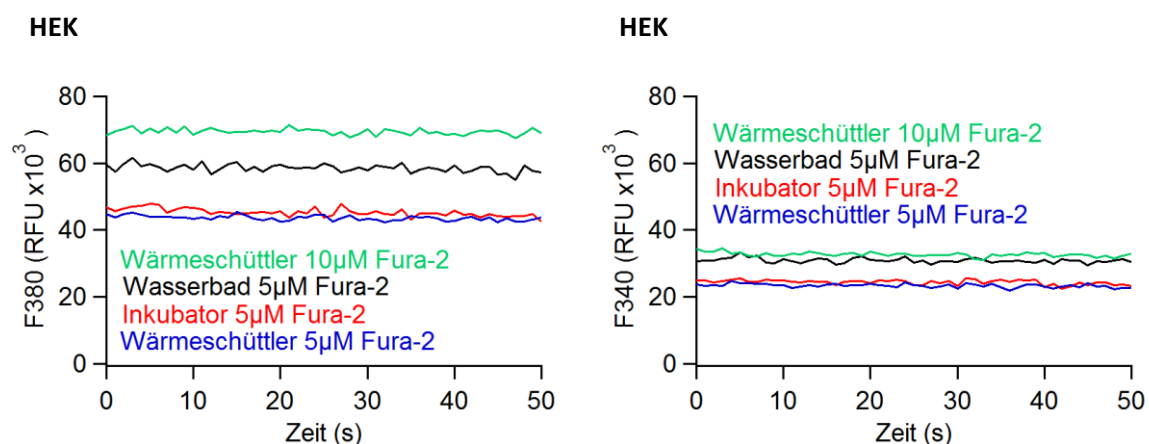


Abbildung 6.3: Vergleich der Fluoreszenzintensität von Fura-2 beladenen HEK Zellen bei unterschiedlicher Fura-2-Inkubation

Fluoreszenzintensität (relative Fluoreszenzeinheit, RFU) von Fura-2-beladenen HEK 293 Zellen bei Anregung mit 380 nm (links) und 340 nm (rechts), wobei die Beladung mit Fura-2 unter verschiedenen Bedingungen stattfand: blau - 5 µM Fura-2, Wärmeschüttler; rot - 5 µM Fura-2, Inkubator; schwarz - 5 µM Fura-2, Wasserbad; grün - 10 µM Fura-2, Wärmeschüttler.

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzsignale für 340 und 380 nm (Abbildung 6.3) fällt auf, dass sich die Beladung der Zellen im Zellinkubator und Wärmeschüttler, die außerdem die geringste Intensität besitzen, kaum unterscheiden. Die Zellproben, die hingegen im Wasserbad inkubiert wurden, weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf. Nichtsdestotrotz wurde der Wärmeschüttler, aufgrund des Komforts nicht alle 15 Minuten schütteln zu müssen, für den weiteren Verlauf der Experimente gewählt. Um die festgestellte niedrigere Fluoreszenz auszugleichen fiel die Entscheidung, zur Sicherheit die doppelte Menge an Fura-2 (10 μ M Endkonzentration) während der Inkubation zur Verfügung zu stellen. Diese Maßnahme führte, wie in Abbildung 6.3 erkennbar, zum höchsten Fluoreszenzsignal dieser Messreihe.

6.1.4 Zellzahl

Die Höhe des Fluoreszenzsignales spielt bei den Experimenten eine große Rolle. Neben den Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrophotometer und der Beladung der Zellen mit Fura-2 wird es auch durch die Anzahl an beladenen Zellen pro ml beeinflusst. Je nach Kultivierung der Zellen und Menge der durchgeführten Messungen, wurden verschiedene Verdünnungen durchgeführt, sodass unterschiedliche Zellkonzentrationen entstanden. Es fiel auf, dass sowohl zu wenig, als auch zu viele Zellen pro ml Lösung, die Ergebnisse der Messungen negativ beeinflussten. Unter anderem ursächlich hierfür ist, dass bei zu wenig Zellen, trotz effektiver Fura-2-Beladung, ein niedriges Fluoreszenzsignal entsteht. Dieses Signal wird durch während der Messung stattfindenden Applikationen noch weiter erniedrigt, sodass kleine Schwankungen in der Fluoreszenz einen großen Einfluss auf die Ratio haben und somit keine korrekte Ermittlung dieser mehr vorgenommen werden kann. Es wurde versucht die zu geringe und die zu starke Verdünnung der Zellen zu verhindern, weshalb in allen Experimenten Konzentrationen zwischen 0,5 und 2,5 Mio. Zellen pro ml benutzt wurden.

6.1.5 Vorversuche

Sowohl für das Erlangen einer Vertrautheit für das Protokoll zur Fura-2-Färbung und dem Fluoreszenz-Spektrophotometer, als auch für das Überprüfen der gewählten Einstellungen des Fast-Filter-Programmes, wurden zu Beginn Testexperimenten durchgeführt. Eine Voraussetzung für die Experimente war, dass hervorgerufene Effekte über eine Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sichtbar werden müssen. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf folgende Experimente: 1. Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums und abschließend Aktivierung des „Speicheraktivierten Ca^{2+} -Einstroms“ 2. Permeabilisierung der Plasmamembran für Ca^{2+} durch den Ca^{2+} -Ionophoren Ionomycin 3. Aktivierung des Ionenkanals TRPC4.

Unter dem „Speicheraktivierten Ca^{2+} -Einstrom“ wird ein Mechanismus verstanden durch den geleerte intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher (endoplasmatisches / sarkoplasmatisches Retikulum (ER / SR)) wieder aufgefüllt werden können und zudem nach rezeptorvermittelter Ca^{2+} -Freisetzung die Signalwirkung durch zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom verlängert bzw. zu verstärkt werden kann. Hierbei bewirkt die Entleerung der Speicher eine Interaktion des Calciumsensors „stromal interaction molecule“ mit dem

Orai-Kanal, der wiederum Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum in das Zytosol einströmen lässt. Über SERCA (sarcoplasmic / endoplasmic reticulum calcium ATPase) -Pumpen kann anschließend der Ca^{2+} -Transport in das ER / SR stattfinden. Die SERCA-Proteine spielen zudem im experimentellen Setting eine große Rolle, da durch deren Hemmung (z.B. durch Thapsigargin) eine Entleerung der Ca^{2+} -Speicher durch „Leak“-Kanäle erzeugt werden kann (Prakriya and Lewis, 2015).

In den Experimenten in Abbildung 6.4 erfolgt zu Sekunde 60 die Applikation von Thapsigargin in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$. Während der darauffolgenden Inkubationszeit von 300 Sekunden kommt es zu einer leichten Erhöhung der Fura-2-Ratio, erklärbar durch Ca^{2+} , welches nun aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in das Zytosol gelangt. Als nächstes wurde 1 mM Ca^{2+} hinzugegeben, wodurch nun, über die durch Speicherentleerung aktivierten Orai-Kanäle, Ca^{2+} in das Zytosol einströmen kann. Zuletzt wurde das maximale Signal, welches mit 1 mM Ca^{2+} erzeugt werden kann, durch Applikation des Ca^{2+} -Ionophoren Ionomycin nach 480 Sekunden, ermittelt. Dies diente zum einen als eine interne Kontrolle, da hierdurch überprüft werden konnte, ob die Zellmembran noch intakt war und zum anderen zur Ermittlung der maximalen Fluoreszenzsignale unter den gegebenen Bedingungen. Wären Defekte vorhanden, würde die alleinige Gabe von 1 mM Ca^{2+} bereits zu einem maximalen Ratio-Signal führen. Aufgrund der weiteren Steigerung des Ratio-Signales nach Ionomycin-Zugabe, wird jedoch erkennbar, dass die Zellen die Prozedur der Beladung und Messung gut überstanden haben.

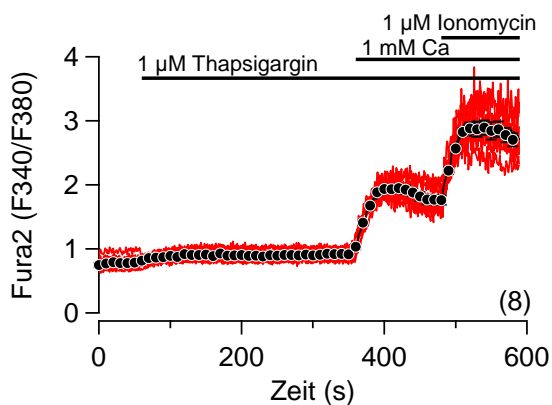


Abbildung 6.4: Fura-2-Messung des „Speicheraktivierten Ca^{2+} -Einstroms“ in HEK Zellen

Zytosolische Ca^{2+} -Signale (Fura-2 F340 / F380) in HEK Zellen nach Applikation von $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -freier Lösung (Speicherentleerung), Zugabe von 1 mM Ca^{2+} (SOCE) und Membranpermeabilisierung durch $1 \mu\text{M}$ des Ca^{2+} -Ionophoren Ionomycin. Es fanden insgesamt sechs Durchläufe mit 1 Million und zwei mit 0,5 Millionen Zellen / ml statt. Die einzelnen Kurven (rot) und der daraus errechnete Mittelwert \pm Standardfehler aus allen acht Experimenten (schwarz) sind dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde beim Mittelwert nur jeder 10. Wert dargestellt.

HEK Zellen sind adhärenente Zellen, die für die zytosolische Ca^{2+} -Messung in der Küvette erst in Suspension gebracht werden müssen (siehe Kapitel 5.2.3). Als eine weitere Kontrolle unseres Messverfahrens mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer wurden neben der HEK Zellen auch „Roswell

Park Memorial Institute“ (RPMI) 8226 Zellen, eine humane Myelom-Zelllinie, in der die Zellen zum größten Teil als Suspensionszellen vorliegen, verwendet. Nach Beladung dieser Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, erfolgte die Messung des „Speicheraktivierten Ca^{2+} -Einstroms“ analog zu den im Vorhinein durchgeführten HEK-Zell-Experimenten. In Abbildung 6.5 A zu erkennen ist die durch Thapsigargin verursachte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, die sich in einem leichten Ratio-Anstieg bis Sekunde 360 äußert. Anschließend kam es zur Applikation von diesmal 10 mM Ca^{2+} , die nach einer Inkubationszeit von 120 Sekunden durch die Zugabe von 1 μM Ionomycin ergänzt wurde. Durch die Zugabe von Ca^{2+} wurde ein Ratio-Signal erzeugt, welches mit dem in Abbildung 6.4 dargestellten Experimenten vergleichbar ist. Dasselbe gilt für den Wirkstoff Ionomycin, der zu einem maximalen Anstieg des Ca^{2+} -Signals führt. Die in Abbildung 6.5 B vorzufindenden Graphen dienen als ergänzendes Experiment. Hier wurde bei Sekunde 60 anstelle von Thapsigargin direkt Ca^{2+} appliziert und nach 220 Sekunden mit Ionomycin ergänzt. Dabei ist festzustellen, dass ohne die vorherige Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher ein wesentlich geringerer und langsamerer Signalanstieg durch die Ca^{2+} -Zugabe zustande kommt. Ionomycin führt letztendlich wieder zu einer Zunahme der Ratio, die auf ein mit Abbildung 6.5 A vergleichbares Plateau ausläuft.

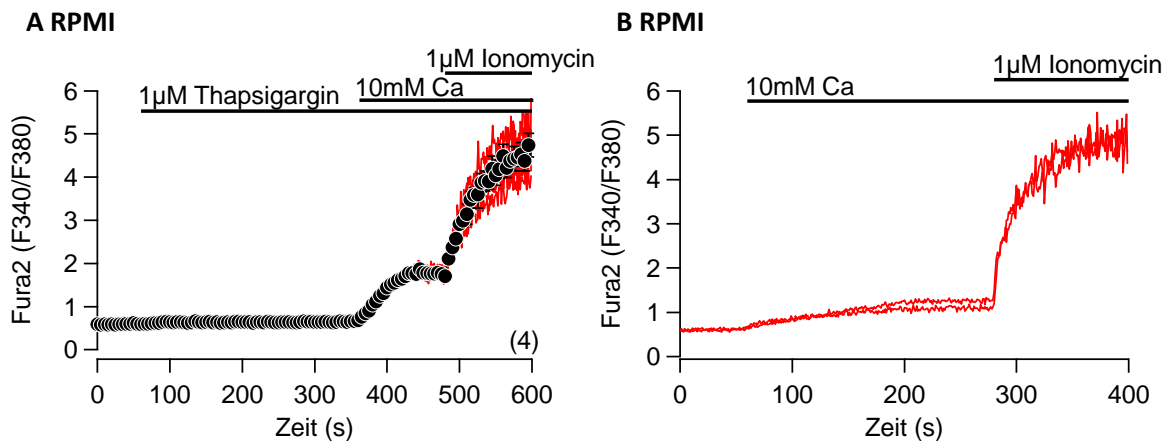


Abbildung 6.5: Fura-2-Messung des „Speicheraktivierten Ca^{2+} -Einstroms“ und einer entsprechenden Kontrolle in RPMI Zellen

Zytosolische Ca^{2+} -Signale (Fura-2 F340 / F380) in Fura-2-beladenen RPMI Zellen (0,63 Mio / ml) bei Applikation von 1 μM TG in Ca^{2+} -freier Lösung, Zugabe von 10 mM Ca^{2+} und 1 μM Ionomycin (A) bzw. nur 10 mM Ca^{2+} und anschließend 1 μM Ionomycin (B). Einzelne Experimente in A und B sind als Linien und der Mittelwert in A als Punkte \pm Standardfehler dargestellt.

In meiner Arbeitsgruppe wurde bisher viel Erfahrung mit einer HEK-Zelllinie, welche stabil TRPC4 und einen Opioidrezeptor (μ -OR) exprimiert, gesammelt. TRPC4 ist ein unselektiver Kationenkanal, der unter anderem auch Ca^{2+} leitet (Philipp et al., 1996). Mithilfe von Englerin A, welches ein spezifischer Aktivator von TRPC4 ist, kann somit ein, mit Fura-2 detektierbares, Ca^{2+} -Signal erzeugt werden (Akbulut et al., 2015).

Die Experimente wurden mit μ -OR und TRPC4 exprimierenden HEK Zellen durchgeführt, wobei als Kontrolle Zellen ohne TRPC4-Expression benutzt wurden (Abbildung 6.6). Die Zugabe von 10 mM Ca^{2+} führte zu einem langsamen Anstieg der Ratio. Bei der Applikation von Englerin A kam es ausschließlich in den TRPC4-exprimierenden Zellen zu einem raschen Anstieg des Ca^{2+} -Signals. Zuletzt wurde mithilfe von Ionomycin das maximal mögliche Ratio-Signal ermittelt, welches bei beiden Zellpopulationen ähnlich hohe Werte erreicht.

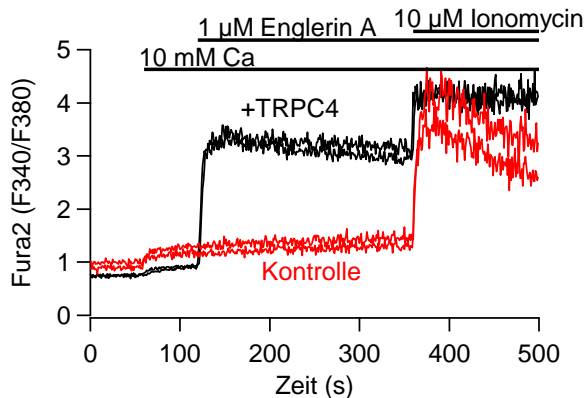


Abbildung 6.6: Fura-2-Messungen in HEK Zellen mit / ohne TRPC4

Darstellung des mittels Fura-2 erzeugten intrazellulären Ca^{2+} -Signals (F_{340} / F_{380}) in HEK Zellen, die μ -Opioidrezeptoren (in rot dargestellt; Kontrolle) oder μ -Opioidrezeptoren + TRPC4 (in schwarz dargestellt) exprimieren. Aufgeführt sind für beide Zelllinien jeweils zwei Einzelerperimente. Zu den mit Balken markierten Zeiten findet die Applikation von 10 mM Ca^{2+} , 1 μM Englerin A oder 10 μM Ionomycin statt. Dargestellt sind jeweils zwei einzelne Experimente.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auf verschiedene Weisen zytosolische Ca^{2+} -Signale erzeugt und mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer, bei einem guten Signal / Rausch-Verhältnis, detektiert werden können. Mit der gesammelten Erfahrung und unter Verwendung der optimierten Methoden und Bedingungen wurden anschließend die Experimente zur Untersuchung des TRPV6-Kanals begonnen.

6.2 Extrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit von TRPV6

6.2.1 Transiente Expression von TRPV6

HEK 293 Zellen wurden mit Cell Avalanche transfiziert. Bei den dabei verwendeten Plasmiden handelt es sich zum einen um hTRPV6_{long}-IGFP („internal ribosome entry site green fluorescent protein“)-pMAX, welches zur Expression von TRPV6 und, davon unabhängigen, GFP („green fluorescent protein“) führt. Zellen, die das andere Plasmid IGFP-pMAX zur alleinigen Expression des GFP erhielten, wurden demgegenüber als Kontrollzellen verwendet. Beide Zellpopulationen wurden 24 Stunden nach Zugabe der Transfektionsreagenzien geerntet und mit Fura-2 beladen. Anschließend konnte die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Applikation von diversen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen im „Fast Filter“-Modus stattfinden.

Sowohl in den Kontrollzellen, als auch in den TRPV6-enhaltenden Zellen ist ein identisch hoher Fura-2 Ratio Basiswert, d.h. intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration, vor den Applikationen erkennbar (Abbildung 6.7 A, B). Bei Zugabe der Ca^{2+} -Lösungen kommt es zu einem Anstieg der Ratios, wobei bei beiden Zellpopulationen eine Steigerung der Ratio mit höherem extrazellulärem Ca^{2+} erreicht wird. Die GFP + TRPV6-transfizierten Zellen weisen dabei ein, bei jeder applizierten Ca^{2+} -Konzentration, leicht höheres Ca^{2+} -Signal auf, als es in den jeweiligen Kontrolleexperimenten der Fall gewesen ist (Abbildung 6.7 A, B). Dieser geringe Unterschied überraschte, da ein weitaus größerer Effekt von TRPV6 erwartet wurde.

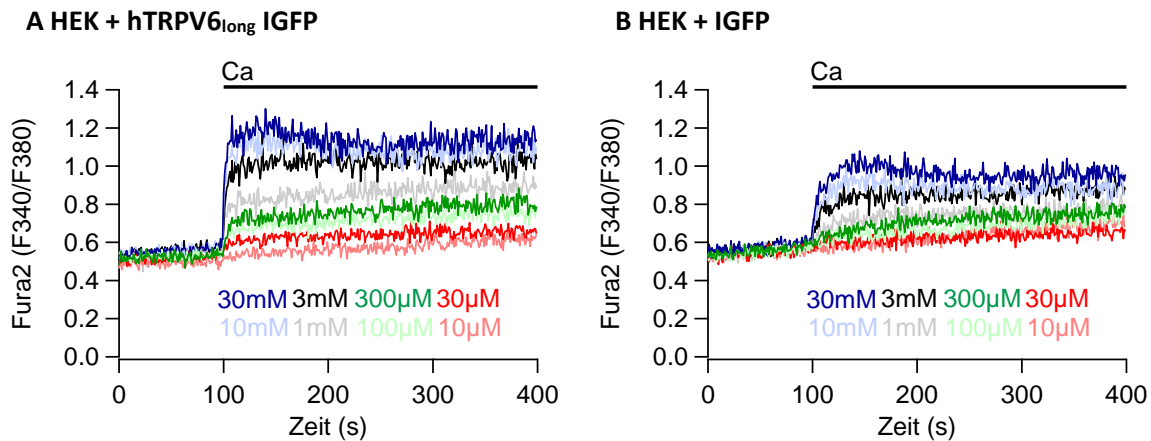


Abbildung 6.7: Extrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit des intrazellulären Ca^{2+} -Signals in transient TRPV6-exprimierenden HEK Zellen

Zytosolische Ca^{2+} -Signale (Fura-2, F340 / F380) detektiert in HEK Zellen nach transienter Expression von $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ und GFP (A), sowie nur GFP (B). Die Messungen wurden in Ca^{2+} -freier Badlösung begonnen und verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$ bis 30mM) wurden hinzupipettiert (Balken).

Mithilfe des in den Plasmiden enthaltenem GFP war es nun möglich die erfolgreiche Transfektion der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu überprüfen und zu quantifizieren (siehe Kapitel 5.2.6).

Es fällt auf, dass beinahe alle im Durchlicht erkennbare Zellen auch eine Beladung mit Fura-2 vorzuweisen haben, was für eine erfolgreiche Beladung der Zellen mit Fura-2 spricht (Abbildung 5.1 A, B). Hingegen ist nur bei einem Bruchteil der Zellen eine grüne Fluoreszenz nachzuweisen (Abbildung 5.1 C) und es muss von einer schlechten Transfektion der HEK Zellen mit $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ IGFP ausgegangen werden.

Für die exakte Quantifizierung wurden die Mikroskopie-Aufnahmen, wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben, mit zwei Methoden ausgewertet.

In Tabelle 6.1 sind die vollständigen Auswertungen des Transfektionserfolges bei den transient transfizierten Zellen dargestellt. Der obere Abschnitt (A) befasst sich mit den GFP + TRPV6 enthaltenden Zellen, während im unteren Abschnitt (B) die GFP-exprimierenden Zellen abgebildet sind. Erkennbar ist, dass zwischen den beiden Methoden zur Auswertung der Transfektionseffizienz (Zellzählung bzw. Threshold) nur ein geringer Unterschied besteht. Bei allen Transfektionen ist ein

Erfolg von 8 bis 24 % zu verzeichnen. Mit diesen teilweise sehr niedrigen Erfolgsraten lassen sich die in Abbildung 6.7 gezeigten geringen Unterschiede zwischen TRPV6 exprimierenden Zellen und deren Kontrollen erklären. Handelt es sich nämlich bei 76 bis 92 % der „TRPV6-enthaltenden Zellen“ um Zellen, die TRPV6 gar nicht exprimieren, wird das TRPV6-abhängige Ca²⁺-Signal durch nicht-transfizierte HEK 293 Zellen reduziert.

A HEK + hTRPV6_{long} IGFP	Zellzählung	Threshold
Experiment 1	19.71%	24.24%
Experiment 2	20.60%	23.09%
Experiment 3	11.51%	9.25%
Experiment 4	8.69%	9.12%
Experiment 5	10.25%	9.94%
Experiment 6	10.26%	9.33%

B HEK + IGFP	Zellzählung	Threshold
Experiment 1	19.00%	18.62%
Experiment 2	7.58%	7.92%
Experiment 3	11.11%	8.31%
Experiment 4	11.69%	9.02%

Tabelle 6.1: Prozentueller Anteil der effektiven transient transfizierten Zellen

Die Bilder der mit hTRPV6_{long} IGFP transfizierten (A) / IGFP transfizierten (B) Zellen wurden hinsichtlich des Transfektionserfolges ausgewertet. Dies erfolgte sowohl per Zellzählung (GFP-positive Zellen / Zellen im Durchlicht), als auch durch das Festlegen eines Threshold bei den GFP-positiven Zellen.

Mit der oben durchgeführten Methodik konnte kein sinnvolles Ergebnis erlangt werden, sodass für die weiteren Experimente eine andere Option gewählt werden musste. Dies geschah durch die Transfektion von HEK Zellen mithilfe der „AMAXA Nukleofektions-Technologie“ (Kapitel 5.2.5). Hierfür wurde die von der entsprechenden Firma speziell angebotene „Nucleofector Solution“, als auch das klassische Medium Optimem benutzt, um einen eventuell unterschiedlichen Transfektionserfolg feststellen zu können.

Die über diese Methode transfizierten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die dabei entstandenen Bilder, wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben, ausgewertet. Diesmal erfolgte die Zählung der Zellen ausschließlich per Hand und es wurden jeweils drei Bilder pro Zellpopulation aufgenommen. Tabelle 6.2 zeigt, dass durch die Elektroporation bei den mit GFP transfizierten Zellen eine Erfolgsrate von ungefähr 40 % erreicht werden konnte. Dieses gute Ergebnis konnte jedoch bei den

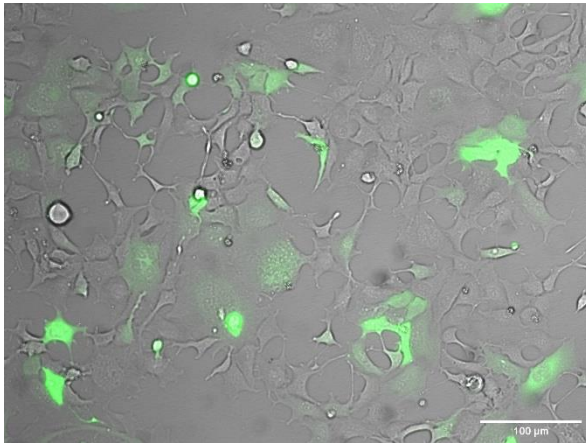
TRPV6 + GFP transfizierten Zellen nicht bestätigt werden. Sie wiesen lediglich eine Erfolgsquote von unter 10 % auf (Tabelle 6.2). Des Weiteren konnte bei der Benutzung der beiden verschiedenen Transfektionslösungen kein offensichtlicher Unterschied festgestellt werden. Das in der Tabelle 6.2 dargestellte Verhältnis ist auch in den in Abbildung 6.8 beispielhaft gezeigten Bildern zu erkennen.

GFP + V6VL Kit	8.37%
GFP + V6VL Optimem	3.74%
GFP Kit	36.19%
GFP Optimem	42.23%

Tabelle 6.2: Prozentueller Anteil der mittels AMAXA effektiven transient transfizierten Zellen

Auswertung der mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder der einzelnen Zellgruppe. Pro Zellpopulation (HEK IGFP / hTRPV6_{long} IGFP transfiziert mit Kit / Optimem bei der Durchführung der Elektroporation) wurden drei zufällig gewählte Ausschnitte bestimmt. Es folgte die Berechnung der prozentual erfolgreichen Transfektion durch Zellzählung (GFP-positive Zellen / Zellen im Durchlicht). In der Tabelle angegeben ist der Durchschnittswert aus den drei Bildausschnitten.

A HEK + IGFP



B HEK + hTRPV6_{long} IGFP

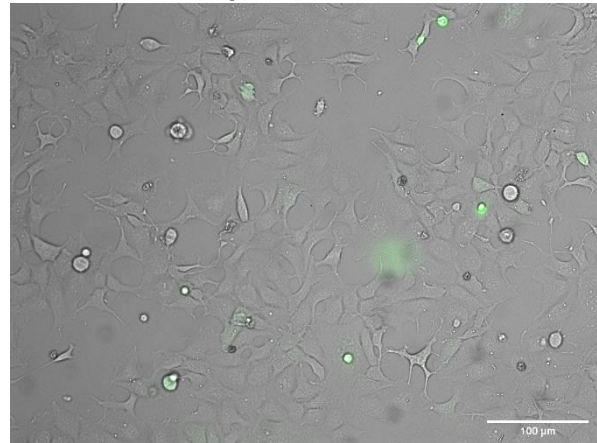


Abbildung 6.8: Mikroskopische Aufnahmen von mittels AMAXA transient transfizierten HEK Zellen

Als Beispiel aufgeführte Bild-Zusammenstellungen von HEK Zellen, die mithilfe von AMAXA mit IGFP (A) / hTRPV6_{long} IGFP (B) transfiziert wurden. Zwei einzeln aufgenommene Bilder, unter Benutzung von Durchlicht (grau) und unter Anregung von GFP (grün), sind überlagert dargestellt.

Während die mit GFP transfizierten Zellen (Abbildung 6.8 A) eine verhältnismäßig gute Fluoreszenz und somit eine gute Transfektion aufweisen, sind nur sehr vereinzelte, fluoreszierende Zellen mit TRPV6 + GFP (Abbildung 6.8 B) zu erkennen. Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die transfizierten Zellen nach 48 Stunden geerntet, mit Fura-2 beladen und im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen.

Sowohl die GFP exprimierenden Zellen, die als Kontrolle fungieren, als auch die TRPV6 + GFP exprimierenden Zellen wurden mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 30 mM behandelt (Abbildung 6.9 A, B). Dabei fällt auf, dass auch bei diesen Experimenten die TRPV6-exprimierenden Zellen eine nur minimal höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen aufweisen. Das Fura-2-Signal wird folglich wieder durch die nicht erfolgreich transfizierten Zellen überlagert, sodass kein TRPV6-spezifischer Ca^{2+} -Einstrom detektiert werden kann.

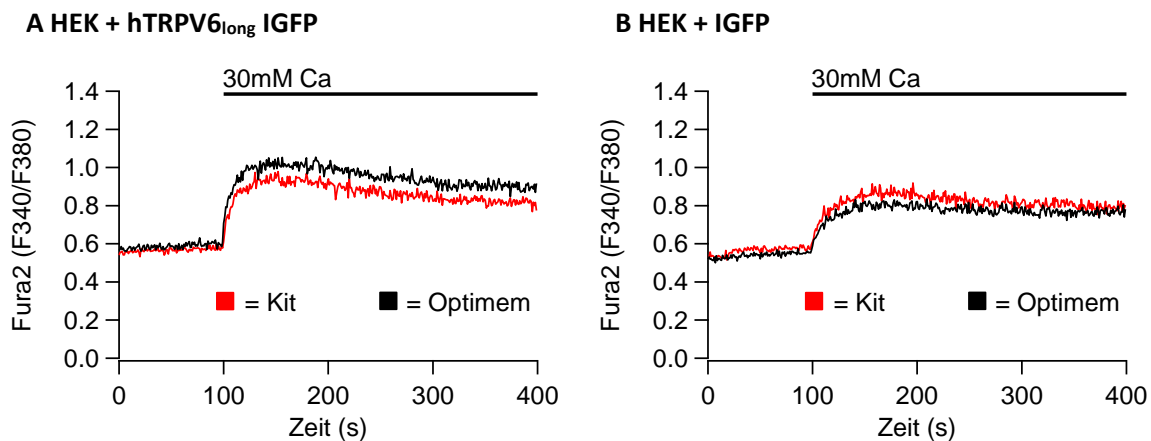


Abbildung 6.9: Fura-2-Messungen von transient transfizierten HEK Zellen

Darstellung von Fura-2-Messungen in mit hTRPV6_{long} IGFP (A) / IGFP (B) transfizierten HEK Zellen, deren Transfektion mittels AMAXA durchgeführt wurde. Unterschieden wird zwischen den Transfektionslösungen Kit (rot) und Optimem (schwarz). Der Balken zeigt die Applikation von 30 mM Ca^{2+} an.

Ein weiterer Punkt der in der Anfangsphase untersucht wurde ist die Beständigkeit der präparierten Zellen. Manche Messreihen beanspruchen eine Zeit von bis zu 4 Stunden, weshalb die Befürchtung bestand, dass Zellen am Anfang der Messreihe ein anderes Ergebnis liefern würden, als Zellen, die am Ende gemessen werden. Für transient mit TRPV6 + GFP transfizierte HEK Zellen wurden Messungen mit 10 μM und 30 mM Ca^{2+} durchgeführt, wobei zwischen den beiden identisch ablaufenden Messungen 230 Minuten Pause liegen (Abbildung 6.10 A, B). Aus den Abbildungen wird erkennbar, dass sowohl niedrige, als auch hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen bei den 230 Minuten später gemessenen Zellen zu einer leicht höheren Ratio führen, als es bei den zuerst gemessenen Zellen der Fall gewesen ist. Nichtsdestotrotz handelt es sich nur um einen minimalen Effekt, der vernachlässigt wurde.

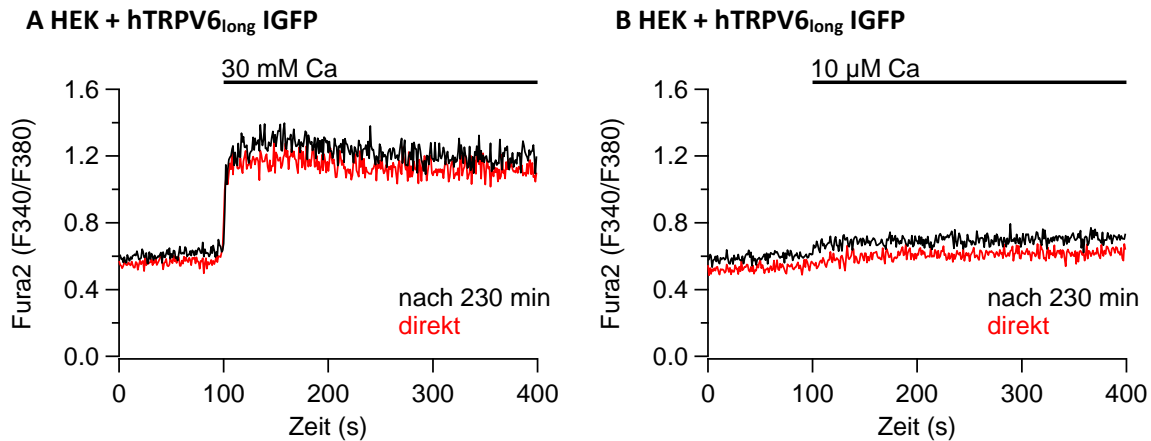


Abbildung 6.10: Zeitlicher Aspekt von Wartezeit auf Fura-2-Messungen

Darstellung der mittels Fura-2 detektierten intrazellulären Ca^{2+} -Signale in HEK Zellen + hTRPV6_{long} IGFP bei Zugabe von 30 mM Ca^{2+} (A) bzw. 10 μM Ca^{2+} (B). Der Zeitpunkt der Applikation ist durch einen Balken gekennzeichnet. Unterschieden wird zwischen einer direkt nach dem Beladungsprotokoll gemessenen Zellprobe (rot) und einer 230 Minuten später gemessenen Zellprobe (schwarz).

6.2.2 Stabil TRPV6-exprimierende Zelllinien

Als Alternative zu den transient transfizierten Zellen wurden stabile Zelllinien, bei denen sich das „Recombinase flippase“ (Flp)-In T-Rex-System zu Nutze gemacht wurde, verwendet. Dieses System ermöglicht das Einschleusen eines gewünschten Gens, das wiederum nur dann exprimiert wird, wenn die Zellen mit Tetracyclin induziert werden (siehe Kapitel 5.2.2). Bei den dazu passenden Kontrollpopulationen handelt es sich um die gleichen Zellen, welche jedoch keine Induktion mit Tetracyclin erhalten. Für meine Experimente existieren vier Varianten an Flp-In T-Rex-Zellen: humaner TRPV6_{long}, die von der Fledermaus „Myotis brandtii“ stammenden Varianten TRPV6_{Myotis} Klon C2 und TRPV6_{Myotis} Klon A5, sowie TRPV6_{Proteo}. Vor den Messungen wurden diese für 16 bis 20 Stunden mit Tetracyclin induziert. Hinzu kommt die Flp-In HEK Zelllinie, die humanen TRPV6_{short} konstant exprimiert. Alle Zellvarianten, inklusive entsprechender Kontrollen, wurden in meinen Experimenten nach der intrazellulären Ca^{2+} -Signal-Veränderung, bei extrazellulärer Applikation von unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen, untersucht.

Für das Erlangen von Zellen, die TRPV6_{Myotis} durch Tetracyclin induzierbar exprimieren, wurden mittels des Flp-In-T-Rex-Systems stabile Zellklone generiert. Die Expression von TRPV6_{Myotis} konnte in mehreren Zellklonen mittels des TRPV6 spezifischen Antikörpers 429 nachgewiesen werden (Abbildung 6.11). Neben der Tatsache, dass TRPV6_{Myotis} in allen aufgeführten Zellklonen nachgewiesen werden konnte, fielen leicht unterschiedliche Expressionslevel auf. Dies führte dazu, dass in meinen Experimenten zwei Zellklone (Klon A5 und Klon C2) verwendet wurden, um die möglichen Auswirkungen der Expressionslevel auf die Messungen zu überprüfen.

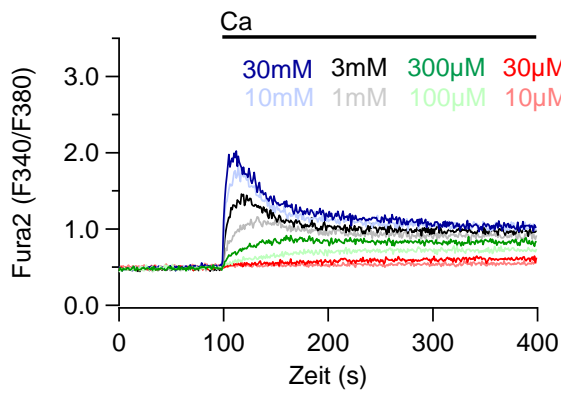


Abbildung 6.11: Western Blot verschiedener TRPV6 Myotis Klone

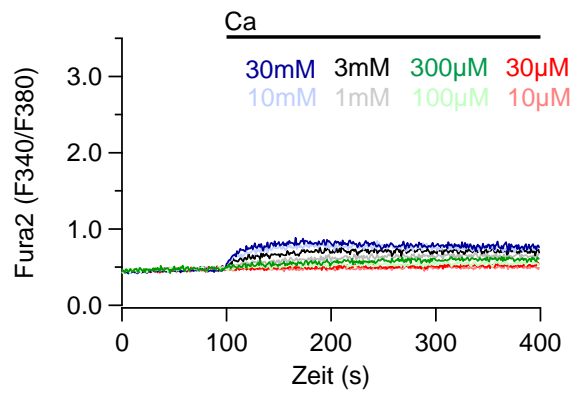
Western Blot der verschiedenen TRPV6 Myotis-Klone (4 - 8) und der entsprechenden Kontrollen (1 = „all blue“ Marker; 2 = Fledermaus TRPV6 transient in HEK 293 Zellen; 3 = HEK 293 Zellen) (bereitgestellt durch Ulrich Wissenbach und Christine Wesely). Die Proteine der jeweiligen denaturierten Zellklone wurden in 7,5 %igem „Tris-Glycine extended“-Gel von Biorad eingebettet. Beim Gellauf betrug die Spannung für 15 Minuten 80 V und anschließend 200 V, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Blotten fand mit dem „Biorad TransBlot Turbo Transfer System“ bei 1,3 A und 25 V für 10 Minuten statt. Beim ersten Antikörper handelt es sich um den aus Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper „AK429Affi“, welcher in einem 1:100 Verhältnis über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Die Darstellbarkeit wurde durch den zweiten Antikörper, einem Anti-rabbit-IgG im Verhältnis 1:50000, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) verknüpft ist, gewährleistet. Die Expositionszeit betrug 1 Minute.

In der Abbildung 6.12 sind in der linken Spalte (A, C, E, G) Experimente mit HEK Zellen, die hTRPV6_{long}, hTRPV6_{short}, TRPV6_{Myotis} Klon C2 oder TRPV6_{Myotis} Klon A5 exprimieren, aufgeführt. Bei der Applikation von diversen extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen kommt es zu einem Anstieg des intrazellulär detektierten Ca²⁺-Signals, welches mit steigender extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration auch zunimmt. Dies ist bei allen Varianten ab einer Zugabe von 300 µM Ca²⁺ deutlich erkennbar. Es fällt außerdem auf, dass die Zellen mit hTRPV6_{long}, TRPV6_{Myotis} Klon C2 oder TRPV6_{Myotis} Klon A5 ihr maximales Signal in Gegenwart von 30 mM extrazellulärem Ca²⁺ bei einer Fura-2-Ratio von ungefähr 2 besitzen, während die hTRPV6_{short}-exprimierenden Zellen ein Ratio-Signal von ca. 3,4 erreichen. Ein weiterer Punkt besteht darin, dass die humanen Varianten von TRPV6 nach Erreichen des Maximums, bei extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen von 30 mM bis 1 mM, eine schnelle Abnahme des intrazellulären Ca²⁺-Signales aufweisen. Bei den Fledermaus-TRPV6-Kanälen (TRPV6_{Myotis}) bleiben die Ratio-Werte über 300 Sekunden relativ konstant, unabhängig von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Die zu den Experimenten passenden Kontrollen wurden auf die gleiche Weise gemessen (Abbildung 6.12 rechts; B, D, F, H). Für hTRPV6_{long}, TRPV6_{Myotis} Klon C2 und TRPV6_{Myotis} Klon A5 dienen nicht mit Tetracyclin inkubierte Zellen als Kontrolle, während für die hTRPV6_{short}-Versuche normale HEK 293 Zellen benutzt wurden. Auch bei den Kontrollen kommt es bei Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fura-2-Ratio, wobei dieser langsamer verläuft und sein Maximum für 30 mM in allen Experimenten unter einer Ratio von 1 liegt.

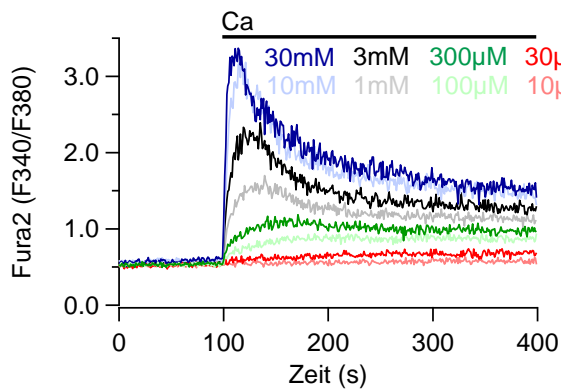
A HEK hTRPV6_{long} (induziert)



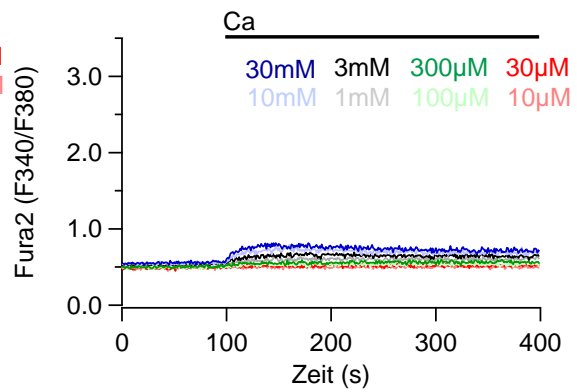
B HEK hTRPV6_{long} nicht induziert (Kontrolle)



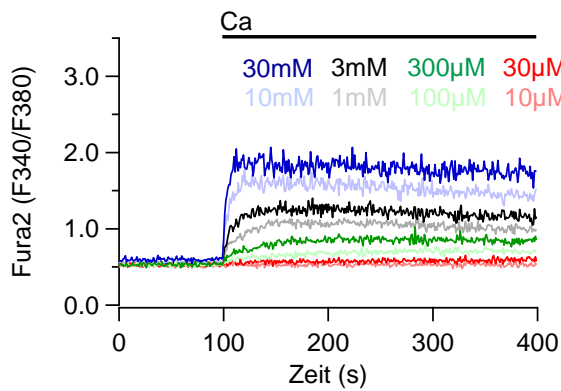
C HEK hTRPV6_{short}



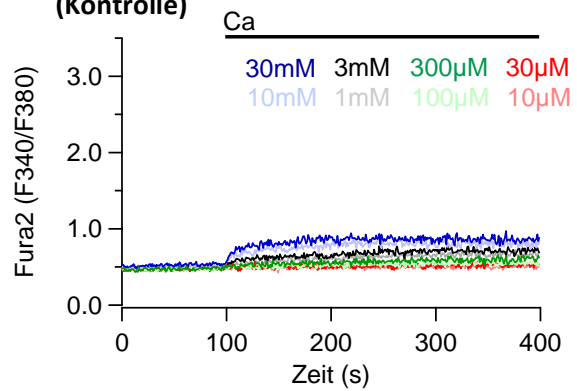
D HEK (Kontrolle)



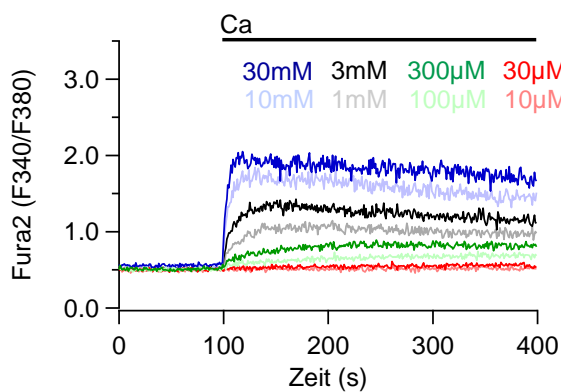
E HEK TRPV6_{Myotis} Klon c2 (induziert)



F HEK TRPV6_{Myotis} Klon c2 nicht induziert (Kontrolle)



G HEK TRPV6_{Myotis} Klon A5 (induziert)



H HEK TRPV6_{Myotis} Klon A5 nicht induziert (Kontrolle)

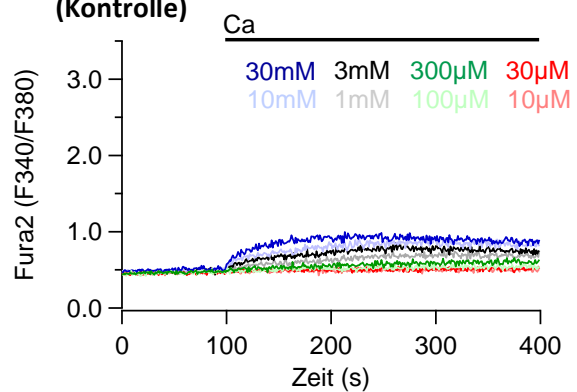


Abbildung 6.12: Extrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in HEK Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren

Darstellung der intrazellulären Ca^{2+} -Änderungen (Fura-2-Ratio F340 / F380) in HEK Zellen, die hTRPV6_{long} (A), hTRPV6_{short} (C), TRPV6_{Myotis Klon C2} (E) und TRPV6_{Myotis Klon A5} (G) exprimieren und der entsprechenden Kontrollen ohne TRPV6-Expression (B, D, F, H). Hierbei fand, mit Ausnahme der stabil hTRPV6_{short} exprimierenden Zelllinie, eine TRPV6-Expression mittels vorheriger Tetracyclin-Gabe (entspricht „induziert“) statt. Die Balken zeigen die Applikation von unterschiedlichen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (10 μ M bis 30 mM) an. Gezeigt sind repräsentative Einzelerperimente.

Der Kanal TRPV6 scheint somit in allen Varianten eine Auswirkung auf den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zu besitzen, weshalb eine Auswertung des Verhältnisses von intrazellulärem Ca^{2+} -Maximum zu der jeweils applizierten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erstellt wurde (siehe Kapitel 5.6.2).

Nach Abzug der Basisratio und der Ratiosignale der jeweiligen Kontrollzellen (siehe Kapitel 5.6.1) werden die maximalen Ratiowerte bei den verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen gegen diese Ca^{2+} -Konzentrationen aufgetragen. Anschließend konnte ein sigmoidaler Fit für jedes Experiment, wie in Kapitel 5.6.2 beschrieben, durchgeführt werden.

Die gemittelten Werte für die in den Einzelmessungen bestimmten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zum Erreichen des halbmaximalen intrazellulären Ca^{2+} - bzw. Ratio-Signales (EC_{50}) waren in Zellen, die hTRPV6_{long} exprimieren $1,96 \pm 0,361$ mM ($n = 6$), hTRPV6_{short} exprimieren $1,93 \pm 0,284$ mM ($n = 3$), TRPV6_{Myotis Klon C2} exprimieren $1,62 \pm 0,561$ mM ($n = 4$) und TRPV6_{Myotis Klon A5} exprimieren $3,53 \pm 0,808$ mM ($n = 4$) nicht signifikant voneinander verschieden. Auch die gemittelten Werte der dabei erhaltenen Hill-Koeffizienten der jeweiligen TRPV6-Varianten wiesen keinen signifikanten Unterschied auf (hTRPV6_{long} = $0,78 \pm 0,065$; hTRPV6_{short} = $0,75 \pm 0,057$; TRPV6_{Myotis Klon C2} = $0,82 \pm 0,051$; TRPV6_{Myotis Klon A5} = $0,75 \pm 0,022$).

Abbildung 6.13 A-D zeigt die Mittelwerte der intrazellulären Ca^{2+} - bzw. Ratio-Signale bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Zugaben in den verschiedenen TRPV6-Varianten exprimierenden Zellen, final mit einer sigmoidalen Funktion, wie in Kapitel 5.6.2 beschrieben, gefittet und mit den ermittelten EC_{50} -Werten und Hill-Koeffizienten dargestellt.

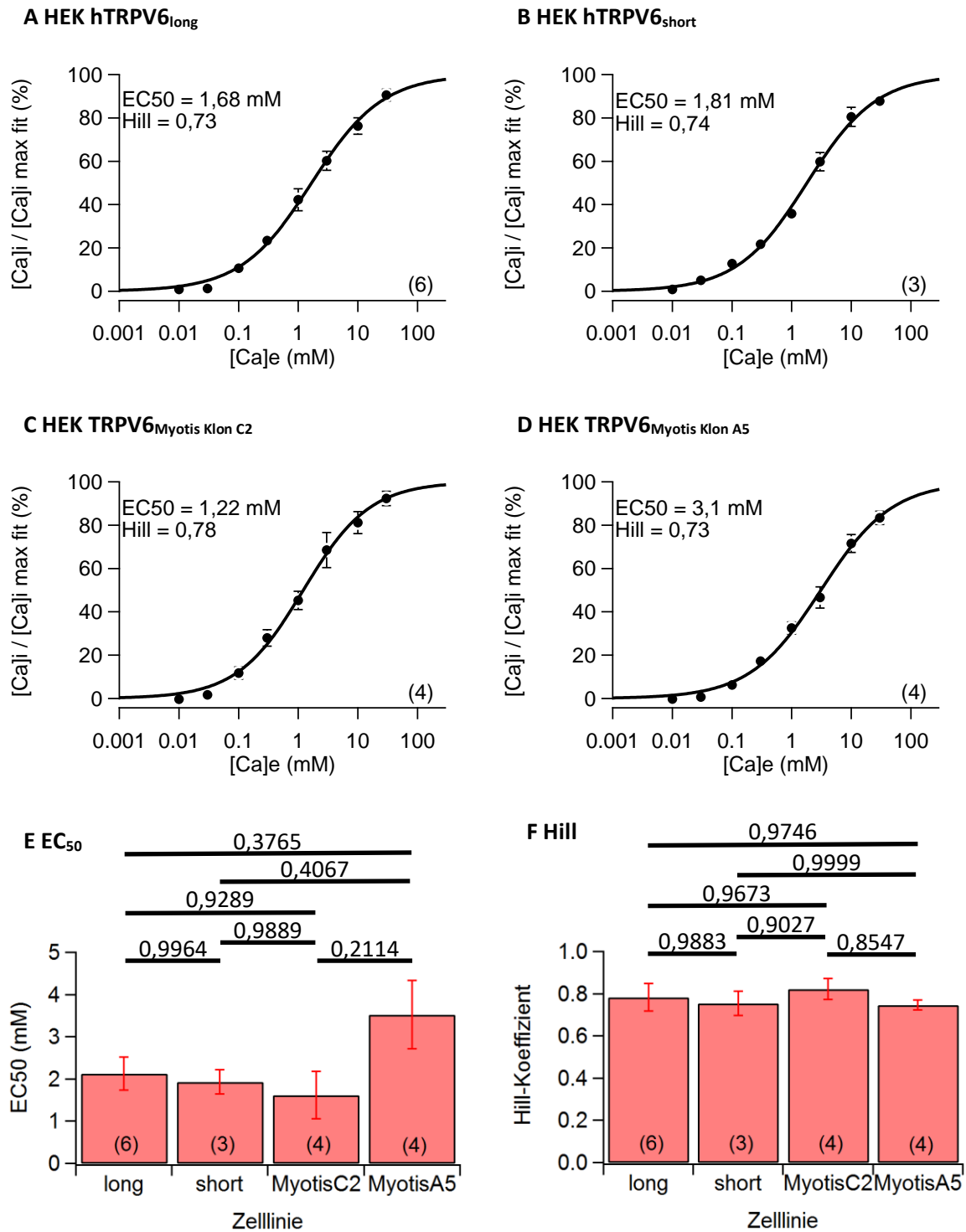


Abbildung 6.13: Dosis-Wirkungs-Kurven der extrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in HEK Zellen, die verschiedenen TRPV6-Varianten exprimieren

(A-D) Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen TRPV6-Varianten, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Amplitude bei unterschiedlichen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen, anzeigen. Die Punkte geben die aus den Einzelerperimenten gemittelten Ca^{2+} -Maxima für die jeweiligen applizierten Ca^{2+} -Konzentrationen \pm Standardfehler an und sind auf die die maximale intrazelluläre Ca^{2+} -Amplitude normalisiert. Zusätzlich ist ein sigmoidaler „Fit“, welcher auf diesen Werten basiert, dargestellt. (E, F)

Die aus den „Fits“ der Einzelerperimente ermittelten Werte für EC₅₀ bzw. Hill sind in Bezug zu den einzelnen Zelllinien als Mittelwert ± Standardfehler und der Vergleich der einzelnen Säulen untereinander mithilfe der Balken mit obendrüber stehenden p-Werten angegeben. In den Grafiken sind die Werte für die EC₅₀, den Hill-Koeffizienten und die Anzahl der durchgeführten Einzelerperimente, welche in Klammern aufgeführt ist, angegeben.

Die vier untersuchten TRPV6-Varianten weisen zwar keine Unterschiede in der Amplitude des intrazellulären Ca²⁺ bzw. Fura-2-Signals auf, jedoch ist wie in Abbildung 6.12 zu erkennen, der intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg in hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short} exprimierenden Zellen eher transient (Abbildung 6.12 A, C), wohingegen in Zellen, die TRPV6 aus Myotis exprimieren, das Fura-2-Ratio-Signal (Ca²⁺_{intrazellulär}) nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ nicht zurückgeht (Abbildung 6.12 E, G). Daraufhin wurde die Kinetik des intrazellulären Ca²⁺- bzw. Ratio-Signals genauer untersucht. Hierzu wurde der Ca²⁺-Anstieg pro Sekunde und die Ca²⁺-Abnahme als τ in Sekunden ausgewertet (siehe Kapitel 5.6.3) und verglichen.

Die für jede Zellpopulation gebildeten Mittelwerte bei Zugabe von 30 / 10 / 3 / 1 mM extrazellulärem Ca²⁺ sind in Abbildung 6.14 dargestellt. Bei allen vier Ca²⁺-Konzentrationen ist zu erkennen, dass die beiden humanen und myotis TRPV6-Varianten untereinander kaum abweichen. Hingegen besteht zwischen den beiden Spezies bei 30 mM, 10 mM und 3 mM extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration ein signifikanter Unterschied, der sich in einem schnelleren Ca²⁺-Anstieg bei den humanen Varianten im Vergleich zu den Varianten der Fledermaus äußert. Zudem fällt auf, dass der Ca²⁺-Anstieg pro Sekunde von der extrazellulär hinzugegebenen Ca²⁺-Konzentration abhängig ist und mit steigender Ca²⁺-Konzentrationen einen größeren Wert erreicht. Bei Zugabe von 1 mM Ca²⁺ reicht der hierdurch verursachte Anstieg nicht aus, um ein signifikant unterschiedliches Ergebnis zu erlangen.

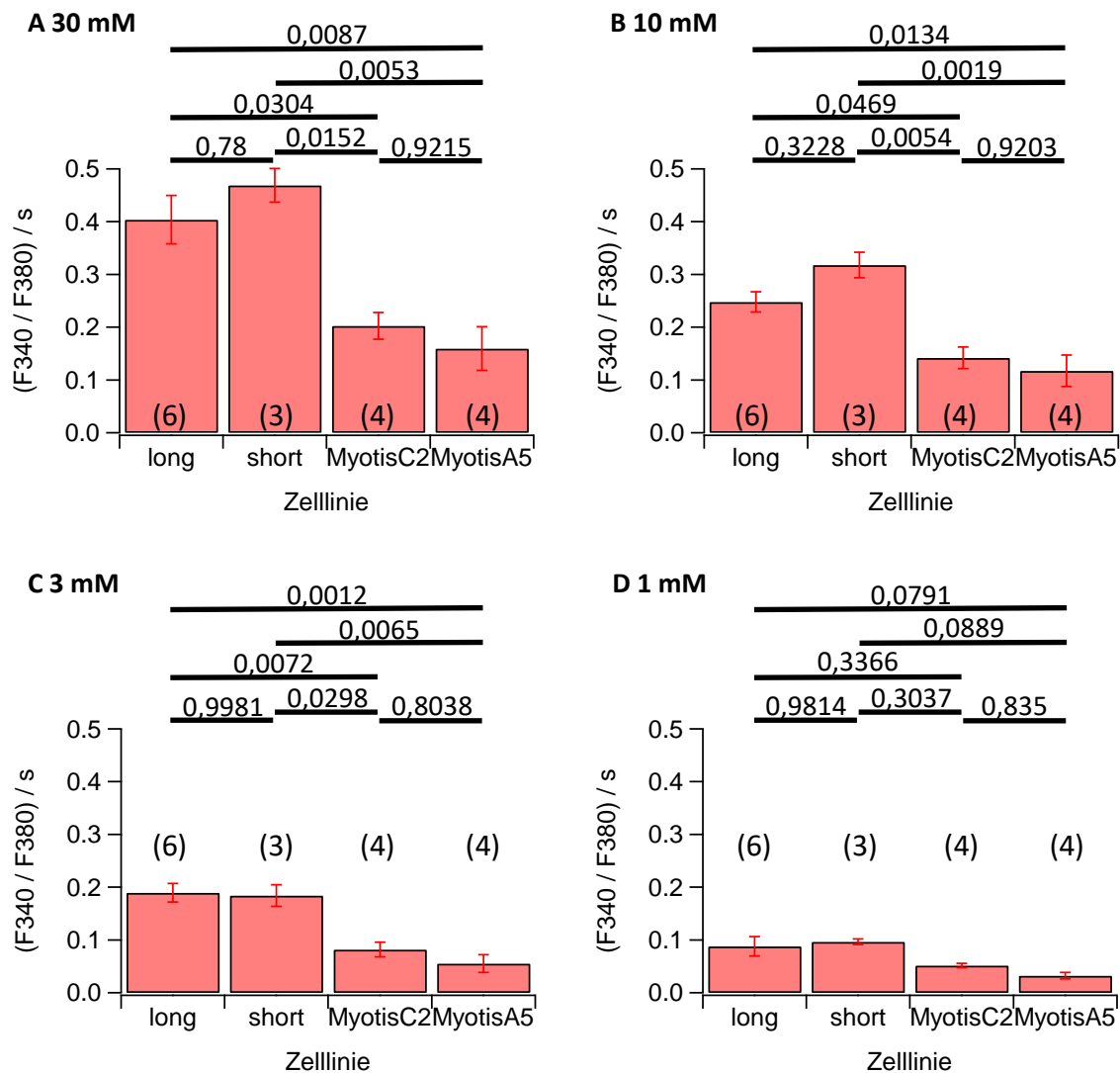
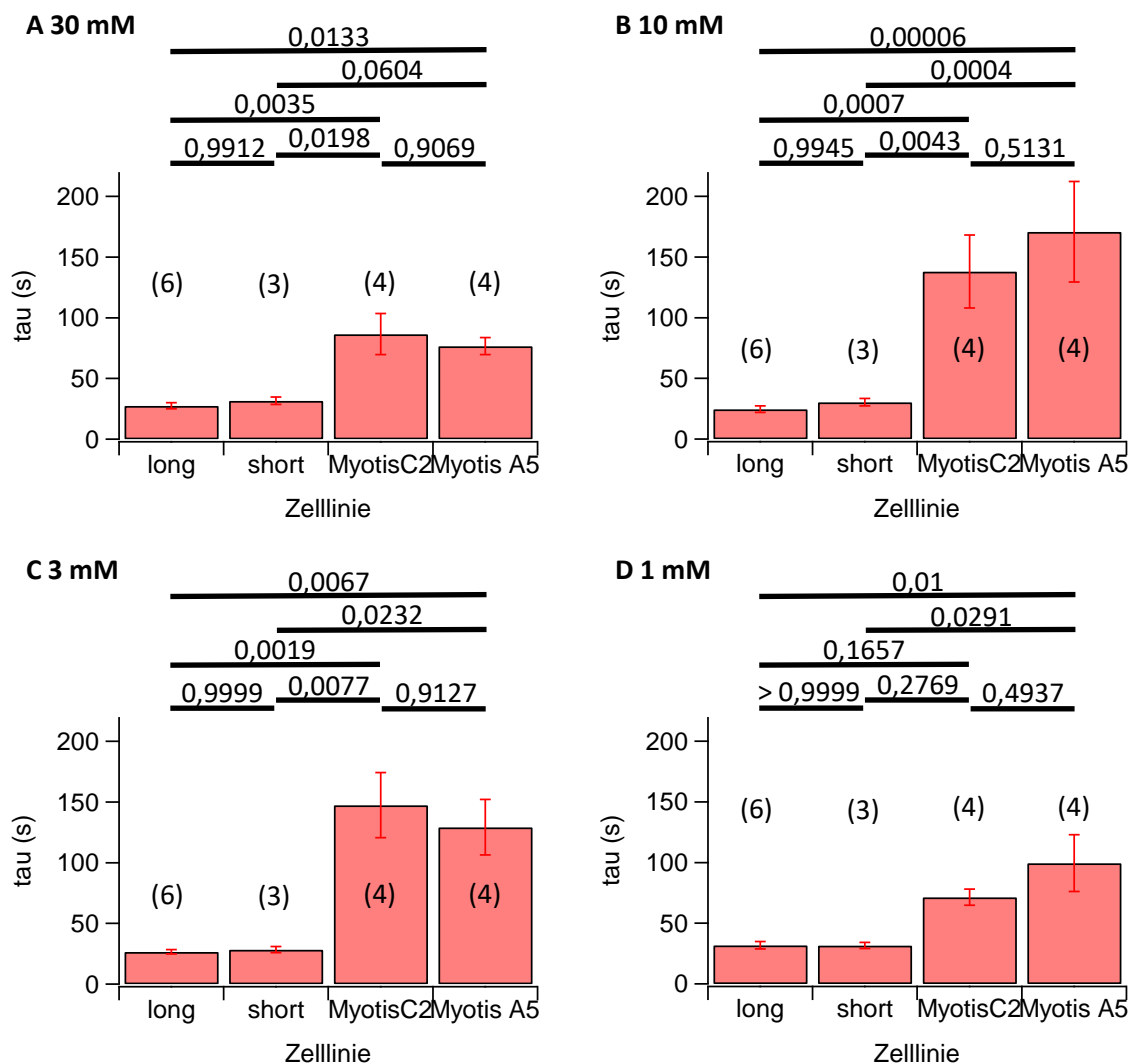


Abbildung 6.14: Kinetik des Ca^{2+} -Anstiegs in Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren
 Angabe der Kinetik des Ca^{2+} -Anstiegs pro Sekunde in $h\text{TRPV6}_{\text{long}}$, $h\text{TRPV6}_{\text{short}}$, $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon C2}}$ und $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon A5}}$ exprimierenden HEK Zellen nach extrazellulärer Zugabe von 30 mM Ca^{2+} (A), 10 mM Ca^{2+} (B), 3 mM Ca^{2+} (C) und 1 mM Ca^{2+} (D). Die Ergebnisse sind in Säulendiagrammen als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt, wobei die Zahl in bzw. über den Säulen die Anzahl der zusammengefassten Einzelerperimente angibt. Durch die Balken wird der Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Säulen untereinander dargestellt, wobei die p-Werte oberhalb angegeben sind.

Zusätzlich zum Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde wurde auch die Kinetik der Ca^{2+} -Abnahme analysiert. Hierzu wurde der Bereich vom Ratio-Maximum bis zu Sekunde 250 mithilfe einer einfach exponentiellen Funktion gefittet (siehe Kapitel 5.6.3). Die τ -Werte der einzelnen Messungen nach Zugabe von 30 / 10 / 3 / 1 mM Ca^{2+} wurden gemittelt und für die verschiedenen TRPV6-Varianten als Balkendiagramm in Abbildung 6.15 dargestellt. Der Wert τ gibt dabei die Zeit an, in der das Ca^{2+} -Signal um $1/e$, also ca. 37 %, abgenommen hat. Analog zu der Kinetik des Ca^{2+} -Anstiegs fällt auf, dass die zu einer Spezies zugehörigen TRPV6-Varianten sich in der Kinetik des Ca^{2+} -Rückgangs nicht signifikant voneinander

unterscheiden, während hingegen zwischen den Spezies Abweichungen zu erkennen sind. Dabei ist die Kinetik der Ca^{2+} -Abnahme bei den humanen Varianten im Vergleich zu den TRPV6-Myotis-Kanälen unter allen vier extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen schneller (human: $\tau \approx 30$ Sekunden, myotis: $\tau \approx 100$ bis 150 Sekunden). Aufgrund der Überlegung, dass die Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Abnahme eine Abhängigkeit von der Höhe des Ca^{2+} - bzw. Ratio-Wertes haben könnte, erfolgte die Gegenüberstellung von extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen, die für die jeweiligen TRPV6-Varianten ein ähnlich hohes Ca^{2+} -Signal erzeugten. Für hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short} wurde 3 mM Ca^{2+} und für TRPV6_{Myotis Klon C2 / A5} 30 mM Ca^{2+} gewählt (Abbildung 6.15 E). Auch in dieser Art der Darstellung weichen die TRPV6-Varianten einer Spezies nicht voneinander ab, während hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short} eine signifikant schnellere Kinetik der Ca^{2+} -Abnahme als TRPV6_{Myotis Klon C2 / A5} aufweisen.



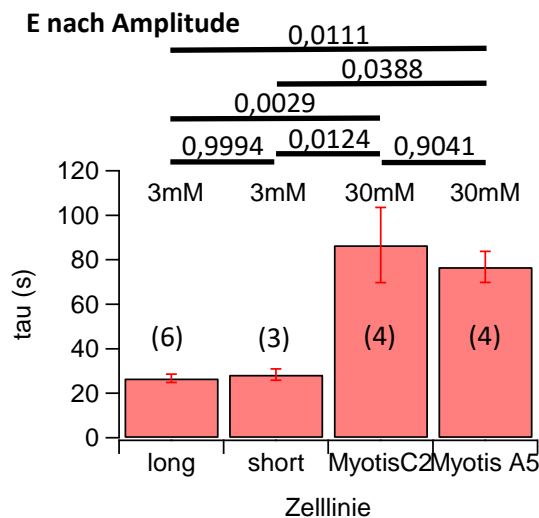


Abbildung 6.15: Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Abnahme in Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren

Darstellung der Ca^{2+} -Abnahme (τ in Sekunden), welche nach der maximalen Ca^{2+} -Amplitude, in mit extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von 30 mM (A), 10 mM (B), 3 mM (C) und 1 mM (D) behandelten $hTRPV6_{long}$, $hTRPV6_{short}$, $TRPV6_{Myotis\ Klon\ C2}$ und $TRPV6_{Myotis\ Klon\ A5}$ exprimierenden HEK Zellen, detektiert wurde. (E) Vergleich der Kinetik der Ca^{2+} -Abnahme in $hTRPV6_{long}$, $hTRPV6_{short}$, $TRPV6_{Myotis\ Klon\ C2}$ und $TRPV6_{Myotis\ Klon\ A5}$ exprimierenden HEK Zellen anhand des Erreichens ähnlicher intrazellulärer Ca^{2+} -Amplituden, d.h. nach Applikation von 3 mM extrazellulärem Ca^{2+} für $hTRPV6_{long}$, $hTRPV6_{short}$ und 30 mM extrazellulärem Ca^{2+} für $TRPV6_{Myotis\ Klon\ C2}$ und $TRPV6_{Myotis\ Klon\ A5}$. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Säulendiagrammen bei denen der Mittelwert \pm Standardfehler und die Anzahl der zusammengefassten Einzelerperimente in bzw. über den Säulen in Klammern angegeben ist. Die Balken stellen die Unterschiede zwischen zwei verglichenen Gruppen dar und geben die jeweiligen p-Werte an.

6.2.3 Calciumkinetik beim „inversen Protokoll“

Die Kinetik der Ca^{2+} -Abnahme, welche sich zwischen den TRPV6-Varianten aus Mensch und Myotis unterscheidet, wurde mithilfe eines weiteren Protokolls untersucht. Hierbei wurden die Zellen beim letzten Schritt der Fura-2-Beladung in 2 mM Ca^{2+} -Lösung resuspendiert.

Nachdem die Messungen in 2 mM Ca^{2+} -Lösung begonnen wurden, erfolgte bei Sekunde 100 die Zugabe von 3 mM BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), welches als Ca^{2+} -Chelator fungiert. Die Bindung des extrazellulär vorhandenen Ca^{2+} , führt auch zur Ca^{2+} -Abnahme in den Zellen. Bei Sekunde 400 wurde 3 mM Ca^{2+} appliziert, sodass erneut eine freie extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM erreicht wurde. Mit Hilfe einer einfach exponentiellen Funktion wurde die Zeitkonstante τ des initialen Ca^{2+} - bzw. Ratio- Abfalls bestimmt (Abbildung 6.16 A, B). Die Zeitkonstante τ der durch extrazellulärer Applikation von BAPTA erzeugten intrazellulären Ca^{2+} -Abnahme beträgt bei $hTRPV6_{long}$ (n = 8) $18,41 \pm 1,26$ Sekunden und bei $TRPV6_{Myotis\ Klon\ A5}$ (n = 8) $16,43 \pm 1,27$ Sekunden und ist nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 6.16 B). Die darauffolgende

Zugabe von Ca^{2+} führt dann wiederum zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Signals, welches bei den $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ -exprimierenden Zellen zu einer Ratio führt, die doppelt so groß wie der anfängliche Basiswert ist. Zum Schluss der Messungen ist die für $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon A5}}$ und den humanen $\text{TRPV6}_{\text{long}}$ die kanalcharakteristische Abnahme des Ca^{2+} -Signales zu erkennen.

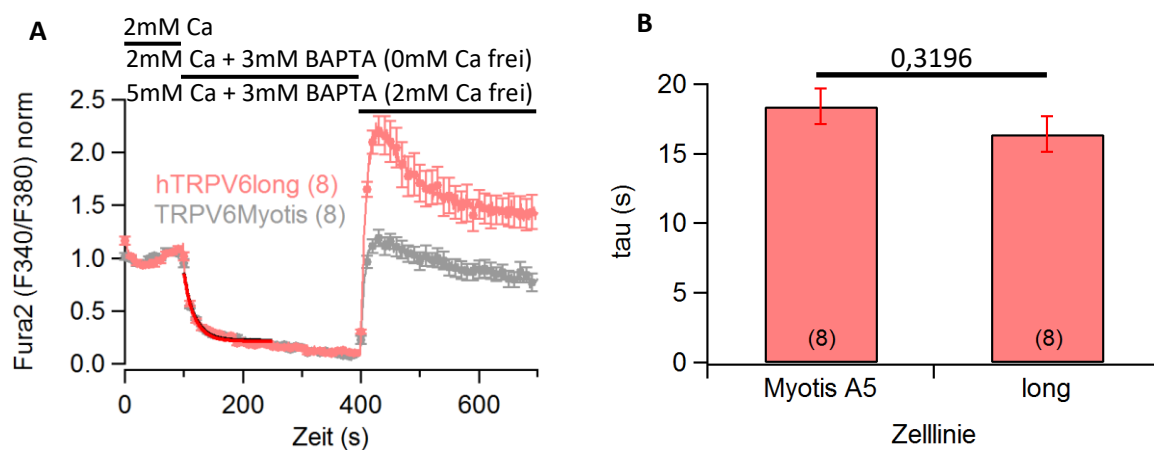


Abbildung 6.16: Ca^{2+} -Kinetik in HEK Zellen, die verschiedene TRPV6-Varianten exprimieren, beim „inversen Ca^{2+} -Protokoll“

HEK Zellen, die $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ (hellrot) und $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon A5}}$ (grau) exprimieren, wurden mit Fura-2 beladen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Änderungen (Ratio F340 / F380) detektiert. Die Mittelwerte der jeweiligen TRPV6-Variante sind nach Abzug des Minimums und Normierung auf den Basiswert dargestellt (siehe Kapitel 5.6.4), wobei jeder 10. Wert \pm Standardfehler angegeben ist. Zudem wurden die Mittelwert-Graphen der beiden Varianten mithilfe einer einfach exponentiellen Funktion ($\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ = rot; $\text{TRPV6}_{\text{Myotis}}$ = schwarz) auf ihre Kinetik in Bezug auf die Ca^{2+} -Abnahme analysiert (A). Die Balken geben die aktuelle Konzentration von freiem Ca^{2+} an, welche durch Applikation von 3 mM BAPTA und anschließend 3 mM Ca^{2+} entstand. Das Säulendiagramm gibt die zusammengefassten τ -Werte der Einzelmessungen wieder, welche für $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon A5}}$ und $\text{hTRPV6}_{\text{long}} \pm$ Standardfehler angegeben sind (B). Die Anzahl der zusammengefassten Einzelmessungen ist in Klammern und der p-Wert ist über den Säulen angegeben.

6.3 Rolle von Calmodulin in Bezug auf die TRPV6-Funktion

TRPV6 ist ein Ca^{2+} -selektiver Ionenkanal, dessen Aktivität stark durch zytosolisches Ca^{2+} reguliert ist. Hierbei könnte Calmodulin als Ca^{2+} -sensitives Protein eine entscheidende Rolle einnehmen und eine Hemmung von TRPV6 bewirken. In bereits veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Ionenkanal mehrere potentielle Bindestellen für Calmodulin besitzt und diese einen auch effektiven Einfluss auf die Regulation nehmen können (Bolanz et al., 2008; Bolanz et al., 2009; Cao et al., 2013; Derler et al., 2006; Haverstick et al., 2000; Hirnet et al., 2003; Hoenderop et al., 2001; Lambers et al., 2004; Nilius and Owsianik, 2011; Sternfeld et al., 2007). Aus diesem Grund wurde an zwei Zelllinien, welche $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ bzw. $\text{TRPV6}_{\text{Myotis Klon A5}}$ exprimieren, die Auswirkung von Trifluoperazin (TFP) auf

die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ermittelt. Bei Trifluoperazin handelt es sich um eine Substanz, die eine antagonistische Wirkung gegenüber Calmodulin besitzt (Zimmer and Hofmann, 1984).

Die mit Fura-2 beladenen Zellen mit der jeweiligen exprimierten TRPV6-Variante und die dazu gehörigen Kontrollzellen ohne TRPV6-Expression wurden im „Fast Filter“-Modus gemessen (Abbildung 6.17 A-D). Dabei wurde in den ersten 100 Sekunden der Basiswert des Ratio-Signals der Zellen, welcher sich in allen vier Gruppen nicht unterschied, ermittelt. Mit der darauffolgenden Applikation von diversen Trifluoperazin-Konzentrationen treten die ersten Auffälligkeiten auf. Bei den hohen Konzentrationen (100 μM , 300 μM , 1 mM) kommt es sowohl in den TRPV6-exprimierenden Zellen, als auch in deren Kontrollen zu einem abrupten Anstieg der Ratio. Dieser TRPV6-unabhängige Effekt könnte möglicherweise durch eine Eigenfluoreszenz von Trifluoperazin ausgelöst werden. Nach der Applikation von Trifluoperazin, welches über eine Zeit von 200 Sekunden inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 3 mM extrazellulärem Ca^{2+} . Bei den Zellen mit hTRPV6_{long} und TRPV6_{Myotis Klon A5} ist ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu verzeichnen, welcher bei steigender Trifluoperazin-Konzentration geringer wird. Eine Ausnahme besteht jedoch für die mit 300 μM Trifluoperazin behandelten Zellen, die nach der Applikation von 3 mM Ca^{2+} einen enormen Ratio-Anstieg aufwiesen. Dieses Verhalten tritt auch bei den Kontrollzellen auf, bei denen die Ca^{2+} -Zugabe ansonsten nur geringe Ca^{2+} -Erhöhung auslöst. Es liegt eine erkennbare Abhängigkeit des maximalen Ca^{2+} -Signals von der Trifluoperazin-Konzentration vor. Die Maxima, der durch 3 mM extrazelluläres Ca^{2+} hervorgerufenen intrazellulären Ca^{2+} - bzw. Ratio-Anstiege bei den unterschiedlichen TRPV6-Konzentrationen, wurden auf das Ca^{2+} -Signal bei Applikation von Badlösung (Bad) normiert, der Mittelwert der Signale der entsprechenden Kontrollen zuvor abgezogen und eine Dosis-Wirkungs-Kurve wurde angefertigt, wobei die Werte für 300 μM Trifluoperazin aufgrund des TRPV6-unabhängigen Effektes nicht mit einbezogen wurde (Abbildung 6.17 E, F). Erkennbar ist eine Reduktion der maximalen Ca^{2+} -Signale, die von der applizierten Trifluoperazin-Konzentration abhängig ist. Die gemittelten Werte für die in den Einzelmessungen bestimmten halbmaximalen Hemmung (hTRPV6_{long}: $\text{IC}_{50} = 46,66 \pm 11,93 \mu\text{M}$; TRPV6_{Myotis Klon A5}: $\text{IC}_{50} = 35,86 \pm 8,34 \mu\text{M}$), sowie für den Hill-Koeffizient der jeweiligen sigmoidalen Fits (hTRPV6_{long}: Hill = $1,44 \pm 0,48$; TRPV6_{Myotis Klon A5}: Hill = $1,76 \pm 0,1$), sind bei beiden TRPV6-Varianten voneinander nicht signifikant unterschiedlich (IC_{50} : $p = 0,5231$; Hill: $p = 0,594$).

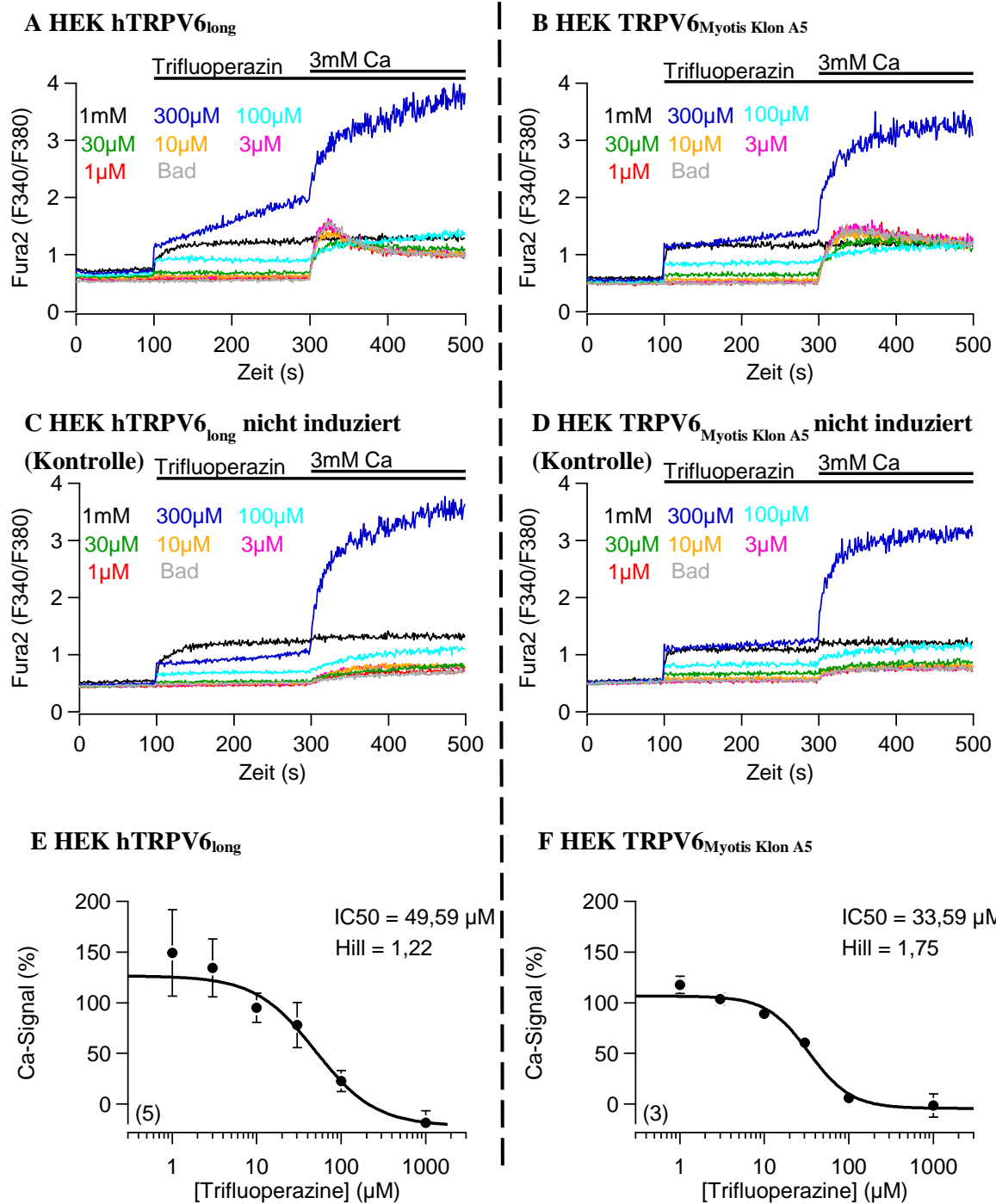


Abbildung 6.17: Effekt von Trifluoperazin auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom

Repräsentative Beispiele für die Detektion von Ca²⁺-Signalen durch Fura-2 in hTRPV6_{long} (A) und TRPV6_{Myotis Klon A5} (B) exprimierenden HEK Zellen und die entsprechenden nicht TRPV6 exprimierenden Kontrollzellen (C, D), die mit Trifluoperazin und Ca²⁺ behandelt wurden. Die Balken geben den Zeitpunkt der Applikation von diversen Trifluoperazin-Konzentrationen und 3 mM Ca²⁺ an. (E, F) Die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen die aus den Einzelerperimenten gemittelten maximalen Ca²⁺-Signal ± Standardfehler in Bezug auf die hinzugegebene Trifluoperazin-Konzentration, sowie den IC₅₀-Wert und den Hill-Koeffizienten des jeweiligen sigmoidalen Fits. Die Anzahl der gemittelten Einzelerperimente ist in Klammern dargestellt.

Die Vermutung, dass eine Eigenfluoreszenz von Trifluoperazin Einfluss auf die Experimente nehmen könnte, wurde mithilfe des „Spectra Scan“-Modus im Fluoreszenz-Spektrophotometer untersucht. Die Küvette wurde mit Lösungen, welche sich in ihren Trifluoperazin-Konzentrationen unterscheiden, gefüllt und über ein Spektrum von 250 bis 480 nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde dabei bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm, bei der auch die Detektion des Fura-2-Signales stattfindet, aufgezeichnet (Abbildung 6.18 A). Während bei der Badlösung ohne Trifluoperazin keine Fluoreszenz zu detektieren ist, kommt es bei den Konzentrationen 30 μM , 100 μM und 300 μM zu einem konzentrationsabhängig steigenden Fluoreszenzsignal, welches seinen Peak bei ungefähr 310 nm hat (Abbildung 6.18 A). 1 mM Trifluoperazin erzeugte eine Fluoreszenz, die unter der 300 μM Kurve liegt und insgesamt zwei Peaks bei 290 und 340 nm aufweist. Nach dem gleichen Prozedere wurden Trifluoperazin-Lösungen untersucht, die nun zusätzlich 30 mM Ca^{2+} enthielten, um eine mögliche Interaktion zwischen Trifluoperazin und Ca^{2+} zu untersuchen (Abbildung 6.18 B). Die Messungen ergeben nahezu identische Fluoreszenzen wie ohne Ca^{2+} , sodass eine Beeinflussung von Ca^{2+} auf das durch Trifluoperazin erzeugte Fluoreszenzsignal ausgeschlossen werden kann. Nichtsdestotrotz beeinflusst TFP die Fluoreszenz bei Fura-2 Messungen. Dieser Effekt wird bei der Auswertung dieser Experimente jedoch durch das Ratioverfahren und vor allem den Abzug der Ca^{2+} -Signale der Kontrollzellen vom TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signal korrigiert.

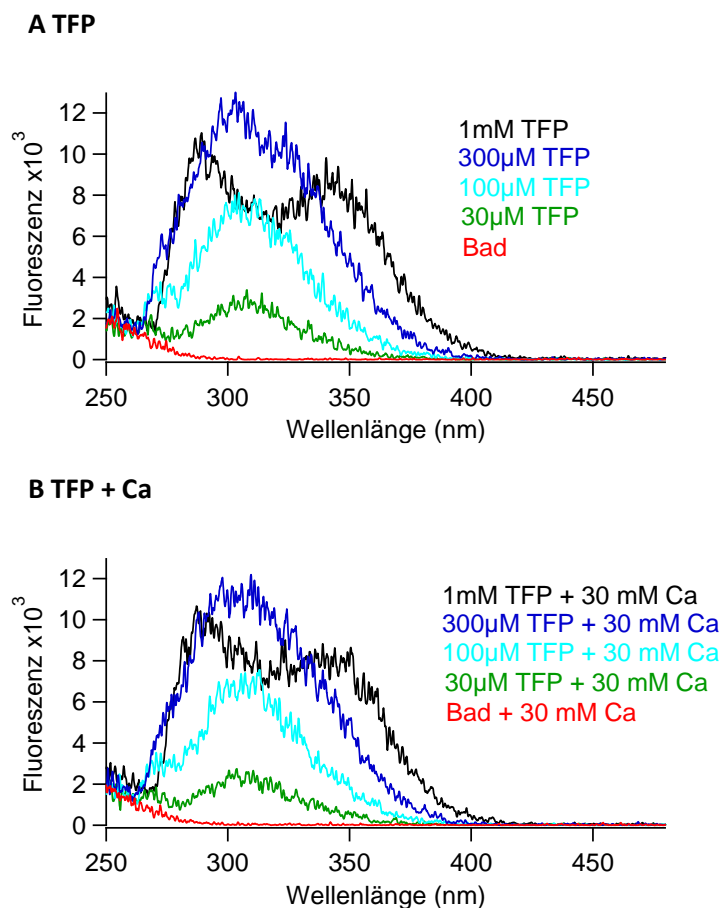


Abbildung 6.18: Untersuchung der Eigenfluoreszenz von Trifluoperazin

Darstellung der Fluoreszenz von in Ringerlösung gelösten unterschiedlichen Trifluoperazin-Konzentrationen in 0 Ca^{2+} (A) und in Anwesenheit von 30 mM Ca^{2+} (B) bei einem Anregungsspektrum von 250 – 480 nm, und detektiert bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm \pm 10 nm.

Zur weiteren Kontrolle wurden zwei weitere, als Calmodulin-Inhibitoren bekannte, Substanzen benutzt: Calmidazolium und Ophiobolin A (Gietzen, 1983; Leung et al., 1984). Die Experimente fanden mit Fura-2-beladenen hTRPV6_{long}-exprimierenden HEK Zellen statt (Abbildung 6.19 A, B). Dabei wurde nach Messung der Ratio bzw. des Basiswertes der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration unterschiedliche Konzentrationen an Calmidazolium / Ophiobolin A hinzugegeben und für 200 Sekunden inkubiert. Es folgte die Applikation von 3 mM Ca²⁺ für weitere 200 Sekunden.

Beide, Calmidazolium (Abbildung 6.19 A) und Ophiobolin A (Abbildung 6.19 B), hatten bis zu einer Konzentration von 30 µM keinen eindeutigen Effekt, weder auf die Basisratio, noch auf den durch 3 mM extrazelluläres Ca²⁺ ausgelösten intrazellulären Ca²⁺- bzw. Ratio-Anstieg. Bei 100 µM Calmidazolium konnte sowohl in den TRPV6-exprimierenden, als auch in den Kontrollzellen ein langsamer Ca²⁺-Anstieg in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ gemessen werden. Zusätzlich ist bei beiden Zellpopulationen nach Zugabe von 3 mM Ca²⁺ ein sich ähnelnder Anstieg im Ratiosignal zu erkennen, welcher auf einen TRPV6-unabhängigen Effekt von 100 µM Calmidazolium auf das intrazelluläre Fura-2-Signal hindeutet. Die Analyse der maximalen TRPV6-abhängigen intrazellulären Ca²⁺-Signale (siehe Kapitel 5.6.5) ergab lediglich eine signifikante Reduktion bei 100 µM Ophiobolin A (Abbildung 6.19 E, F).

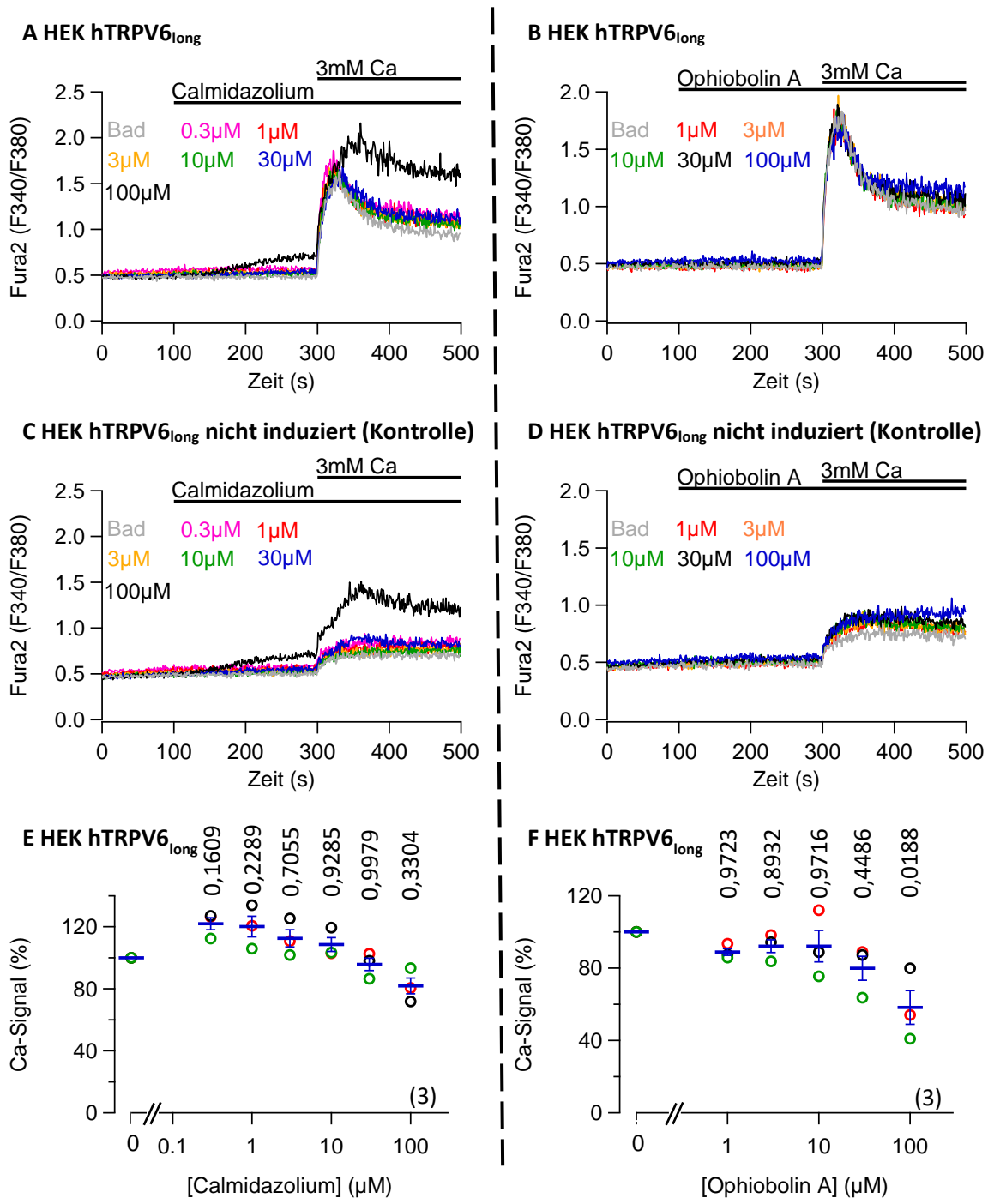


Abbildung 6.19: Effekt von Calmidazolium & Ophiobolin A auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom

Fura-2-beladene HEK Zellen, die hTRPV6_{long} exprimieren (24 induziert) und nicht induzierte Kontrollzellen wurden nacheinander mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calmidazolium (A, C) / Ophiobolin A (B, D) und 3 mM Ca²⁺ behandelt, und die intrazellulären Ca²⁺-Änderungen detektiert (repräsentative Beispiele). Die Balken indizieren die Applikation der jeweiligen Substanz und Lösung. Das Maximum des TRPV6-abhängigen Signals (siehe Kapitel 5.6.1) wurde ermittelt, auf die Badapplikation als 100 % normalisiert und in Abhängigkeit zu den entsprechenden Calmidazolium (E) / Ophiobolin A (F) Konzentrationen dargestellt. Die Einzelexperimente sind als Punkte und die

Mittelwerte als Querstriche \pm Standardfehler zu erkennen. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist in Klammern angegeben. Über den einzelnen Konzentrationen sind die p-Werte in Bezug auf die Applikation von Badlösung ($0 \mu\text{M}$) dargestellt. Lediglich der Ca^{2+} -Anstieg bei Applikation von $100 \mu\text{M}$ Ophiobolin A war signifikant gegenüber der Kontrolle (Badlösung; 100 %) reduziert.

Da kaum ein signifikanter Einfluss von Calmidazolium / Ophiobolin A auf das maximale intrazelluläre Ca^{2+} -Level bestand, fand zusätzlich die Betrachtung der Kinetik der einzelnen Ca^{2+} -Signale statt. Aber auch der Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde (Abbildung 6.20 A, B) und der Ca^{2+} -Abfall als τ in Sekunden (Abbildung 6.20 C, D) wiesen für die unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Substanzen keinen signifikanten Effekt auf. Zusammenfassend konnte die bei Trifluoperazin gesehene Hemmung durch andere Calmodulin-Inhibitoren somit nicht bestätigt werden.

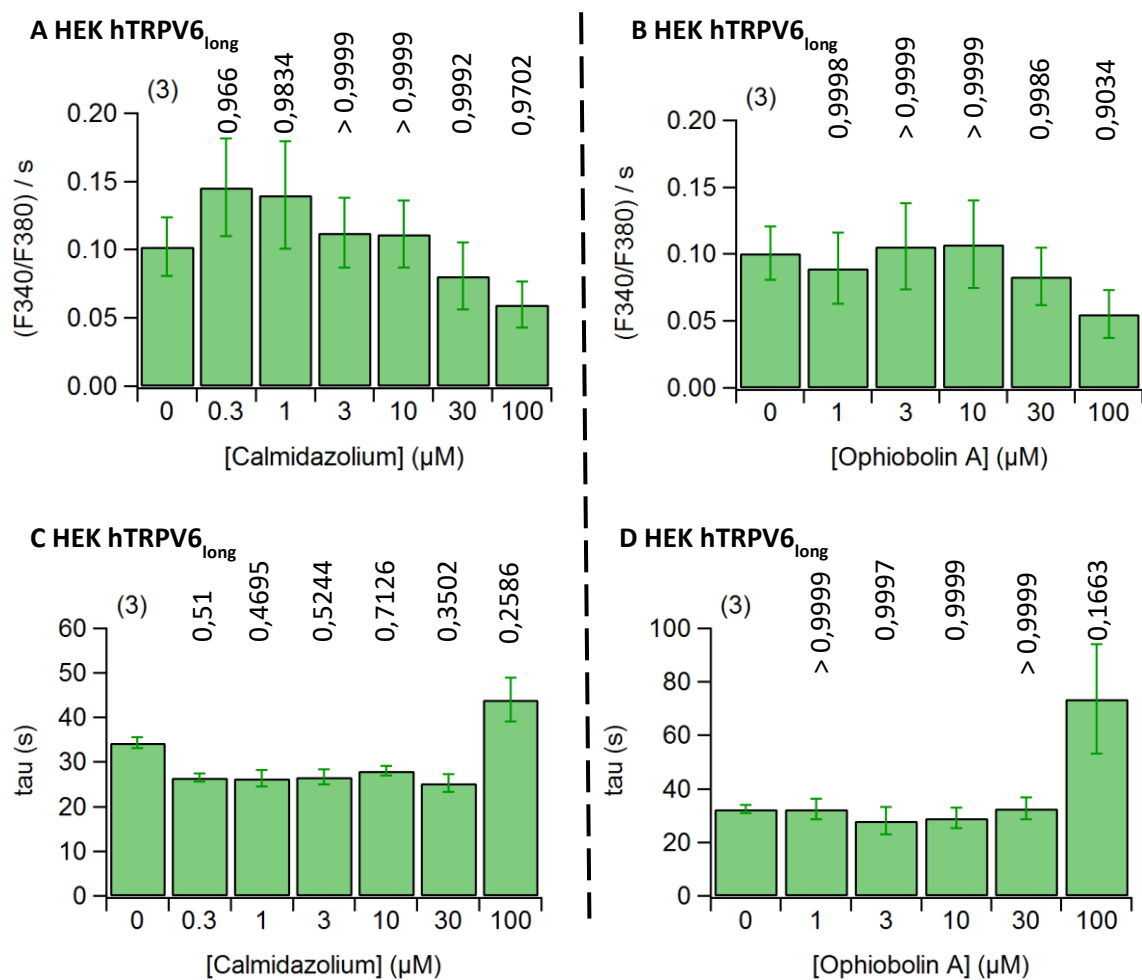


Abbildung 6.20: Kinetik der TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signale bei Applikation verschiedener Konzentrationen von Calmidazolium und Ophiobolin A

Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde (A, B) und Ca^{2+} -Abnahme als τ in Sekunden (C, D) der TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signale nach Zugabe von 3 mM extrazellulären Ca^{2+} ohne (0) und mit Inkubation verschiedener Konzentrationen der Calmodulin-Inhibitoren Calmidazolium und Ophiobolin A in TRPV6-exprimierenden HEK Zellen, dargestellt als Säulendiagramme. In den Grafiken sind die Mittelwerte \pm

Standardfehler und die Anzahl der Einzelerperimente in Klammern angegeben. Die p-Werte über den Säulen geben an, dass bei keiner Substanzkonzentration, weder beim Ca^{2+} -Anstieg, noch Ca^{2+} -Abfall ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Applikation von Badlösung; 0) vorhanden war.

6.4 Rolle der Protein Kinase C in Bezug auf die TRPV6-Funktion

Neben Calmodulin scheint auch die Protein Kinase C (PKC) einen Einfluss auf die Regulation von TRPV6 zu haben. Es wurde nämlich eine mögliche PKC-Phosphorylierungsstelle im Calmodulin-bindenden Bereich von TRPV6 nachgewiesen (Niemeyer et al., 2001). Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dieser möglichen Modulierbarkeit von TRPV6 über die Beeinflussung der PKC. Dabei wurde zunächst die Substanz Chelerythrin verwendet, welche als ein Inhibitor der PKC gilt (Herbert et al., 1990). Die intrazellulären Ca^{2+} -Änderungen wurden mittels Fura-2 sowohl in hTRPV6_{long} und TRPV6_{Myotis Klon A5} exprimierenden HEK Zellen, als auch in den dazu passenden Kontrollen ohne TRPV6-Expression detektiert (Abbildung 6.21 A-D). Nach 100 Sekunden fand die Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen von Chelerythrin, gefolgt von einer 3 mM Ca^{2+} -Zugabe bei Sekunde 300, statt. Bei allen vier Zellpopulationen war ein identischer Basiswert zu messen, der sich auch bei der Applikation von Chelerythrin nicht verändert. Nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} (3 mM) kam es in den TRPV6-exprimierenden Zellen zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, der mit steigenden Konzentrationen an Chelerythrin (3 μ M, 10 μ M, 30 μ M) immer geringer wurde. Bei 30 μ M Chelerythrin sind die Ca^{2+} -Signale zwischen TRPV6 Zellen und deren Kontrollen sogar fast identisch und kein TRPV6-spezifischer Ca^{2+} -Einstrom konnte mehr festgestellt werden. Die Maxima der einzelnen Ratios nach Ca^{2+} -Applikation wurden ermittelt und in Mittelwerte zusammengefasst. Anschließend folgte die Normierung auf das Ca^{2+} -Maximum bei Zugabe von Badlösung und das Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Abbildung 6.21 E, F). Es zeigt sich eine klare Abhängigkeit des aus den Einzelmessungen gemittelten maximalen TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signals von der Chelerythrin-Konzentration (hTRPV6_{long}: $IC_{50} = 4,1 \pm 0,74 \mu$ M; TRPV6_{Myotis Klon A5}: $IC_{50} = 2,59 \pm 0,22 \mu$ M), welche, genau wie der gemittelte Hill-Koeffizient der jeweiligen sigmoidalen Fits (hTRPV6_{long}: Hill = $5,85 \pm 3,17$; TRPV6_{Myotis Klon A5}: Hill = $2,66 \pm 0,05$), bei beiden TRPV6-Varianten keinen signifikanten Unterschied aufweist (IC_{50} : $p = 0,1202$; Hill: $p = 0,3714$). Dies bedeutet, dass sich die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit von hTRPV6_{long} und TRPV6_{Myotis} bezüglich der Substanz Chelerythrin nicht unterscheidet.

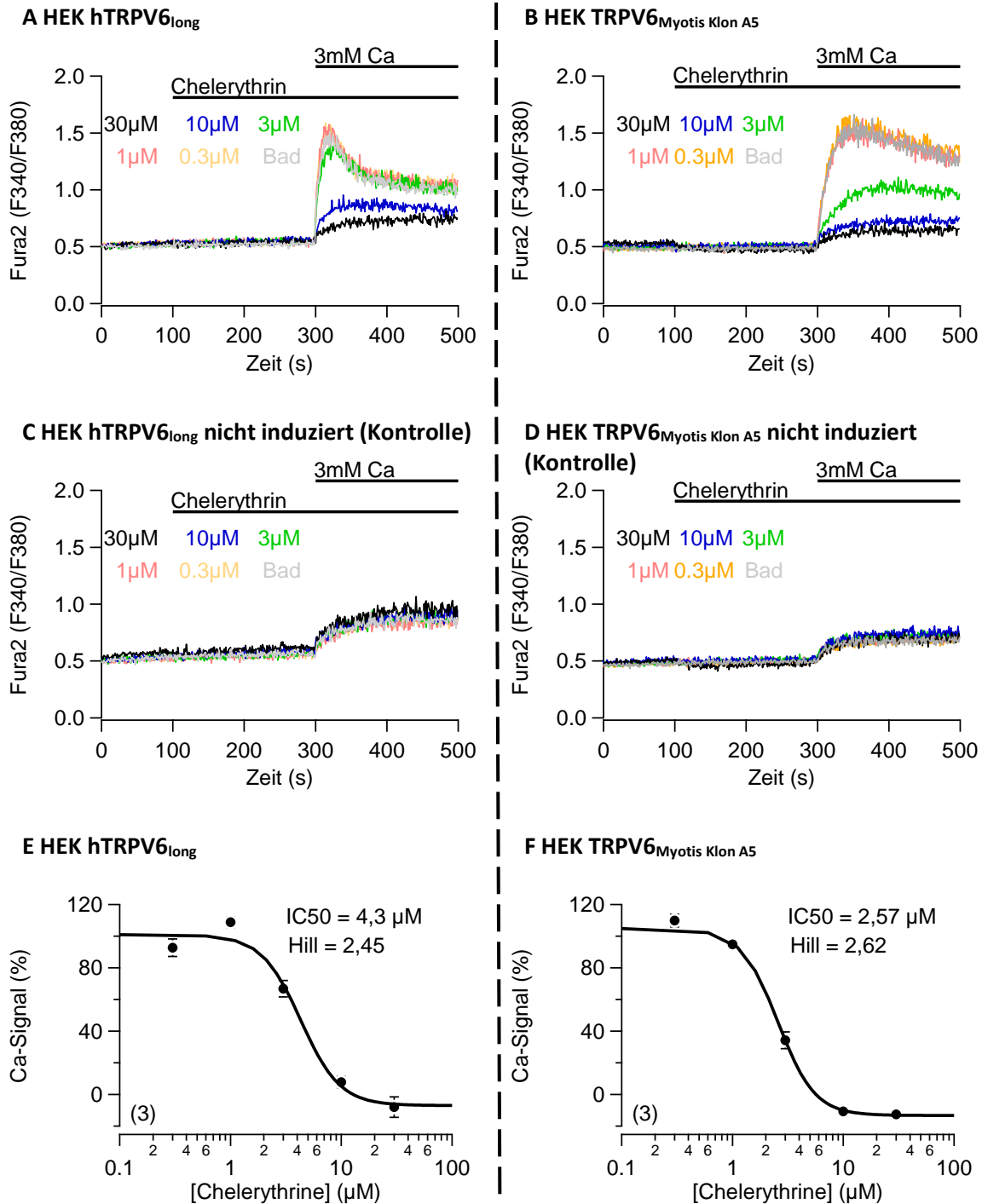


Abbildung 6.21: Effekt von Chelerythrin auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom

Repräsentative Darstellung intrazelluläre Ca²⁺-Änderungen (Fura-2; F340 / F380) in HEK Zellen mit Expression von hTRPV6_{long} (A) / TRPV6_{Myotis} Klon A5 (B) und den entsprechenden Kontrollzellen (nicht induziert; C, D). Die Balken geben die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Chelerythrin gefolgt von 3 mM Ca²⁺ an. Die Beziehung zwischen den Maxima der TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Signale und der applizierten Chelerythrin-Konzentration sind als Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt (E, F). Hierbei sind die aus den Einzelexperimenten gemittelten maximalen Ca²⁺-Signal ± Standardfehler und

die Anzahl der Einzelerperimente in Klammern angegeben. Die Grafiken enthalten die Werte für die IC_{50} und den Hill-Koeffizienten.

Zur Bestätigung des Ergebnisses fanden weitere Experimente mit PKC-modulierenden Substanzen statt. Zum einen wurde der PKC-Inhibitor Gö 6983 (Gschwendt et al., 1996) und zum anderen der PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Blumberg, 1988) verwendet. HTRPV6_{long}-exprimierende HEK Zellen (Abbildung 6.22 A, B), als auch die entsprechenden nicht induzierten Kontrollzellen (Abbildung 6.22 C, D) wurden mit Fura-2 beladen und das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal bei Zugabe von diversen Gö 6983- / PMA-Konzentrationen und 3 mM Ca^{2+} detektiert. Zu Beginn der Experimente wurde ein Basiswert bei allen Zellpopulationen detektiert, welcher sich auch durch die Zugabe der jeweiligen Substanzkonzentration nicht verändert. Wird nun Ca^{2+} addiert, kommt es zu einer Erhöhung der Ratio-Signale, die bei allen Konzentrationen der beiden Substanzen im gleichen Bereich liegen. Die Maxima der einzelnen Ratios wurden auf das Ratio-Maximum bei Applikation von Badlösung als 100 % normiert und im Verhältnis zur Konzentration von Gö 6983 / PMA dargestellt (Abbildung 6.22 E, F). Auch wenn bei Gö 6983 mit steigender Konzentration eine leichte Tendenz zu einer Verringerung des TRPV6-abhängigen intrazellulären Ca^{2+} -Signals und bei PMA eine leichte Tendenz zur Erhöhung dieses Signals zu erkennen ist, liegen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (Badlösung) vor.

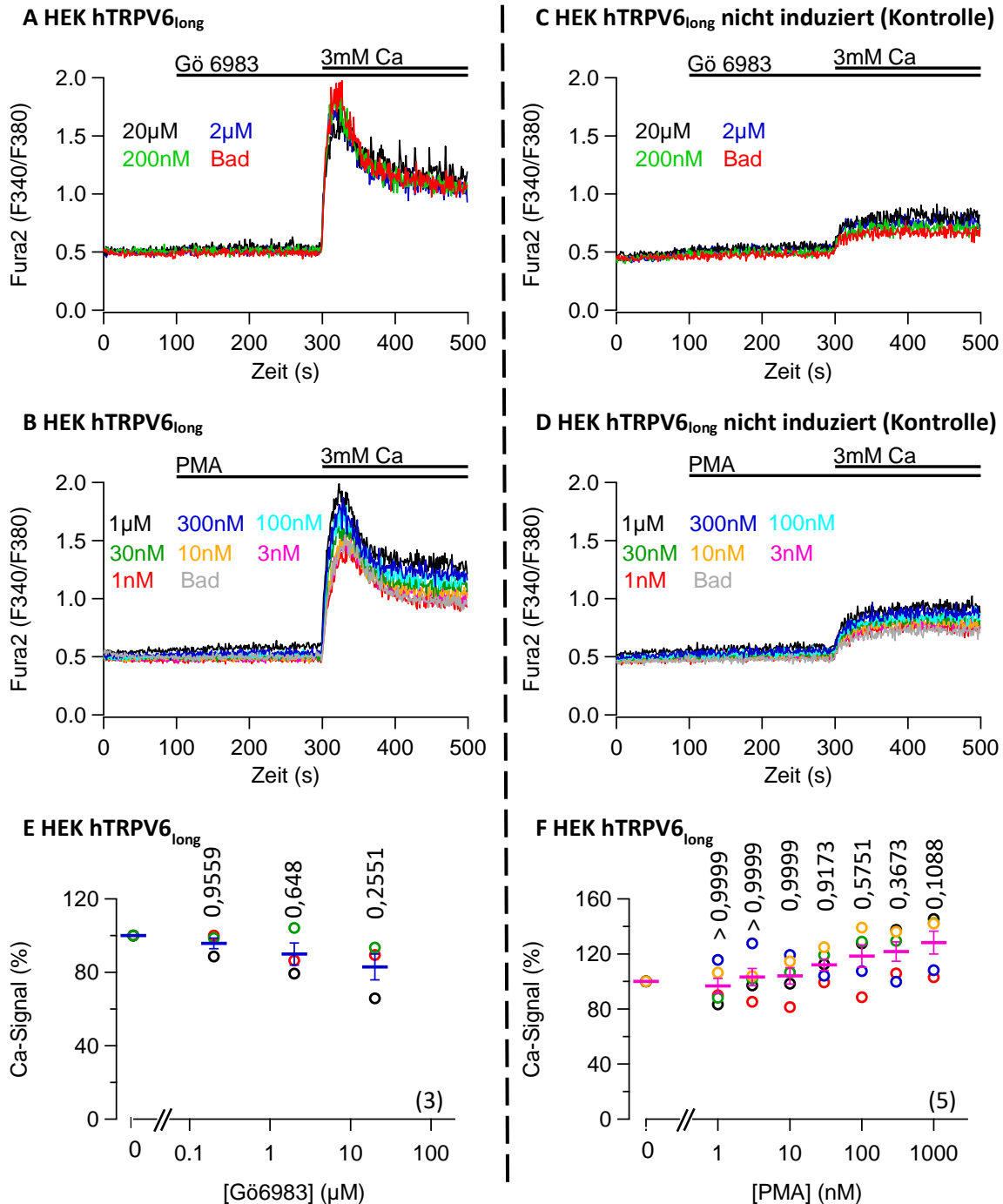


Abbildung 6.22: Effekt von Gö 6983 & PMA auf den TRPV6-abhängigen Ca²⁺-Einstrom

Mit Fura-2 beladene, hTRPV6_{long}-exprimierende HEK Zellen und die entsprechenden Kontrollzellen (nicht induziert; C, D) wurden mit diversen Konzentrationen an Gö 6983 (A) / Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (B) und mit 3 mM Ca²⁺ behandelt. Die dabei entstehenden intrazellulären Ca²⁺-Änderungen wurden gemessen und jeweils ein repräsentatives Beispielerperiment dargestellt. Die Balken indizieren die Applikation der unterschiedlichen Substanz-Konzentrationen und Ca²⁺-Lösung. Das Maximum des TRPV6-abhängigen Signals (siehe Kapitel 5.6.1) wurde ermittelt, auf die Badapplikation als 100 % normalisiert und in Abhängigkeit zu den entsprechenden Gö 6983 (E) / PMA (F) Konzentrationen dargestellt. Die Einzelexperimente sind als Punkte und die Mittelwerte als

Querstriche \pm Standardfehler zu erkennen. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist in Klammern angegeben. Die TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signalen sind bei Applikation von verschiedenen Konzentrationen an Gö 6983 / PMA in Bezug auf die Badapplikation (100 %) nicht signifikant verändert (p -Werte sind über den jeweiligen Konzentrationen dargestellt).

Es folgte die Untersuchung der Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Signale. Hierfür wurden die einzelnen Kurven nach ihren Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde und auf die Ca^{2+} -Abnahme als τ in Sekunden hin ausgewertet (Abbildung 6.23 A-D). Während bei der Applikation für Gö 6983 weder für den Ca^{2+} -Anstieg, noch für die Ca^{2+} -Abnahme ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen und der Badapplikation festgestellt werden konnte, fand bei Zugabe von PMA eine bei fast allen Konzentrationen, außer 300 μ M PMA, auftretende signifikant schnellere Ca^{2+} -Abnahme statt, als es im Vergleich zur Applikation von Badlösung der Fall gewesen ist. Hingegen konnte auch bei PMA kein signifikanter Effekt der PMA-Konzentrationen auf den Ca^{2+} -Anstieg ermittelt werden. Als Fazit konnte der bei Chelerythrin auftretende hemmende Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch andere Modulatoren der PKC nicht bestätigt werden.

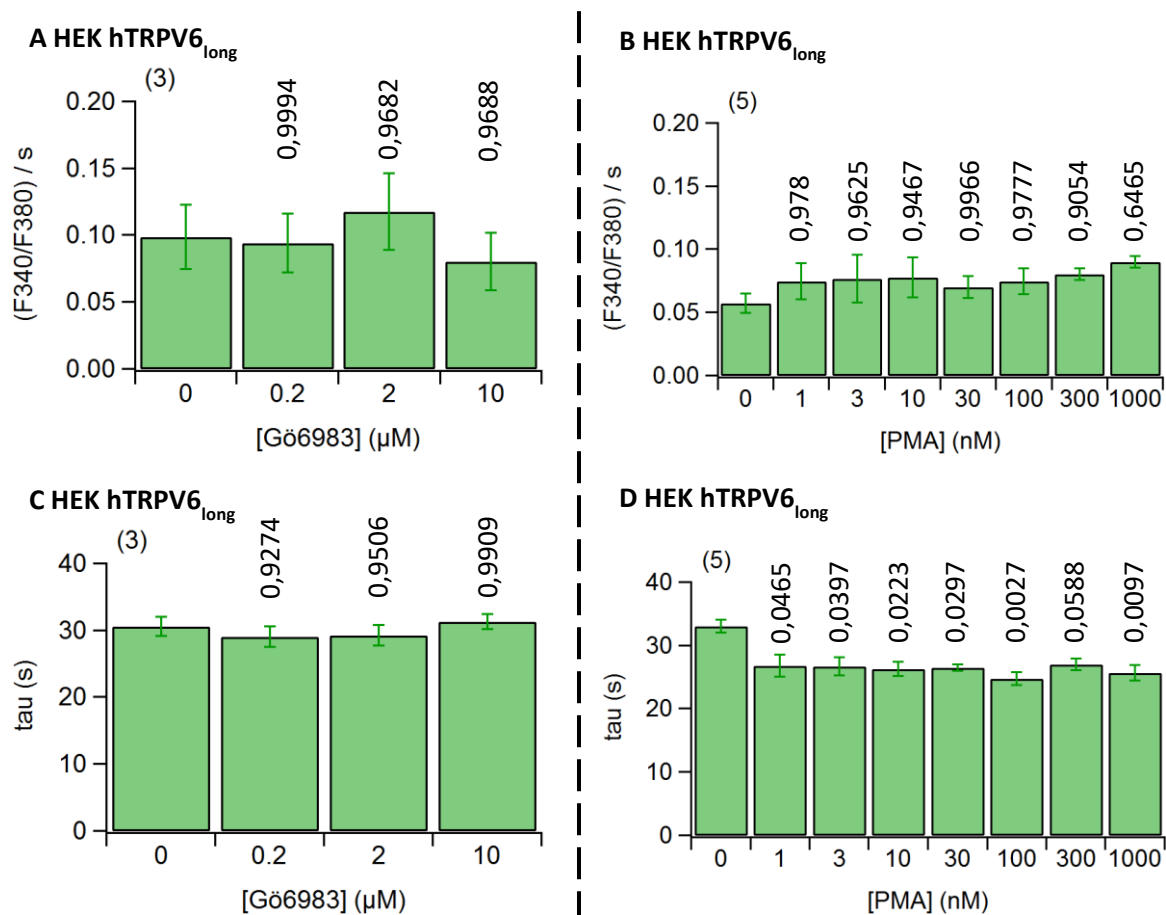


Abbildung 6.23: Kinetik der TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signale in Anwesenheit verschiedener Gö 6983-Konzentrationen

Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde (A, B) und Ca^{2+} -Abnahme als τ in Sekunden (C, D) der TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signale nach Zugabe von 3 mM extrazellulären Ca^{2+} ohne (0) und mit Inkubation verschiedener

Konzentrationen der Protein Kinase C-Inhibitoren Gö 6983 und PMA in TRPV6-exprimierenden HEK Zellen, dargestellt als Säulendiagramme.. In den Grafiken sind die Mittelwerte \pm Standardfehler und die Anzahl der Einzelexperimente in Klammern angegeben. Die Amplituden der intrazellulären Ca^{2+} -Signale bei den verschiedenen Gö 6983- und PMA-Konzentrationen wurde gegen die Amplitude des Ca^{2+} -Signales der Kontrolle (Badlösung; 0) auf einen signifikanten Unterschied getestet (p -Werte sind über den jeweiligen Säulen dargestellt).

6.5 Effekt von Hexylresorcinol

Die Beeinflussung der TRPV6-Aktivität wurde mit einer Vielzahl von Substanzen getestet. Eine weitere wichtige Fragestellung besteht zudem in einer möglichen Hemmung dieses Ca^{2+} -Kanals. Dessen Transkripte wurden in verschiedenen Karzinomen (Brust, Prostata) nachgewiesen, sodass TRPV6-hemmende Substanzen in der Therapie maligner Erkrankungen Anwendung finden könnten (Bolan et al., 2008; Fixemer et al., 2003). Die Substanz Hexylresorcinol ist ein solcher Inhibitor des Kanals TRPV6 und wurde in unserem Institut bereits in „Patch Clamp“- und „Single Cell Calcium Imaging“-Experimenten erfolgreich eingesetzt. Eine Publikation der aus den Experimenten gewonnenen Daten existiert zum momentanen Zeitpunkt jedoch nicht.

Die folgenden Experimente wurden mit HEK Zellen durchgeführt, die hTRPV6_{long} exprimieren und mit Fura-2 beladen wurden. Sowohl diese Zellen, als auch die entsprechenden Kontrollzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Hexylresorcinol, gefolgt von einer Applikation von 3 mM Ca^{2+} , behandelt (Abbildung 6.24 A, B). In den aufgeführten Beispielerperimenten ist beim Hinzufügen von hohen Hexylresorcinol-Konzentrationen (100 μ M, 300 μ M) ein schnell einsetzender Anstieg der Ratio zu erkennen (Abbildung 6.24 A). Dies konnte auch in Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 6.24 B). Bei nachfolgender Applikation von 3 mM Ca^{2+} steigen die intrazellulären Ca^{2+} -Signale in den hTRPV6_{long}-exprimierenden Zellen deutlich an, während bei den Kontrollen nur eine minimal höhere Ratio verzeichnet werden kann. Auffallend ist dabei, dass die Ratio bei einer Hexylresorcinol-Konzentration von 300 μ M nach Ca^{2+} -Zugabe in beiden Zellpopulationen einen großen Anstieg erkennen lässt, der von der TRPV6-Expression unabhängig ist, weshalb diese Konzentration in den weiteren Auswertungen nicht näher untersucht wird. Bei den hTRPV6_{long}-exprimierenden Zellen wurden die einzelnen Maxima der Ratios ermittelt, auf das Maximum der Ratio bei Badapplikation als 100 % normiert und als Mittelwert dargestellt (Abbildung 6.24 C). Lediglich bei 100 μ M Hexylresorcinol konnte eine signifikante Reduktion des TRPV6-abhängigen intrazellulären Ca^{2+} -Signals beobachtet werden. Niedrigere Hexylresorcinol-Konzentrationen führten zu keinem feststellbaren Unterschied in Bezug auf die Badapplikation. Neben der Amplitude wurde auch die Kinetik des Ca^{2+} -Anstiegs und Ca^{2+} -Abfall bei Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} (3 mM) nach Inkubation mit der einzelnen Hexylresorcinol-Konzentration analysiert (Abbildung 6.24 D, E). Während in Bezug auf den Ca^{2+} -Anstieg pro Sekunde keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse ermittelt werden konnten, fiel bei der Ca^{2+} -Signal-Abnahme auf, dass, wie bei der Amplitude (Abbildung 6.24 C), auch

der Ca^{2+} -Abfall bei 100 μM Hexylresorcinol von der Kontrolle signifikant verschieden war (Abbildung 6.24 E).

Im Gesamten konnte nur bei 100 μM von Hexylresorcinol ein inhibierender Effekt auf $\text{hTRPV6}_{\text{long}}$ nachgewiesen werden. Noch höhere Konzentrationen an Hexylresorcinol (300 μM) führten zu Fluoreszenzsignalen in TRPV6- und Kontrollzellen, sowohl in Abwesenheit, als auch bei Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} , und sind somit unabhängig von TRPV6.

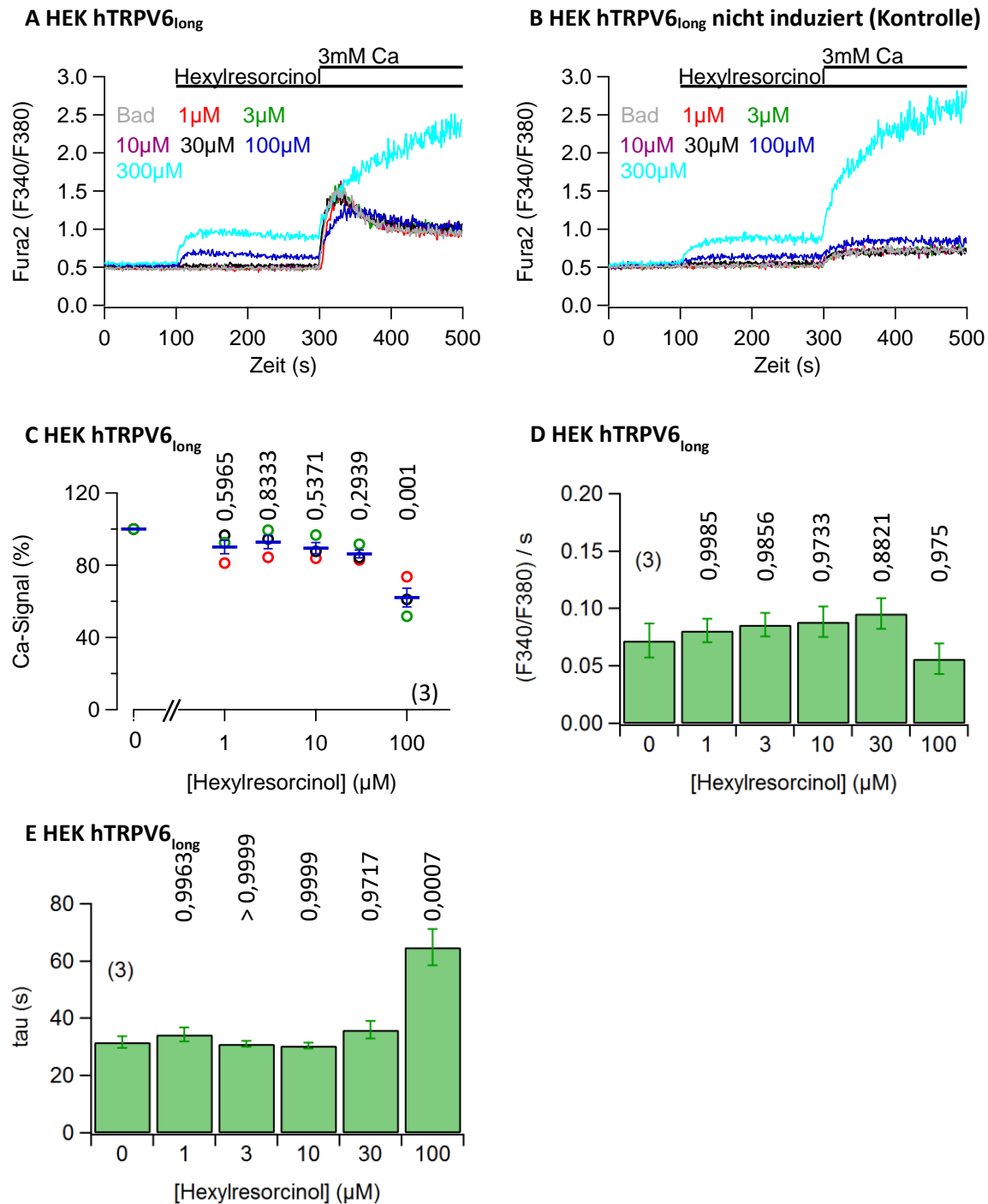


Abbildung 6.24: Effekt von Hexylresorcinol auf den TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom

(A, B) Repräsentative Ca^{2+} -Messungen (Fura-2, F340 / F380) in HEK Zellen, die Tetracyclin-induziertes $hTRPV6_{long}$ exprimieren, welche mit 100 μ g/ml Tetracyclin für 16 - 24 Stunden stimuliert (A) oder nicht stimuliert wurden (Kontrolle, B). Die Balken markieren die Applikation von verschiedenen Konzentrationen von Hexylresorcinol bzw. Badlösung (Kontrolle) in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} und die Applikation von 3 mM Ca^{2+} . (C) Maximale Amplituden der durch Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} (3 mM) ausgelösten TRPV6-abhängigen intrazellulären Ca^{2+} -Signale in Anwesenheit der verschiedenen Hexylresorcinol-Konzentrationen nach Abzug der entsprechenden Ca^{2+} -Signale in den Kontrollzellen und normiert auf die Amplitude bei Vorapplikation von Badlösung (0 Ca^{2+} , 100 %). (D, E) Anstiegssteilheit (F340 / F380 pro s) (D) und Zeitkonstante tau (τ in s) des Abfalls (E) des durch extrazelluläre Applikation von 3 mM Ca^{2+} ausgelösten TRPV6-abhängigen (nach Abzug der Ca^{2+} -Signale der Kontrollzellen) intrazellulären Ca^{2+} -Signals in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Hexylresorcinol. Die Daten sind dargestellt als Einzelerperimente (Kreise) und Mittelwerte \pm Standardfehler in C, und als Mittelwert (Balken) \pm Standardfehler in D und E. Amplituden, Anstiegssteilheit und Ca^{2+} -Abfall wurden mithilfe des „One-way ANOVA“ in Kombination mit „Tukey’s multiple comparison test“ auf einen Unterschied in Bezug auf die Kontrolle (0 Ca^{2+}) getestet. Die entsprechenden p-Werte sind über den Säulen / Konzentrationen und die Anzahl der gemittelten Experimente in Klammern angegeben.

6.6 Einfluss von TRPV6-Modulatoren nach Vorinkubation

Einige der untersuchten Substanzen, bei denen eine Wirkung auf TRPV6 vermutet wurde, zeigten keinen oder nur einen geringen Effekt. Um eine eventuell verzögerte Wirkung dieser Substanzen einzubeziehen, wurden in einem weiteren Versuch die Zellen über 30 Minuten mit dem jeweiligen Modulator inkubiert, bevor die Messung begonnen wurde. Die Dosierung fand dabei orientierend an den, in vorherig durchgeführten Experimenten, maximal benutzten Konzentrationen mit TRPV6-abhängigen Effekt statt.

In den in Abbildung 6.25 A und B dargestellten Experimenten ist erkennbar, dass bereits zu Beginn der Messungen für 50 μ M Hexylresorcinol und 50 μ M Ophiobolin A (OA) ein leicht erhöhter Ca^{2+} -Basiswert, sowohl in TRPV6-Zellen, als auch in Kontrollzellen (Abbildung 6.25 B), vorliegt. Nach Zugabe von 3 mM Ca^{2+} erreicht das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal in Anwesenheit von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) eine höhere und in Anwesenheit von Ophiobolin A eine niedrigere maximale Amplitude als bei der Kontrolle (Bad) und den anderen Substanzen (Abbildung 6.25 A). Die maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Signale nach Zugabe von 3 mM extrazellulären Ca^{2+} bei 30-minütiger Inkubation von 1 μ M PMA und 50 μ M OA zeigte auch bei der statistischen Auswertung in Bezug zum intrazellulären Ca^{2+} -Signal bei extrazellulärer Applikation von Badlösung (0 Ca^{2+}) einen signifikanten Unterschied (Abbildung 6.25 C). Hierbei waren die intrazellulären Ca^{2+} -Maxima im Vergleich zur Badlösung bei PMA um ein geringes Signifikanzniveau erhöht und bei OA um ein hohes

Signifikanzniveau erniedrigt. Der Vergleich dieser maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Signale, bei denen die Zellen vor Ca^{2+} -Applikation für 30 Minuten mit der jeweiligen Substanz inkubiert wurden, mit den auf die Badlösung normalisierten Ca^{2+} -Maxima bei der Applikation der Substanz ohne vorherige Inkubation und anschließendem Hinzufügen von 3 mM Ca^{2+} (Abbildung 6.19 E und F, 6.22 E und F, 6.24 C), zeigte keinen signifikanten Unterschied ((1. Wert = 30 Minuten Substanzinkubation; 2. Wert = ohne Substanzinkubation) 1 μM PMA : 1 μM PMA $p = 0,6331$; 10 μM Gö : 2 μM Gö $p = 0,5092$; 10 μM Gö : 20 μM Gö $p = 0,8762$; 30 μM CAL : 30 μM CAL $p = 0,2027$; 50 μM HR : 30 μM HR $p = 0,5154$; 50 μM HR : 100 μM HR $p = 0,0504$; 50 μM OA : 30 μM OA $p = 0,1261$; 50 μM OA : 100 μM OA $p = 0,7211$).

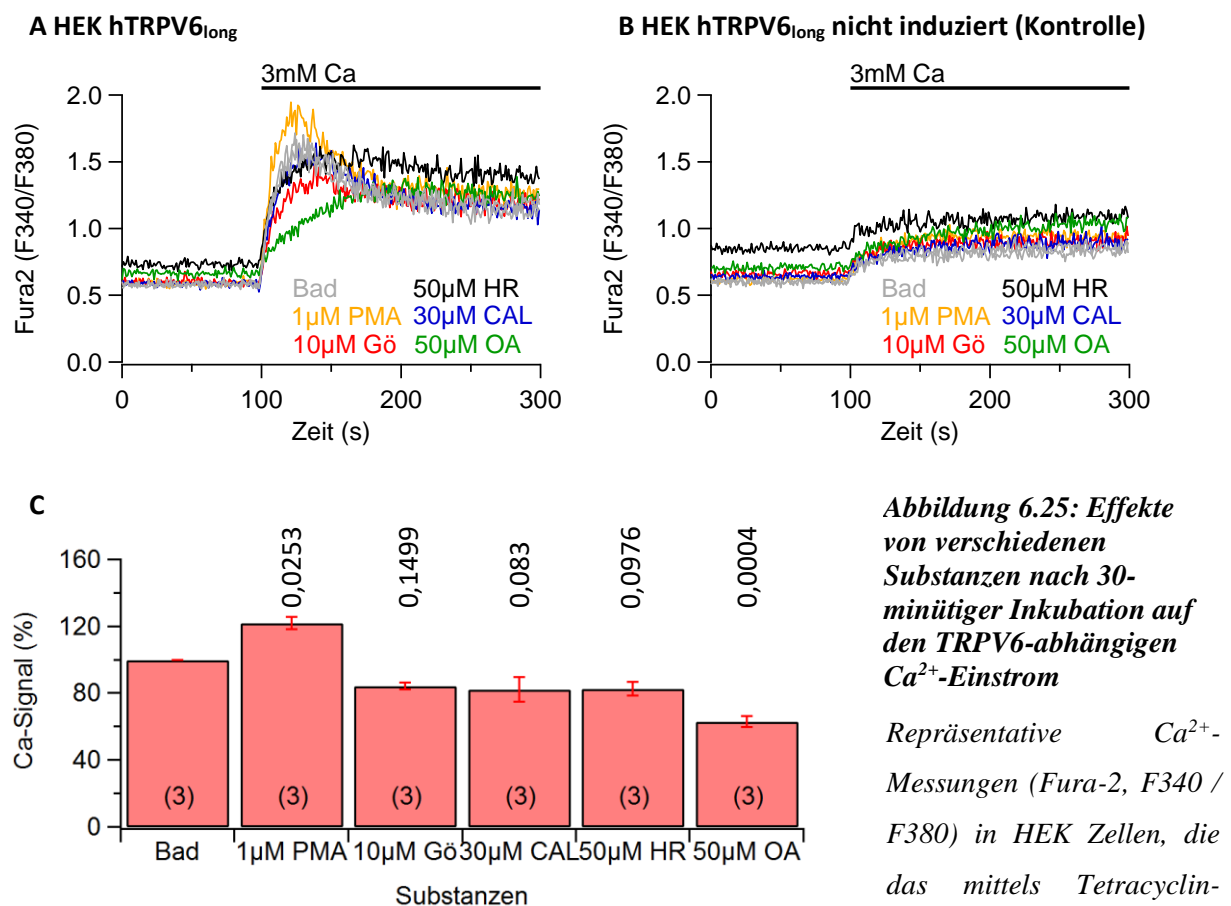


Abbildung 6.25: Effekte von verschiedenen Substanzen nach 30-minütiger Inkubation auf den TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom

Repräsentative Ca^{2+} -Messungen (Fura-2, F340 / F380) in HEK Zellen, die das mittels Tetracyclin-induzierbare Protein hTRPV6_{long} exprimieren, welche mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin für 16 - 24 Stunden stimuliert (A) oder nicht stimuliert wurden (Kontrolle, B). Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 1 μM PMA, 10 μM Gö6983, 30 μM Calmidazolium (CAL), 50 μM Ophiobolin A (OA) oder 50 μM Hexylresorcinol (HR) in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} inkubiert. Die Balken markieren die Applikation von 3 mM extrazellulären Ca^{2+} . (C) Maximale und auf die Badapplikation normierte (Bad = 100%), durch extrazelluläre Applikation von 3 mM Ca^{2+} ausgelöste TRPV6-abhängige (nach Abzug der Ca^{2+} -Signale der Kontrollzellen) intrazelluläre Ca^{2+} -Signale. Die Daten sind als Mittelwert (Balken) \pm Standardfehler dargestellt. Über den Säulen ist der p-Wert in Bezug auf die Badapplikation und in den Klammern die Anzahl der gemittelten Experimente angegeben.

induzierbare Protein hTRPV6_{long} exprimieren, welche mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin für 16 - 24 Stunden stimuliert (A) oder nicht stimuliert wurden (Kontrolle, B). Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 1 μM PMA, 10 μM Gö6983, 30 μM Calmidazolium (CAL), 50 μM Ophiobolin A (OA) oder 50 μM Hexylresorcinol (HR) in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} inkubiert. Die Balken markieren die Applikation von 3 mM extrazellulären Ca^{2+} . (C) Maximale und auf die Badapplikation normierte (Bad = 100%), durch extrazelluläre Applikation von 3 mM Ca^{2+} ausgelöste TRPV6-abhängige (nach Abzug der Ca^{2+} -Signale der Kontrollzellen) intrazelluläre Ca^{2+} -Signale. Die Daten sind als Mittelwert (Balken) \pm Standardfehler dargestellt. Über den Säulen ist der p-Wert in Bezug auf die Badapplikation und in den Klammern die Anzahl der gemittelten Experimente angegeben.

6.7 Funktionelle Untersuchung eines TRPV6-ähnlichen Proteins aus dem Proteobakterium

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten TRPV6-Varianten des Menschen und der Fledermaus „Myotis brandtii“ wurde ein Protein aus dem Proteobakterium untersucht, dessen Aminosäuresequenz Übereinstimmungen mit der Porenregion von hTRPV6_{long} aufweist (Abbildung 6.26). Es sind einzelne Aminosäure-Abschnitte, wie der S4/S5 Loop, die Transmembrandomänen S5 und S6, das TRP-Motiv, sowie der Selektivitätsfilter, der in TRPV6 maßgeblich an der Calciumleitfähigkeit beteiligt ist und durch einen Asparaginsäurerest (D, rot) repräsentiert wird, konserviert. Zur funktionellen Untersuchung wurde die cDNA für dieses Protein in eine Flp-In T-Rex HEK Zelllinie eingeführt.

```

Proteo  TGQFFLAVQKTVFSSQVRYFFLT---SLLFVSIIGGLVFLILYGDINNQFDGLWNSVENMGVL
Sapien  LGPFTIMIQKMIFGDLMRFCWLMMAVVILGFASAFYIIFQTEDPEELGHFYDYPMALESTFEL

Proteo  GFTGELPFVVIDDITMQNDRRAFVSRALIFIFIMACSLVMVNLISIMNE-VWN-AKMRSNLWD
Sapien  FLT-----IIDGPANYNVDLPPMYSITYAAFAI IATLLMLNLLIAMMGDTHWRVAHERDELWR
  
```

Abbildung 6.26: Gegenüberstellung der entsprechenden Sequenz eines TRPV6-ähnlichen Proteins aus Proteo und hTRPV6_{long}

Alignments der entsprechenden Sequenzen des TRPV6-ähnlichen Proteins aus einem Gammaproteobacterium (Proteo; GenBank number: ADI21424.1) und hTRPV6_{long} (Sapien). Dargestellt ist die Sequenz des Poren-Bereichs, welcher sich aus Transmembrandomäne 5, Pore und Transmembrandomäne 6 zusammensetzt. Der Selektivitätsfilter der Porenregion (D) ist in der Farbe „rot“ dargestellt. Mit einem grauen Hintergrund sind die zwischen den beiden Spezies übereinstimmenden Aminosäuren gekennzeichnet.

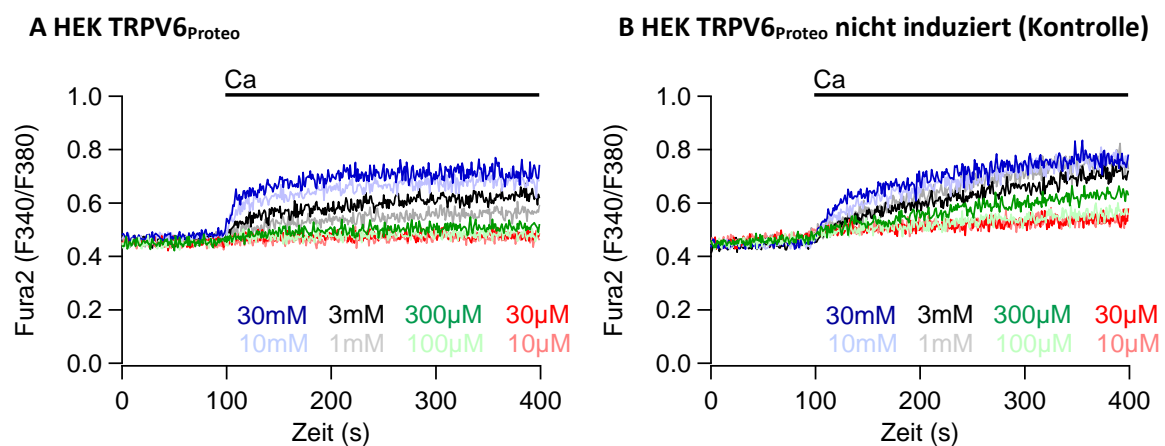


Abbildung 6.27: Ca^{2+} -Messungen in TRPV6_{Proteo}-exprimierenden HEK Zellen

Darstellung von beispielhaften Experimenten bei denen in TRPV6_{Proteo} exprimierenden Zellen (A) und entsprechende Kontrollzellen (B), welche keine Induktion mit Tetracyclin erfahren haben, Ca^{2+} -Messungen mithilfe von Fura-2 durchgeführt wurden. Die Balken zeigen die Applikation von diversen Ca^{2+} -Konzentrationen (10 µM bis 30 mM) an.

Anhand der Experimente ($n = 2$) mit HEK Zellen, die TRPV6_{Proteo} exprimieren (Abbildung 6.27 A) und den nicht TRPV6-exprimierenden Kontrollzellen (Abbildung 6.27 B) ist erkennbar, dass eine Applikation von aufsteigenden extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen sowohl mit als auch ohne TRPV6_{Proteo} zu intrazellulären Ca²⁺-Signalen führt, die sich in beiden Zellpopulationen nicht unterscheiden.

In von Ulrich Wissenbach mit einem Plasmid transient transfizierten Zellen, welches die cDNA für TRPV6_{Proteo} enthält, welche C-terminal an „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) gekoppelt ist, zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine eindeutige Expression des entsprechenden Proteins (Abbildung 6.28). Dabei kann jedoch vermutet werden, dass sich das Protein eher intrazellulär, im Bereich des endoplasmatischen Retikulums, und nicht in der Plasmamembran befindet.

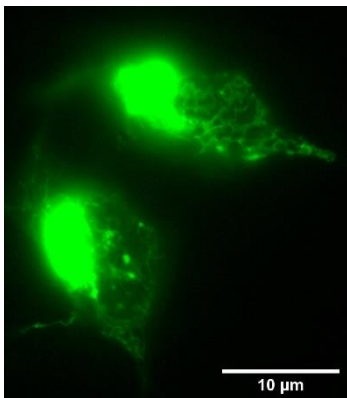


Abbildung 6.28: Mikroskopische Aufnahme von TRPV6_{Proteo}-GFP-exprimierenden HEK Zellen

Mit dem Plasmid „Proteo-FL-eGFP-pCAGGS“ transient transfizierte HEK Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters aufgenommen. Der Maßstab ist mittels eines Balkens, der 10 µm entspricht, angegeben. Die Aufnahme wurde von Ulrich Wissenbach, Pharmakologie der Universität des Saarlandes, bereitgestellt.

6.8 Fura-2-Kalibration

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 bietet dem Benutzer, neben dem Vorteil der Bestimmung einer Ratio aus zwei Fluoreszenzwellenlängen, die Möglichkeit die Ratio-Werte in Ca²⁺-Konzentrationen umzurechnen. Eine wichtige Voraussetzung bei der Kalibration besteht darin, dass sie gerätespezifisch ist und somit in dem Gerät ermittelt werden muss, in dem auch die zu kalibrierenden Experimente stattfanden.

Zur Ermittlung der gerätespezifischen Dissoziationskonstante ($K_{d,eff}$) wurden für die Experimente an zwei unterschiedlichen Tagen mit jeweils drei Durchgängen mit Fura-2-beladene HEK 293 Zellen verwendet. Im Fast-Filter-Modus wurden mithilfe der angesetzten Lösungen das maximale Fluoreszenzsignal, das minimale Fluoreszenzsignal und das Fluoreszenzsignal bei einer Ca²⁺-Konzentration von 225 nM bestimmt (Tabelle 6.3). Anschließend wurde aus den insgesamt sechs Experimenten das arithmetische Mittel bestimmt und durch Einfügen in die umgestellte Gleichung von Grynkiewicz et al. (siehe Kapitel 5.3.2) die $K_{d,eff}$ von Fura-2 ermittelt.

$Kd_{eff} = ([Ca^{2+}]_i * (R_{max} - R)) / ((R - R_{min}) / (Sf2 / Sb2))$						
Experiment	Ratio Rmin	Ratio Rmax	Ratio R225	380 nm Rmin	380 nm Rmax	Errechnete Kd _{eff}
1	0,386	4,403	0,491	64698,824	12044,373	1551,812
2	0,396	4,457	0,517	60217,98	11582,863	1407,18
3	0,408	4,931	0,582	58050,294	10023,745	970,265
4	0,431	5,809	0,503	43706,784	5994,235	2304,333
5	0,417	6,12	0,551	38674,412	6004,608	1453,252
6	0,436	6,161	0,566	37133,902	5784,882	1501,235
Mittelwert	0,412 ± 0,007	5,314 ± 0,304	0,535 ± 0,014	50413,699 ± 4464,841	8572,451 ± 1108,485	1486,52
$Kd_{eff} = (225 * (5,314 - 0,535)) / ((0,535 - 0,412) / (8572,451 / 50413,699)) = 1486,52$						

Tabelle 6.3: Berechnung der Kd_{eff} für Fura-2

Darstellung der umgestellten Formel zur Fura-2-Kalibration nach Grynkiewicz et al., aufgelöst zur Bestimmung der umgebungsspezifischen Kd_{eff} (oben). Die Einzelerperimente mit den jeweiligen Messwerten und der entsprechenden Kd_{eff} sind aufgeführt (mittig). Aus den einzelnen Messwerten wurde das arithmetische Mittel errechnet ($n = 6$) und auf drei Stellen nach dem Komma gerundet. Anschließend wurden die gemittelten Werte in die umgestellte Formel eingefügt und die daraus resultierende Kd_{eff} berechnet (unten).

Es wurde ein Experiment ausgesucht anhand dessen die Kalibration getestet wurde. Hierfür wurden die einzelnen Ratio-Werte in die Formel, mit der neu bestimmten Dissoziationskonstante ($Kd_{eff} = 1486,52$), eingefügt und eine neue Grafik wurde erstellt. Mit der neuen Skalierung ist erkennbar, dass in den Zellen ein Basiswert von ungefähr 100 nM Ca^{2+} herrscht. Bei einer Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 30 mM, kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration auf bis zu 4 μ M (Abbildung 6.29 A, B).

Die Fura-2-Kalibrierung wurde dennoch nur exemplarisch durchgeführt. Dies liegt daran, dass in meiner Arbeit ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen TRPV6-Varianten und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen stattfindet. Dieser Vergleich der Ergebnisse kann auch direkt aus dem Verhältnis der Ratio-Werte zueinander gezogen werden. Des Weiteren muss beachtet werden, dass auch die Messungen der Kalibrations-Experimente stets gewissen Schwankungen unterliegen. Mit einem Verzicht der Kalibration kann somit die Übertragung dieser geringen Schwankungen verhindert werden.

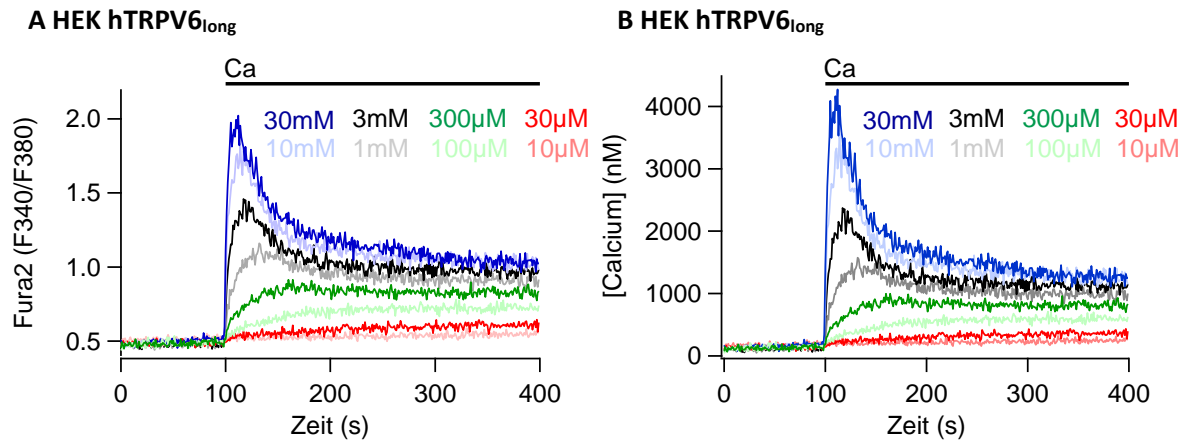


Abbildung 6.29: Darstellung eines Experimentes mit Umrechnung der Fura-2-Intensität in intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen

Darstellung eines Experimentes, bei dem die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen in HEK Zellen, die hTRPV6_{long} exprimieren im Fast-Filter-Modus gemessen wurden. Bei Sekunde 100 erfolgte die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Ca^{2+} (10 μ M bis 30 mM). In A ist die Ratio F340 / F380 und in B die entsprechende Calciumkonzentration dargestellt.

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der man Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration mittels eines Fluoreszenz-Spektrophotometers quantitativ erfassen kann. Der Vorteil gegenüber anderen Calcium-Imaging Verfahren besteht darin, dass eine große Menge an Zellen gleichzeitig als „bulk“ innerhalb einer Küvette gemessen werden kann. Dabei wurden Vor- und Nachteile des Verfahrens dargestellt und ein Protokoll zur Zellvorbereitung erläutert und ausgiebig getestet. Zudem konnte mittels dieser Arbeit eine geräte- und umgebungsspezifische Fura-2-Kalibration präsentiert werden, welche eine realistische Umrechnung der Fura-2-Ratio in intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen erlaubt. Mithilfe des anfangs vorgestellten Verfahrens wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit von TRPV6 (human_{long}, human_{short} und myotis) charakterisiert und untereinander verglichen. Ergänzend hierzu fand die Betrachtung der Beeinflussbarkeit von hTRPV6_{long} mittels Modulatoren für Calmodulin (CaM) und Protein Kinase C (PKC) statt. Auch eine mögliche Hexylresorcinol-bedingte Inhibition von TRPV6 wurde überprüft.

7.1 Zytoplasmatische Ca^{2+} -Messung mithilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers

Damit das Calcium Imaging mithilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers verwertbare Ergebnisse liefert ist es nötig sowohl die Geräteeinstellungen, als auch die Zellvorbereitungen zu optimieren und mögliche Störfaktoren zu minimieren. Die Geräteeinstellungen wurden so eingestellt, dass ein möglichst hohes, Fura-2-spezifisches und rauschfreies Fluoreszenzsignal erzeugt wurde. Bei der Zellvorbereitung wurde sich an dem von Saotome et al., 2016 verwendetem Protokoll orientiert, sodass sowohl der grobe Ablauf, als auch die Pufferzusammensetzung sich nur leicht unterscheiden. Dennoch gab es vereinzelt Abschnitte, bei denen sich für ein anderes Vorgehen entschieden wurde. Hierzu zählt die hier verwendete Zentrifugation der Zellen bei 68 x g im Vergleich zu einer Beschleunigung von 600 x g (Saotome et al., 2016). Auch bei einer 10-fach geringeren Beschleunigung kam es zur Entstehung eines für die Experimente ausreichenden Zellpellets, weshalb diese Wahl mit Blick auf einen für die Zellen verringerten Stress bevorzugt werden kann (Chao et al., 2012; Henning et al., 2015; Leverett et al., 1972). Während der Etablierung fiel zudem auf, dass je nach gewählter Methode der Fura-2-Beladung verschieden hohe Fluoreszenzwerte erreicht wurden. Letztendlich wurde sich für die Beladung mithilfe des Wärmeschüttlers und 10 μM Fura-2 entschieden. Saotome et al., 2016 hingegen führten ihre Fura-2-Beladung im Inkubator ohne kontinuierliches Schütteln durch und erlangten dennoch relativ rauschfreie Ergebnisse. In weiteren Veröffentlichungen wurde zudem beschrieben, dass die Verwendung von geringeren Fura-2-Konzentrationen (5 μM) auch zu ausreichenden Fluoreszenzintensitäten führt (Patel et al., 2013). Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu anderen Protokollen besteht darin, dass die Fura-2-Beladung in 2 ml, anstelle von 30 ml Flüssigkeit durchgeführt wurde (Patel et al., 2013). Ein Nachteil, auch in Hinblick auf die mögliche Toxizität der beiden Spaltprodukte Formaldehyd und Essigsäure, welche bei der Hydrolyse des Fura-2-Acetoxy-methylesters

entstehen, wurde nicht festgestellt. Dies wird mithilfe der Feststellung, dass bei Formaldehyd-Konzentrationen < 1 mM in Erythrozyten und Mastzellen, aufgrund der hohen Zellpermeabilität dieses Moleküls, keine zytotoxischen Effekte auftreten, unterstützt (Tsien, 1981). Gerade bei der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 gibt es eine Reihe von Problemquellen, die für ein reproduzierbares Ergebnis möglichst minimiert werden müssen (Roe et al., 1990). Hierzu zählt unter anderem das Ausbleichen von Fura-2 durch die Bestrahlung mit Licht, weshalb während der Zellvorbereitung die entsprechenden Gefäße mit Aluminiumfolie umwickelt wurden. Auch während der Messungen findet ein Ausbleichen des Farbstoffs statt, wobei dies nicht zu verhindern ist und die maximale Belichtungsdauer der Zellen 500s betrug. Kommt es zu einer Verletzung oder Zerstörung von bereits mit Fura-2 beladenen Zellen tritt der Farbstoff in die extrazelluläre Flüssigkeit über und reagiert direkt mit dem hinzugefügtem Ca^{2+} , sodass die intrazelluläre Ca^{2+} -Messung verfälscht wird. Um diesem Problem vorzubeugen wurde sich dafür entschieden eine Zentrifugationsbeschleunigung von $68 \times g$ zu verwenden und die beladenen Zellen, solange sie noch nicht für die Messungen benutzt wurden, auf Eis zu lagern, um auch eventuelle passive und aktive Transportmechanismen von intrazellulär nach extrazellulär zu verringern (Patel et al., 2013). Zudem berichtet Roe et al., 1990, dass es je nach verwendeter Zelllinie zu einer vermehrten unvollständigen Hydrolyse der Fura-2-Acetoxymethyl-Ester und auch zum Übergang von Fura-2 in nicht-zytoplasmatische Zellorganellen kommen kann. Dies würde dazu führen, dass ein Teil von Fura-2 nicht auf Ca^{2+} reagiert bzw. die falsche Ca^{2+} -Konzentration widerspiegelt. Ein Verhindern dieser Effekte ist nur schwer möglich, weshalb ein möglicher Einfluss dieser Effekte mit beachtet werden sollte. Während der Experimente müssen die Zellen in ständiger Suspension gehalten werden, da sie ansonsten auf den Boden der Küvette absinken und nicht mehr für die Messung verfügbar wären. Aus diesem Grund ist die Verwendung eines Magnetrührers essentiell (Patel et al., 2013; Saotome et al., 2016). Ein kritischer Punkt besteht darin, dass die vorher mit Eis gekühlten Zellen unter einer physiologischen Temperatur gemessen werden sollten. Hierbei empfiehlt Patel et al., 2013 die Verwendung eines mittels Wasser auf 37°C erwärmten Küvettensockels, welcher in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet wurde (Patel et al., 2013). Ein Vorteil des Calcium Imaging in der Küvette ist, dass für eine Reihe an Messungen auf die gleichartig beladene Zellpopulation zurückgegriffen wird. Dies führt dazu, dass innerhalb einer Messreihe die Zellen einen beinahe identischen Basiswert besitzen und Veränderungen durch Applikationen untereinander besser miteinander verglichen werden können. Bei Saotome et al., 2016 fällt hingegen auf, dass die Basiswerte der einzelnen Messungen jedoch unterschiedlich sind.

7.2 Transiente vs. stabile / Tetracyclin-induzierte Expression von TRPV6 in HEK Zellen

Die transiente Transfektion von HEK Zellen mit TRPV6 ist ein etabliertes Verfahren, bei dem die Transfektion durch verschiedene Mechanismen gewährleistet werden kann (Fecher-Trost et al., 2013; Saotome et al., 2016; Wissenbach et al., 2001). In dieser Arbeit wurde cDNA, welche „green fluorescent protein“ (GFP) bzw. GFP + TRPV6 kodiert, mithilfe des Transfektionsreagenzes „Cell Avalanche“

transfiziert. Beim Calcium Imaging dieser transfizierten Zellen konnte jedoch kaum ein Unterschied zwischen den Zellen mit bzw. ohne TRPV6 festgestellt werden. Bei Betrachtung gleicher Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop fiel auf, dass nur ca. 10 - 20 % der Zellpopulation das Protein exprimieren. Saotome et al., 2016 hingegen erhielten, bei ihrer transienten Transfektion mithilfe von Baculoviren, beim Calcium Imaging mit Fura-2 Ratiowerte, welche nach sich anschließender Analyse der Abhängigkeit des maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Signals von der Applikation verschiedener extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen realistische EC_{50} -Werte für die beiden dort untersuchten TRPV6-Varianten ergaben ($\text{TRPV6}_{\text{crist}} = 1,7 \pm 0,26 \text{ mM}$; $\text{TRPV6}_{\text{WT}} = 1,47 \pm 0,8 \text{ mM}$) (Saotome et al., 2016). Sowohl die Zellbeladung mit Fura-2, als auch die Messung im Spektrofluorometer mittels der Quarzglas-Küvette und auch die Analyseschritte der Ergebnisse ähneln der in dieser Arbeit benutzten Methodik, sodass unter zusätzlicher Berücksichtigung der realistischen EC_{50} -Werte von einer effektiven Transfektion ausgegangen werden kann. Im Hinblick darauf, dass die erfolgreiche Transfektion von GFP bzw. GFP + TRPV6 mit der Wahl der Methode in Zusammenhang stehen könnte, wurde die Transfektion der cDNA mittels Elektroporation verwendet. Dabei handelt es sich um eine Methode, welche, verglichen mit der Transfektion mit einem Transfektionsreagenz, sowohl bei der Transfektionseffektivität, als auch in Bezug auf die Zelltoxizität, ähnliche Ergebnisse liefert (Maurisse et al., 2010). Während bei der Transfektion von GFP mithilfe der Elektroporation eine dreifach höhere Transfektionseffektivität erreicht wurde, war die erzielte Effektivität der Transfektion von GFP + TRPV6 geringer. Dies könnte möglicherweise mit der Größe der zu transfizierenden cDNA im Zusammenhang stehen. Um im Endeffekt jedoch eine effektive Expression garantieren zu können, wurden Zelllinien verwendet, welche die jeweilige TRPV6-Variante stabil exprimieren können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien benötigten für die Expression eine Aktivierung mittels Tetracyclin. Lediglich die Variante hTRPV6_{short} wurde dauerhaft in den Zellen exprimiert.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass hTRPV6_{short} im Vergleich zu hTRPV6_{long}, bei gleicher Applikation von extrazellulärem Ca^{2+} , höhere Fura-2-Signale aufweist, wobei die Gesamtkinetik beider TRPV6-Varianten identisch ist. Die Ergebnisse von Fecher-Trost et al., 2013 zeigten in Hinblick darauf, dass die Kanaleigenschaften von hTRPV6_{short} und hTRPV6_{long} sich kaum unterscheiden, jedoch die Translation von hTRPV6_{short} gegenüber derer von hTRPV6_{long} effizienter ist (Fecher-Trost et al., 2013). Da Kinetik und Kanaleigenschaften der beiden Kanalvarianten beinahe identisch sind, könnte geschlossen werden, dass die Unterschiede in der Höhe des Fura-2-Signales auf einer, im Vergleich zu hTRPV6_{long}, vermehrten Translation bzw. Expression von hTRPV6_{short} beruhen. Hingegen beschreibt Fecher-Trost et al., 2013 beinahe gleiche Fura-2-Signale trotz unterschiedlicher Translationseffektivität der Kanalvarianten. Möglicherweise kommt es in meiner Arbeit zu einem Unterschied in der Fura-2-Ratio, da die Spanne der Kanalexpression bei zwei verschiedenen TRPV6-exprimierenden Zellkulturen (hTRPV6_{short} wird dauerhaft stabil exprimiert; die Expression von hTRPV6_{long} muss ca. einen Tag vorher mittels Tetracyclin induziert werden) größer ist, als wenn bei beide Zellpopulationen eine zeitgleich durchgeführte transiente Transfektion der cDNA stattfindet.

7.3 Ca²⁺-, CaM- und PKC-abhängige Modulation von humanem TRPV6

Wie in dieser Arbeit dargestellt wurde, führte eine extrazelluläre Ca²⁺-Applikation sowohl beim Kanal hTRPV6_{long}, sowie hTRPV6_{short}, zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg, welcher bei den Kontrollzellen ohne hTRPV6-Expression nicht zu sehen war. Dabei besitzen beide Zellpopulationen (mit bzw. ohne TRPV6), während sie sich in Ca²⁺-freier Lösung befinden, einen gleichen Basiswert. Das gleiche Ergebnis erhielten Bödding und Mitarbeiter nachdem Ca²⁺ aus der zuvor Ca²⁺-haltigen Lösung durch Pufferung entfernt wurde (Bodding and Flockerzi, 2004).

Die Ca²⁺-Abhängigkeit der maximalen intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von der extrazellulären Ca²⁺-Applikation wurde in dieser Arbeit in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass hTRPV6_{long} (EC₅₀ = 1,68 mM; Hill-Koeffizient = 0,73) und hTRPV6_{short} (EC₅₀ = 1,81 mM; Hill-Koeffizient = 0,74) eine beinahe identische Ca²⁺-Abhängigkeit besitzen. Ein ähnliches Experiment wurde mit dem TRPV6-Kanal der Ratte (rTRPV6) durchgeführt (Saotome et al., 2016). Aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung von TRPV6 zwischen den beiden Spezies und einem beinahe identischen Bindungsverhalten gegenüber Calmodulin (CaM) kann ein Vergleich der Ca²⁺-Abhängigkeit stattfinden (siehe www.uniprot.org; (Singh et al., 2018a)). Hierbei konnte gezeigt werden, dass rTRPV6 eine zum humanen TRPV6-Kanal vergleichbare Ca²⁺-Abhängigkeit (EC₅₀ = 1,47 mM) besitzt (Saotome et al., 2016). In Hinblick darauf, dass die Ca²⁺-abhängige Hemmung von TRPV6 auf eine Interaktion von Ca²⁺ mit CaM beruht, wurde von Bate et al. ein „two tail“-Modell der CaM-abhängigen TRPV6-Inhibition entworfen. Als Grundlage besteht dabei die Annahme, dass ein hTRPV6-Tetramer mit einem aus zwei Lappen bestehenden CaM-Molekül interagiert (Singh et al., 2018a). Beim „two tail“-Modell wird angenommen, dass CaM bei physiologischen intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen (50-100 nmol/l) Ca²⁺ am C-Lappen bindet und über diesen durchgängig an TRPV6 gebunden ist. Erst bei Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt es zur zusätzlichen Bindung von Ca²⁺ an den C-Lappen des Calmodulins, welche über Interaktion mit TRPV6 dessen Inhibition bewirkt (Bate et al., 2018). Dabei ist die Bindung von Ca²⁺ an die EF-Hand-Motive 3 und 4 des CaM-C-Lappens, welche erst bei „hohen“ intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen Ca²⁺-affin sind, essentiell für die CaM-bedingte TRPV6-Inhibition (Lambers et al., 2004). Eine ausreichende intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration konnte durch Applikation von 10 mM Ca²⁺ extrazellulär bewirkt werden (Lambers et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit (EC₅₀ = 1,68 mM bzw. 1,81 mM) und von Saotome et al. (EC₅₀ = 1,47 mM) stimmen mit der Annahme von Lambers et al., dass zur Aktivierung und Bindung des CaM-C-Lappens die extrazelluläre Applikation von Ca²⁺ im niedrigen mM-Bereich benötigt wird überein. Währenddessen zeigen andere Messungen mit hTRPV6, dass bereits geringere extrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen zu einem Maximum des TRPV6-abhängigen intrazellulären Ca²⁺-Signals führen (EC₅₀ = 162 ± 12 µM) (Yelshanskaya et al., 2021). Da das maximale intrazelluläre Ca²⁺-Signal durch die Ca²⁺/CaM-abhängige Inhibition von TRPV6 bedingt ist, kann daraus geschlossen

werden, dass extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen im höheren μM -Bereich zu einer Bindung an den CaM-C-Lappen führen.

Das in der Plasmamembran von Zellen vorkommende Phospholipid PIP_2 bewirkt die Verschmelzung von hTRPV6-enthaltenden Vesikeln mit der Zellmembran (Sopjani et al., 2010). Des Weiteren besitzt es einen direkten Effekt auf hTRPV6, indem es zu einer Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals führt (Thyagarajan et al., 2008). Gleichzeitig bewirkt das, durch TRPV6 in das Zellinnere strömende, Ca^{2+} eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) spaltet. Dieser Mechanismus stellt eine weitere Einflussgröße in der Inaktivierung von TRPV6 dar. In Hinblick auf die Interaktionsstellen von PIP_2 mit hTRPV6, befinden sich diese nicht in den C-terminalen ersten 120 Basenpaaren (Cai et al., 2020), sodass der Einfluss von PIP_2 auf die beide TRPV6-Varianten (hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short}) gleich ist.

Der intrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom bei Applikation von extrazellulärem Ca^{2+} ist unter anderem von der Phosphorylierung von N-terminalen Tyrosinresten (Aminosäuren 19 – 191 bei rTRPV6) abhängig und kann durch Verwendung von Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren gesteigert oder durch Zugabe eines Tyrosin-Kinase-Inhibitors gesenkt werden (Sternfeld et al., 2007; Sternfeld et al., 2005). Diese Effekte spielen durch die physiologische Expression der Tyrosin-Kinasen in HEK 293 Zellen auch in diesen Experimenten eine mögliche Rolle (Sternfeld et al., 2007). Des Weiteren wurde in den Experimenten von Sternfeld et al. die kurze Version von rTRPV6 (727 Aminosäuren) benutzt, weshalb die ausschlaggebenden N-terminal gelegenen Tyrosin-Reste bei beiden Kanalvarianten (hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short}) vorhanden sind. Eine eventuell relevante Beeinflussung über die Tyrosinkinase würde sich somit gleichermaßen auf beide TRPV6-Varianten auswirken.

In den Ergebnissen dieser Arbeit fiel neben einer Abhängigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von der hinzugegebenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zudem eine rasche, auf den maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationshöhepunkt folgende, Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf, welche vermutlich durch eine Ca^{2+} -abhängige Inhibition von TRPV6 bewirkt wird. Es ist bereits bekannt, dass Ca^{2+} sowohl selbst, als auch durch Bindung an CaM, zu einer Inaktivierung von rTRPV6 führt (Derler et al., 2006). Hierbei kann zwischen einem schnellen Effekt durch Ca^{2+} und einem langsamen Effekt durch $\text{Ca}^{2+} + \text{CaM}$ unterschieden werden (Niemeyer et al., 2001). Während dies bei den Patch-Clamp-Messungen von Niemeyer et al., 2001 und Cao et al., 2013 getrennt dargestellt werden konnte, ist eine Aufteilung dieser Effekte bei dem hier verwendeten Calcium Imaging mithilfe von Fura-2 nicht möglich, sodass die dargestellten Inaktivierungen von TRPV6 durch eine Kombination beider Effekte zustande kommen (Cao et al., 2013; Niemeyer et al., 2001). Nach erfolgter Inhibition von TRPV6 kam es zu einer Abnahme des intrazellulären Fura-2-Signales, welches sich im Vergleich zu den Fura-2-Signalen der Kontrollzellen jedoch noch immer auf einem höheren Niveau darstellte. Vergleichbar ist auch dies mit der Arbeit von (Bodding and Flockerzi, 2004) in der hTRPV6-exprimierende Zellen und die entsprechenden Kontrollzellen ohne TRPV6 in einer Ca^{2+} -haltigen

Lösung inkubiert wurden. Auch nach 400 Sekunden in 2 mM Ca^{2+} -haltiger Lösung besitzen die TRPV6-exprimierenden Zellen eine höhere Fura-2-Ratio als die Kontrollzellen. Dabei kann vermutet werden, dass nach dieser Zeit das Maximum der TRPV6-Inaktivierung bereits erfolgt ist, jedoch keine komplette Hemmung des Ionenkanals zustande kommt, weshalb weiterhin Ca^{2+} (in geringerem Maße) in die Zellen einströmen kann und hierdurch eine höhere Plateauphase, verglichen zu den Kontrollzellen, erreicht wird. Einen weiteren Einflussfaktor auf TRPV6 stellt die Protein Kinase C (PKC) dar, welche durch Phosphorylierung von CaM-Bindestellen in TRPV6 die inhibierende Wirkung von $\text{Ca}^{2+} + \text{CaM}$ verhindert (Niemeyer et al., 2001).

Die Rolle, die TRPV6 in einer Reihe von Pathologien im menschlichen Körper spielt, führt dazu, dass eine Beeinflussung seiner Aktivität möglicherweise einen interessanten Therapieansatz darstellen könnte. In Folge dessen wurden in dieser Arbeit Modulatoren von CaM und der PKC, in Bezug auf eine Veränderung des TRPV6-abhängigen intrazellulären Fura-2-Signals nach extrazellulärer Ca^{2+} -Zugabe, untersucht. Dabei wurden die als CaM-Inhibitoren bekannten Substanzen Calmidazolium (Gietzen, 1983), Ophiobolin A (Leung et al., 1984) und Trifluoperazin (Kenigsberg et al., 1982) verwendet. In dieser Arbeit wurde eine dosisabhängige Inhibition des Fura-2-Signales durch Trifluoperazin mit einer IC_{50} von 49,59 μM festgestellt, während Calmidazolium und Ophiobolin A keinen inhibitorischen Effekt erbrachten. Im Kontrast hierzu konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass Calmidazolium den Kanal TRPC4, welcher durch CaM inaktiviert wird, aktiviert (Tang et al., 2001). Hierbei wurde eine Calmidazolium-Konzentration von 10 μM verwendet, welche mit dem hier verwendeten Konzentrationsbereich übereinstimmt. Ein Unterschied besteht darin, dass Tang et al., 2001 „inside-out“-Patchclamp-Experimente durchgeführt haben bei denen sich Calmidazolium in der intrazellulären Lösung befand, während er sich beim Calcium Imaging in der extrazellulären Lösung befindet und über die Zellmembran in die Zelle diffundieren muss. Eine möglicherweise fehlende bzw. erschwerte Diffusion des Modulators über die Zellmembran könnte somit eine Erklärung sein. Dennoch führten vergleichbare, extrazellulär applizierte Konzentrationen von Ophiobolin A (50 μM) bei TRPV6-exprimiert in HEK Zellen bei extrazellulärer Applikation zu einer Inhibition von CaM und somit zu einer Abwendung einer CaM-abhängigen Inhibition des Kanals (Amini et al., 2021). Während Trifluoperazin den erwarteten Effekt besaß, fiel zusätzlich auf, dass bei den TRPV6-enthaltenden Zellen und den Kontrollzellen ein von der Ca^{2+} -Applikation unabhängiger Anstieg des Fura-2-Signals bei 100 μM und 300 μM auftrat. Trifluoperazin bindet an CaM in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 2:1, 3:1, 4:1) und senkt die Affinität von CaM zu Ca^{2+} , wobei das Verhältnis von Trifluoperazin zu CaM von 8:1 eine Affinitätssteigerung bewirkt (Feldkamp et al., 2010). Da der Ratioanstieg schon vor der Ca^{2+} -Zugabe feststellbar war und eine Beeinflussung durch eine Eigenfluoreszenz von Trifluoperazin ausgeschlossen wurde, kann nur vermutet werden, dass entweder eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Organellen stattfindet oder ein anderer unbekannter Mechanismus ursächlich ist.

Die Modulierbarkeit von TRPV6 durch die PKC geschieht, indem die PKC eine Phosphorylierung an der CaM-Bindestelle von TRPV6 vornimmt und somit, die Inhibition von Ca^{2+} + CaM verhindert. Dies wurde beispielsweise dadurch bewiesen, dass eine Mutation der Phosphorylierungsstelle der PKC an TRPV6 zu einer stärkeren Inhibition des Ionenkanals führt (Niemeyer et al., 2001). Bekannte PKC-Modulatoren, welche in dieser Arbeit benutzt wurden, sind Phorbol-Ester, wie z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Castagna et al., 1982), Gö6983 (Gschwendt et al., 1996) und Chelerythrin (Herbert et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass der PKC-Inhibitor Chelerythrin das Ca^{2+} -abhängige Fura-2-Signal von hTRPV6_{long} dosisabhängig mit einer IC_{50} von $4,3 \mu\text{M}$ inhibiert. Die Größenordnung der dabei verwendeten Konzentrationen stimmt dabei mit der von Herbert et al., 1990 ermittelten IC_{50} ($0,7 \mu\text{M}$), welcher in einem „mixed micellar“ Test die inhibitorische Wirkung von Chelerythrin auf $0,5 \mu\text{g}$ Proteinmenge, aus Rattengehirn isolierter, PKC ermittelte, überein. Anderen Arbeiten zeigten, dass in C2C12 Maus-Myoblasten eine Gö6983-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ über die Hemmung der PKC zu einer verringerten Phosphorylierung des „cAMP response element-binding“ Proteins führt (Obi et al., 2017) und PMA bei TRPV4-exprimierenden Zellen, die sich in 1 mM Ca^{2+} -Lösung befanden, einen Anstieg der Fura-2-Ratio ($\text{EC}_{50} = 11,7 \text{ nM}$) verursachte (Xu et al., 2003). Die effektive PKC-Hemmung von Gö6983 konnte zudem in IEC-6-Zellen („Intestinal Epithelioid Cell line 6“) aus der Ratte bestätigt werden (Liu et al., 2018). Hierbei sorgten $20 \mu\text{M}$ Gö6983 zu einer kompletten Hemmung des intrazellulären Calcium-Anstiegs, welcher ohne PKC-Inhibition durch die Applikation von „parathyroid hormone-related peptide“ (1-40) und darauffolgenden Expression von mehreren Proteinen, unter anderem TRPV6, eintritt. Die Wirksamkeit von PMA auf den TRPV6-Kanal konnte in mit hTRPV6 transfizierten MCF-7-Zellen, bei denen die Applikation von 200 nM PMA zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen führt, dargestellt werden (Bolanz et al., 2009). Die PMA-bedingte PKC-Aktivierung konnte dabei sogar die Tamoxifen-abhängige Inhibition von TRPV6 verhindern. Im Gegensatz zu der dargestellten Effektivität der PKC-Modulatoren Gö6983 und PMA, konnte, trotz der Verwendung eines übereinstimmenden Spektrums an Substanz-Konzentrationen, in dieser Arbeit weder bei dem PKC-Inhibitor Gö6983, noch bei dem PKC-Aktivator PMA eine Veränderung im Fura-2-Signal ermittelt werden. Analog zur Mutation der von Niemeyer et al. beschriebenen PKC-Phosphorylierungsstelle (Aminosäuren 699 – 702 bei hTRPV6_{short}) führte die Mutation eines Threoninrestes (Threonin/Alanin 702) jedoch zu keinem veränderten Effekt bei PMA-Applikation. Die Mutation eines sich davor befindlichen Threoninrestes (Threonin/Alanin 688) hingegen annulliert über die fehlende Phosphorylierungsstelle für die PKC den PMA-Effekt, welcher der Wirkung von Adenosintriphosphat (ATP), eine Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms in die Zellen zu verhindern, entgegenwirkt (Al-Ansary et al., 2010; Niemeyer et al., 2001). Des Weiteren gilt zu beachten, dass PMA ($500 \mu\text{M}$) über eine Aktivierung der PKC β_{II} zu einer Inhibition des ATP-Effektes führt (Al-Ansary et al., 2010). Auch wenn in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine zusätzliche ATP-Applikation stattfand, befindet sich ATP, als universeller Energieträger, unter physiologischen Bedingungen in Zellen. Die Benutzung von PMA als PKC-Aktivator könnte somit über eine verstärkte Phosphorylierung, zum einen den Ca^{2+} -Einstrom-

hemmenden Effekt von ATP, als auch zum anderen den Ca^{2+} -Einstrom-verstärkenden Effekt durch Phosphorylierung einer CaM-Bindestelle (Aminosäuren 691 – 711 = CaM-Bindestelle bei hTRPV6_{short}), begünstigen. Ob die physiologischen ATP-Konzentrationen jedoch eine relevante Beeinflussung der TRPV6-Funktion bewirken können und ob sich die Wirksamkeit von PMA gegenüber den PKC-Isoformen unterscheidet, bleibt fraglich.

Eine weitere Substanz, welche aus Experimenten im hiesigen Institut bereits als Inhibitor von TRPV6 verwendet wurde, ist Hexylresorcinol. In den, in dieser Arbeit mit Hexylresorcinol durchgeführten Fura-2-Messungen war ersichtlich, dass hTRPV6_{long}-exprimierende HEK-Zellen keine dosisabhängige Inhibition des Ca^{2+} -Signales aufweisen. Erst bei einer Substanz-Konzentration von 100 μM trat eine leichte Verringerung des TRPV6-abhängigen Ca^{2+} -Signals auf. In Anbetracht dessen, dass Hexylresorcinol durch die Zellmembran diffundiert und von intrazellulär wirkt (Osterhout, 1940), kann eine zu geringe Präinkubationszeit mit Hexylresorcinol in Erwägung gezogen werden. Zudem ist Hexylresorcinol dafür bekannt, dass es bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (ca. 50 μM) die spontane Calcium-Oszillation in SCC-9-Zellen („squamous cell carcinoma 9“) und Fibroblasten hemmt (Kim and Choi, 2013). In HEK Zellen sind Calcium-Oszillationen jedoch nur durch Applikation von Substanzen (Bird and Putney, 2005; Luo et al., 2001) oder bei Überexpression des „Calcium sensing receptor“ (CaR) beschrieben (Szekely et al., 2009) und können zudem mit dem Messverfahren als „bulk“ in der Küvette nicht aufgelöst werden. Trotz alledem konnte in Patch-Clamp-Experimenten und Calcium Imaging-Experimenten aus dem saarländischen Institut für Pharmakologie gezeigt werden, dass Hexylresorcinol mit einer IC_{50} von 13 μM bzw. 32 μM eine Inhibition von TRPV6 bewirkt, sodass obige Überlegung widerlegt wäre. Die bei 100 μM und 300 μM Hexylresorcinol bemerkte Fura-2-Signalsteigerung tritt neben den TRPV6-exprimierenden Zellen auch bei den Kontrollzellen ohne TRPV6 auf, weshalb Hexylresorcinol scheinbar einen weiteren TRPV6-unspezifischen Effekt auf HEK-Zellen besitzt. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass in SCC-9-Zellen, ohne TRPV6-Expression, nach 10-minütiger Inkubation von 10 $\mu\text{g HR / ml}$ (ca. 50 $\mu\text{M HR}$) auch ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration festgestellt wurde (Kim and Choi, 2013).

7.4 hTRPV6 vs. myotisTRPV6

Neben den in dieser Arbeit untersuchten menschlichen Varianten von TRPV6 wurde auch das TRPV6-Protein der Fledermaus „Myotis brandtii“, welche in zwei unterschiedlichen Zellklonen vorlag, untersucht. Während die beiden Spezies-spezifischen TRPV6-Varianten sich im Basiswert, der anfänglichen Permeabilität für Ca^{2+} und sogar in der Aufnahme-Kinetik für Ca^{2+} kaum unterschieden, fiel auf, dass TRPV6_{Myotis}, im Vergleich zu hTRPV6_{long} und hTRPV6_{short}, keine Ca^{2+} -abhängige Inhibition aufweist und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Ca^{2+} -Applikation nahezu konstant bleibt. Eine mögliche Erklärung dieses Unterschiedes könnte in der physiologischen Funktion von TRPV6, als Akteur der Ca^{2+} -Absorption im Darm, und der sich vom Menschen unterscheidenden Lebensweise von Myotis brandtii liegen. Die Fledermaus „Myotis brandtii“ ist eine Insekten-fressende

Fledermausart (Meschede and Heller, 2000) und ernährt sich demnach Ca^{2+} -arm (Booher and Hood, 2010). Dennoch besitzen sowohl Fledermäuse, als auch der Menschen, eine Ca^{2+} -Konzentration von ungefähr 2,5 mM im Plasma (Pape et al., 2018; Pikula et al., 2017). Damit trotz der Ca^{2+} -armen Nahrung diese Plasmakonzentration aufrechterhalten werden kann, könnte der grundlegende Mechanismus die fehlende Inaktivierung von TRPV6 im Darm sein, welche eine hohe Absorption der im Darm ankommenden Ca^{2+} -Menge bewirken könnte und damit eine Anpassung der Funktion des Ionenkanals an die Lebensweise beschreiben würde. Ein weiterer Mechanismus könnte dabei zudem die erhöhte physiologische Expression von TRPV6_{Myotis} im Vergleich zu hTRPV6 sein. Die Expression von hTRPV6 ist zur Prävention der Ca^{2+} -bedingten Zelltoxizität durch das am Anfang der hTRPV6-Sequenz stehenden ACG-Codons und der darauf folgenden GC-reichen Sequenz, welche eine Haarnadel-Struktur formt und somit die ribosomale Ablesegeschwindigkeit verlangsamt, verringert (Wolske et al., 2020). Unterstützt werden diese beiden Annahmen dadurch, dass in den Ausscheidungen der großen braunen Fledermaus bei einer physiologischen Ca^{2+} -armen Ernährung kaum Ca^{2+} zu finden ist und dies auf eine sehr effiziente Resorption schließen lässt (Keeler and Studier, 1992).

8 Literaturverzeichnis

- Akbulut Y, Gaunt HJ, Muraki K, Ludlow MJ, Amer MS, Bruns A, Vasudev NS, Radtke L, Willot M, Hahn S, Seitz T, Ziegler S, Christmann M, Beech DJ and Waldmann H (2015) (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**:3787-3791.
- Al-Ansary D, Bogeski I, Disteldorf BM, Becherer U and Niemeyer BA (2010) ATP modulates Ca²⁺ uptake by TRPV6 and is counteracted by isoform-specific phosphorylation. *FASEB J* **24**:425-435.
- Amini M, Chang Y, Wissenbach U, Flockerzi V, Schlenstedt G and Beck A (2021) Activity of the yeast vacuolar TRP channel TRPY1 is inhibited by Ca(2+)-calmodulin binding. *J Biol Chem* **297**:101126.
- Bate N, Caves RE, Skinner SP, Goult BT, Basran J, Mitcheson JS and Vuister GW (2018) A Novel Mechanism for Calmodulin-Dependent Inactivation of Transient Receptor Potential Vanilloid 6. *Biochemistry* **57**:2611-2622.
- Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, Suzuki Y, Crescenzi A, Kos CH, Zhuang L, Freeman MR, Gouveia CH, Wu J, Luo H, Mauro T, Brown EM and Hediger MA (2007) Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J Bone Miner Res* **22**:274-285.
- Bird GS and Putney JW, Jr. (2005) Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol* **562**:697-706.
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S and Caterina MJ (2002) Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* **5**:856-860.
- Blumberg PM (1988) Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* **48**:1-8.
- Bodding M and Flockerzi V (2004) Ca²⁺ dependence of the Ca²⁺-selective TRPV6 channel. *J Biol Chem* **279**:36546-36552.
- Bolanz KA, Hediger MA and Landowski CP (2008) The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* **7**:271-279.
- Bolanz KA, Kovacs GG, Landowski CP and Hediger MA (2009) Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **7**:2000-2010.
- Booher CM and Hood WR (2010) Calcium utilization during reproduction in big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Journal of Mammalogy* **91**:952-959.
- Bowen CV, DeBay D, Ewart HS, Gallant P, Gormley S, Ilenchuk TT, Iqbal U, Lutes T, Martina M, Mealing G, Merkley N, Sperker S, Moreno MJ, Rice C, Syvitski RT and Stewart JM (2013) In vivo detection of human TRPV6-rich tumors with anti-cancer peptides derived from soricidin. *PLoS One* **8**:e58866.
- Burren CP, Caswell R, Castle B, Welch CR, Hilliard TN, Smithson SF and Ellard S (2018) TRPV6 compound heterozygous variants result in impaired placental calcium transport and severe undermineralization and dysplasia of the fetal skeleton. *Am J Med Genet A* **176**:1950-1955.
- Cai R, Liu X, Zhang R, Hofmann L, Zheng W, Amin MR, Wang L, Hu Q, Peng JB, Michalak M, Flockerzi V, Ali DW, Chen XZ and Tang J (2020) Autoinhibition of TRPV6 Channel and Regulation by PIP2. *iScience* **23**:101444.
- Cao C, Zakharian E, Borbiri I and Rohacs T (2013) Interplay between calmodulin and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ca²⁺-induced inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 channels. *J Biol Chem* **288**:5278-5290.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U and Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**:7847-7851.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ and Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**:436-441.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824.

- Chao YH, Tsuang YH, Sun JS, Sun MG and Chen MH (2012) Centrifugal force induces human ligamentum flavum fibroblasts inflammation through activation of JNK and p38 pathways. *Connect Tissue Res* **53**:422-429.
- Cunha MR, Bhardwaj R, Carrel AL, Lindinger S, Romanin C, Parise-Filho R, Hediger MA and Reymond JL (2020) Natural product inspired optimization of a selective TRPV6 calcium channel inhibitor. *RSC Med Chem* **11**:1032-1040.
- Derler I, Hofbauer M, Kahr H, Fritsch R, Muik M, Kepplinger K, Hack ME, Moritz S, Schindl R, Groschner K and Romanin C (2006) Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation. *J Physiol* **577**:31-44.
- Fan HC, Zhang X and McNaughton PA (2009) Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem* **284**:27884-27891.
- Fecher-Trost C, Wissenbach U, Beck A, Schalkowsky P, Stoerger C, Doerr J, Dembek A, Simon-Thomas M, Weber A, Wollenberg P, Ruppert T, Middendorff R, Maurer HH and Flockerzi V (2013) The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG. *J Biol Chem* **288**:16629-16644.
- Fecher-Trost C, Wolske K, Wesely C, Lohr H, Klawitter DS, Weissgerber P, Gradhand E, Burren CP, Mason AE, Winter M and Wissenbach U (2021) Mutations That Affect the Surface Expression of TRPV6 Are Associated with the Upregulation of Serine Proteases in the Placenta of an Infant. *Int J Mol Sci* **22**.
- Feldkamp MD, O'Donnell SE, Yu L and Shea MA (2010) Allosteric effects of the antipsychotic drug trifluoperazine on the energetics of calcium binding by calmodulin. *Proteins* **78**:2265-2282.
- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V and Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**:7858-7861.
- Fu S, Hirte H, Welch S, Ilenchuk TT, Lutes T, Rice C, Fields N, Nemet A, Dugourd D, Piha-Paul S, Subbiah V, Liu L, Gong J, Hong D and Stewart JM (2017) First-in-human phase I study of SOR-C13, a TRPV6 calcium channel inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **35**:324-333.
- Gietzen K (1983) Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium. *Biochem J* **216**:611-616.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440-3450.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ and Johannes FJ (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* **392**:77-80.
- Hache S, Takser L, LeBellego F, Weiler H, Leduc L, Forest JC, Giguere Y, Masse A, Barbeau B and Lafond J (2011) Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta. *J Cell Mol Med* **15**:654-667.
- Haverstick DM, Heady TN, Macdonald TL and Gray LS (2000) Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry. *Cancer Res* **60**:1002-1008.
- Held P (2006) Detection of Calcium Concentration Changes Using the FLx800™ Fluorescence Microplate Reader.
- Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G and Schaefer M (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* **118**:917-928.
- Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schafer M, Schultz G and Schaefer M (2004) TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* **279**:34553-34561.
- Henning H, Ngo TT and Waberski D (2015) Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. *Andrology* **3**:834-842.
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J and Maffrand JP (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **172**:993-999.
- Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bodding M, Nastainczyk W, Wissenbach U, Flockerzi V and Freichel M (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **33**:509-518.

- Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ and Nilius B (2001) Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* **537**:747-761.
- Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B and Bindels RJ (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* **22**:776-785.
- Homolya L, Hollo Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM and Sarkadi B (1993) Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **268**:21493-21496.
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD and Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* **279**:35741-35748.
- Hughes TET, Pumroy RA, Yazici AT, Kasimova MA, Fluck EC, Huynh KW, Samanta A, Molugu SK, Zhou ZH, Carnevale V, Rohacs T and Moiseenkova-Bell VY (2018) Structural insights on TRPV5 gating by endogenous modulators. *Nat Commun* **9**:4198.
- Iida T, Moriyama T, Kobata K, Morita A, Murayama N, Hashizume S, Fushiki T, Yazawa S, Watanabe T and Tominaga M (2003) TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology* **44**:958-967.
- Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y and Ito Y (2009) Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res* **104**:1399-1409.
- Invitrogen (Stand 28.01.2023) pFRT/lacZeo: Flp recombination target site vector designed for use with the Flp-In System.
- Janssens A, Silvestri C, Martella A, Vanoevelen JM, Di Marzo V and Voets T (2018) Delta(9)-tetrahydrocannabinol impairs epithelial calcium transport through inhibition of TRPV5 and TRPV6. *Pharmacol Res* **136**:83-89.
- Keeler JO and Studier EH (1992) Nutrition in Pregnant Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*) Feeding on June Beetles. *Journal of Mammalogy* **73**:426-430.
- Kenigsberg RL, Cote A and Trifaro JM (1982) Trifluoperazine, a calmodulin inhibitor, blocks secretion in cultured chromaffin cells at a step distal from calcium entry. *Neuroscience* **7**:2277-2286.
- Kim HJ, Yang DK and So I (2007) PDZ domain-containing protein as a physiological modulator of TRPV6. *Biochem Biophys Res Commun* **361**:433-438.
- Kim SG and Choi JY (2013) 4-hexylresorcinol exerts antitumor effects via suppression of calcium oscillation and its antitumor effects are inhibited by calcium channel blockers. *Oncol Rep* **29**:1835-1840.
- Kovacs G, Montalbetti N, Simonin A, Danko T, Balazs B, Zsembery A and Hediger MA (2012) Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell Calcium* **52**:468-480.
- Kowase T, Nakazato Y, Yoko OH, Morikawa A and Kojima I (2002) Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr J* **49**:349-355.
- Lambers TT, Weidema AF, Nilius B, Hoenderop JG and Bindels RJ (2004) Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor calmodulin. *J Biol Chem* **279**:28855-28861.
- Landowski CP, Bolanz KA, Suzuki Y and Hediger MA (2011) Chemical inhibitors of the calcium entry channel TRPV6. *Pharm Res* **28**:322-330.
- Leung PC, Taylor WA, Wang JH and Tipton CL (1984) Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J Biol Chem* **259**:2742-2747.
- Leverett LB, Hellums JD, Alfrey CP and Lynch EC (1972) Red blood cell damage by shear stress. *Biophys J* **12**:257-273.
- Li H (2017) TRP Channel Classification. *Adv Exp Med Biol* **976**:1-8.
- Li SH, Yin HB, Ren MR, Wu MJ, Huang XL, Li JJ, Luan YP and Wu YL (2019) TRPV5 and TRPV6 are expressed in placenta and bone tissues during pregnancy in mice. *Biotech Histochem* **94**:244-251.

- Liu B, Hui K and Qin F (2003) Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys J* **85**:2988-3006.
- Liu C, Shao G, Lu Y, Xue M, Liang F, Zhang Z and Bai L (2018) Parathyroid Hormone-Related Protein (1-40) Enhances Calcium Uptake in Rat Enterocytes Through PTHR1 Receptor and Protein Kinase Calpha/beta Signaling. *Cell Physiol Biochem* **51**:1695-1709.
- LO-Laboroptik (Stand 28.01.2023) Zählkammer Neubauer - Improved.
- Luo D, Broad LM, Bird GS and Putney JW, Jr. (2001) Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in HEK293 cells. *J Biol Chem* **276**:5613-5621.
- Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H and Gruenert DC (2010) Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* **10**:9.
- McGoldrick LL, Singh AK, Saotome K, Yelshanskaya MV, Twomey EC, Grassucci RA and Sobolevsky AI (2018) Opening of the human epithelial calcium channel TRPV6. *Nature* **553**:233-237.
- Meschede A and Heller K-G (2000) *Ökologie und Schutz von Fledermäusen in Wäldern unter besonderer Berücksichtigung wandernder Arten*, Bundesamt für Umweltschutz.
- Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian JB, Stevens A, Wu M, Xu J, Long S, Yang P, Zholos AV, Salovich JM, Weaver CD, Hopkins CR, Lindsley CW, McManus O, Li M and Zhu MX (2011) Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *J Biol Chem* **286**:33436-33446.
- MSG-Praxisbedarf (Stand 28.01.2023) Zählkammer nach Neubauer improved.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M and Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* **93**:829-838.
- Nedungadi TP, Dutta M, Bathina CS, Caterina MJ and Cunningham JT (2012) Expression and distribution of TRPV2 in rat brain. *Exp Neurol* **237**:223-237.
- Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V and Trost C (2001) Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca^{2+} entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3600-3605.
- Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R and Voets T (2006) The Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J* **25**:467-478.
- Nilius B and Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* **12**:218.
- Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, Voets T and Zhu MX (2005) Regulation of the Ca^{2+} sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **280**:6423-6433.
- Nordin BE (1990) Calcium homeostasis. *Clin Biochem* **23**:3-10.
- Numata T, Shimizu T and Okada Y (2007) TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**:C460-467.
- Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Kikuchi H, Oguri G, Takahashi M, Nakamura F, Yamasoba T, Sakuma M, Toyoda S, Tei C and Inoue T (2017) Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways. *J Appl Physiol (1985)* **122**:683-694.
- Osterhout WJ (1940) Effects of Guaiacol and Hexylresorcinol in the Presence of Barium and Calcium. *J Gen Physiol* **23**:749-751.
- Pape HC, Kurtz A and Silberagl S (2018) *Physiologie*, Thieme.
- Patel A, Hirst RA, Harrison C, Hirota K and Lambert DG (2013) Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using Fura-2. *Methods Mol Biol* **937**:37-47.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**:2046-2049.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM and Hediger MA (2000) Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* **278**:326-332.

- Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M and Flockerzi V (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* **15**:6166-6171.
- Pikula J, Bandouchova H, Kovacova V, Linhart P, Piatek V and Zukal J (2017) Reproduction of Rescued Vespertilionid Bats (*Nyctalus noctula*) in Captivity: Veterinary and Physiologic Aspects. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* **20**:665-677.
- Prakriya M and Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* **95**:1383-1436.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R and Deutzmann R (2016) *Biochemie*, Thieme.
- Roe MW, Lemasters JJ and Herman B (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* **11**:63-73.
- Sahin-Toth M (2020) Channelopathy of the Pancreas Causes Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* **158**:1538-1540.
- Sakipov S, Sobolevsky AI and Kurnikova MG (2018) Ion Permeation Mechanism in Epithelial Calcium Channel TRPV6. *Sci Rep* **8**:5715.
- Saotome K, Singh AK, Yelshanskaya MV and Sobolevsky AI (2016) Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature* **534**:506-511.
- Semtner M, Schaefer M, Pinkenburg O and Plant TD (2007) Potentiation of TRPC5 by protons. *J Biol Chem* **282**:33868-33878.
- Shimizu T, Janssens A, Voets T and Nilius B (2009) Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume. *Pflugers Arch* **457**:795-807.
- Singh AK, McGoldrick LL, Twomey EC and Sobolevsky AI (2018a) Mechanism of calmodulin inactivation of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *Sci Adv* **4**:eaau6088.
- Singh AK, Saotome K, McGoldrick LL and Sobolevsky AI (2018b) Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB. *Nat Commun* **9**:2465.
- Singh AK, Saotome K and Sobolevsky AI (2017) Swapping of transmembrane domains in the epithelial calcium channel TRPV6. *Sci Rep* **7**:10669.
- Song H, Dong M, Zhou J, Sheng W, Li X and Gao W (2018) Expression and prognostic significance of TRPV6 in the development and progression of pancreatic cancer. *Oncol Rep* **39**:1432-1440.
- Sopjani M, Kunert A, Czarkowski K, Klaus F, Laufer J, Foller M and Lang F (2010) Regulation of the Ca(2+) channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J Membr Biol* **233**:35-41.
- Sternfeld L, Anderie I, Schmid A, Al-Shaldi H, Krause E, Magg T, Schreiner D, Hofer HW and Schulz I (2007) Identification of tyrosines in the putative regulatory site of the Ca²⁺ channel TRPV6. *Cell Calcium* **42**:91-102.
- Sternfeld L, Krause E, Schmid A, Anderie I, Latas A, Al-Shaldi H, Kohl A, Evers K, Hofer HW and Schulz I (2005) Tyrosine phosphatase PTP1B interacts with TRPV6 in vivo and plays a role in TRPV6-mediated calcium influx in HEK293 cells. *Cell Signal* **17**:951-960.
- Stevens FC (1983) Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol* **61**:906-910.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S and Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**:819-829.
- Suzuki Y, Chitayat D, Sawada H, Deardorff MA, McLaughlin HM, Begtrup A, Millar K, Harrington J, Chong K, Roifman M, Grand K, Tominaga M, Takada F, Shuster S, Obara M, Mutoh H, Kushima R and Nishimura G (2018) TRPV6 Variants Interfere with Maternal-Fetal Calcium Transport through the Placenta and Cause Transient Neonatal Hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet* **102**:1104-1114.
- Suzuki Y, Pasch A, Bonny O, Mohaupt MG, Hediger MA and Frey FJ (2008) Gain-of-function haplotype in the epithelial calcium channel TRPV6 is a risk factor for renal calcium stone formation. *Hum Mol Genet* **17**:1613-1618.
- Szekely D, Brennan SC, Mun HC, Conigrave AD and Kuchel PW (2009) Effectors of the frequency of calcium oscillations in HEK-293 cells: wavelet analysis and a computer model. *Eur Biophys J* **39**:149-165.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD and Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* **79**:1089-1125.

- Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L and Zhu MX (2001) Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* **276**:21303-21310.
- TEFLabs Fluorescent Ion Indicator Handbook.
- Thermo-Fisher-Scientific(1) (Stand 28.01.2023) Thermo Fisher Protocols (Flp-In System: For Generating Constitutive Expression Cell Lines).
- Thermo-Fisher-Scientific(2) (Stand 28.01.2023) Thermofisher Produktübersicht Flp-In™ T-REx™ Core Kit.
- Thyagarajan B, Lukacs V and Rohacs T (2008) Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. *J Biol Chem* **283**:14980-14987.
- Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**:527-528.
- Venkatachalam K, Zheng F and Gill DL (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* **278**:29031-29040.
- Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K and Nilius B (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* **3**:174-182.
- Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R and Nilius B (2001) CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem* **276**:47767-47770.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G and Nilius B (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**:47044-47051.
- Weber K, Erben RG, Rump A and Adamski J (2001) Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:1287-1294.
- Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Mannebach S, Wissenbach U, Vennekens R, Middendorff R, Flockerzi V and Freichel M (2012) Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca²⁺ absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. *J Biol Chem* **287**:17930-17941.
- Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Vennekens R, Wissenbach U, Middendorff R, Flockerzi V and Freichel M (2011) Male fertility depends on Ca(2)+ absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Sci Signal* **4**:ra27.
- Wissenbach U, Bodding M, Freichel M and Flockerzi V (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* **485**:127-134.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H and Flockerzi V (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* **276**:19461-19468.
- Wolske K, Fecher-Trost C, Wesely C, Lohr H, Philipp S, Belkacemi A, Pacheco G and Wissenbach U (2020) Why endogenous TRPV6 currents are not detectable-what can we learn from bats? *Cell Calcium* **92**:102302.
- Xu F, Satoh E and Iijima T (2003) Protein kinase C-mediated Ca²⁺ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *Br J Pharmacol* **140**:413-421.
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R and Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**:181-186.
- Yelshanskaya MV, Nadezhdin KD, Kurnikova MG and Sobolevsky AI (2021) Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *J Physiol* **599**:2673-2697.
- Yue L, Peng JB, Hediger MA and Clapham DE (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**:705-709.
- Zakharian E, Cao C and Rohacs T (2011) Intracellular ATP supports TRPV6 activity via lipid kinases and the generation of PtdIns(4,5) P(2). *FASEB J* **25**:3915-3928.
- Zheng J, Zeng X and Wang S (2015) Calcium ion as cellular messenger. *Sci China Life Sci* **58**:1-5.
- Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA and Freeman MR (2002) Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* **82**:1755-1764.

Zimmer M and Hofmann F (1984) Calmodulin antagonists inhibit activity of myosin light-chain kinase independent of calmodulin. *Eur J Biochem* **142**:393-397.

9 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Veit Flockerzi für das Ermöglichen dieser Doktorarbeit und dem Bereitstellen des Themas bedanken.

Zusätzlich geht ein großes Lob an meinen Betreuer Dr. Andreas Beck, welcher mich in die Thematik eingearbeitet hat und mir sehr viele Stunden seiner Zeit für meine Fragen und das Korrekturlesen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Auch Dr. Ulrich Wissenbach gilt für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Bereitstellung Informationen mein Dank.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Ulrich Wissenbach und Christine Wesely für die Zurverfügungstellung von zusätzlichen Abbildungen, welche ich in meiner Arbeit verwenden durfte, bedanken.

Dankbar bin ich des Weiteren Heidi Löhr für das Einarbeiten und die Unterstützung bei der Zellkultivierung und Martin Simon-Thomas, der mir bei technischen Fragen geholfen hat.

Neben diesen expliziten Nennungen gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Pharmakologie, welche ich durch meine Forschungsarbeit treffen durfte. Sie waren zu mir freundlich und hilfsbereit und trugen somit zur Entstehung dieser Arbeit mit bei.

Zudem bin ich für meine „Pharmakologie-Bros“ dankbar, welche ich in dieser Zeit (besser) kennengelernt habe.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Hierbei möchte ich vor allem meinen Eltern (Manfred und Gabriele Schaffrath) und meiner Freundin (Antonia Rabe) danken. Sie standen mir bei der gesamten Arbeit mit Ratschlägen und seelischer Unterstützung zur Seite und waren immer für mich da.

10 Lebenslauf

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

