

Aus dem Bereich der Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Expression und Analyse von TRPV6 in humanen Trophoblastenzelllinien

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Daniel Stefan Klawitter

geb. am 24.01.1996 in Filderstadt

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich vor allem bei meiner Betreuerin Dr. Claudia Fecher-Trost, die mich während der gesamten Dauer meiner Arbeit begleitet hat. Ihre Anleitung, Geduld und Motivation waren unersetzlich und sie stand mir bei allen Fragen und Problemen jederzeit unterstützend zur Seite. Mein Dank geht auch an meinen Erstberichterstatter PD Dr. Ulrich Wissenbach. Ich bedanke mich für die Betreuung, die vielen hilfreichen Tipps, die Anleitung sowie intensiven konstruktiven Diskussionen. Mein Dank gilt auch Professor Dr. Veit Flockerzi für die Möglichkeit, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie die Unterstützung während des Prozesses. Dr. Andreas Beck stand mir mit hilfreichen Kommentaren und Diskussionen zur Seite. Dr. Manuel Winter danke ich für den motivierenden fachlichen und menschlichen Austausch, das Beibringen von Untersuchungsmethoden und die Unterstützung bei Durchführung und Interpretation von Untersuchungsergebnissen. Francis Glaser hat mich bei meinen Experimenten unterstützt und mir den Umgang im Labor und neue Techniken beigebracht. Ebenfalls möchte ich mich bei Heidi Löhr bedanken, die mir den Umgang mit Zellkulturen beibrachte. Nicole Erhardt zeigt mir verschiedene nützliche Aspekte der Laborarbeit. Christine Wesely, Martin Simon-Thomas, Ute Soltek und Claudia Ecker danke ich für die breitgefächerte fachliche und technische Unterstützung. Der TRPV6-Antagonist wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Michael Schäfer aus Leipzig zur Verfügung gestellt. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben, insbesondere gilt mein Dank dabei Elisabeth Kolb die mich immer unterstützend begleitete. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pharmakologie und bin dankbar für die gesammelten Erfahrungen.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	1
II.	Tabellenverzeichnis	4
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	5
1.	Zusammenfassung	6
1.1	Summary.....	8
2.	Einleitung.....	9
2.1	Plazenta.....	9
2.1.1	Entwicklung und Anatomie der menschlichen Plazenta.....	9
2.2	Funktion der Synzytiotrophoblasten in der humanen Plazenta	11
2.2.1	Überblick über die Funktion des Synzytiotrophoblasten beim Nährstofftransport	11
2.2.2	Endokrine Funktion des Synzytiotrophoblasten	12
2.2.3	Bewo- und Jeg3- Zelllinien als Modell für humane Trophoblasten	14
2.3	TRP Kanäle – ein Überblick	15
2.3.1	TRPV6 Kanäle.....	16
2.3.2	Zielsetzung der Arbeit	20
3.	Material und Methodik	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Zellkultur.....	21
3.1.2	Immunpräzipitation.....	22
3.1.3	Western-Blot.....	22
3.1.4	Immunzytochemie.....	24
3.1.5	Massenspektrometrie.....	25
3.1.6	Kalzium-Imaging	26
3.1.7	Antikörper.....	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Zellkultur und Transfektion	28
3.2.2	RIPA-Lysat Herstellung für die Immunpräzipitation	29

3.2.3	Proteinbestimmung	29
3.2.4	Immunpräzipitation.....	29
3.2.5	Western-Blot der Immunpräzipitation	30
3.2.6	Massenspektrometrie	30
3.2.7	Bewo Schnellfärbung	32
3.2.8	Immunzytochemie.....	33
3.2.9	Kalzium Imaging	34
4.	Ergebnisse.....	35
4.1	Nachweis von TRPV6 in Bewo und Jeg3-Zelllinien.....	35
4.2	Untersuchung des Einflusses von verminderten extrazellulärer Ca ²⁺ - Konzentrationen ([Ca ²⁺]) auf Bewo und Jeg3-Zelllinien	36
4.2.1	Effekt von [Ca ²⁺] auf Konfluenz und Morphologie.....	36
4.2.2	Analyse des Proteoms der Bewo- und Jeg3-Zelllinien in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration.....	38
4.3	Untersuchung des Effektes von TRPV6 und eines potenziellen TRPV6- Antagonisten in Bewo-Zellen.....	44
4.3.1	Nachweis des TRPV6-Kanals nach transienter Transfektion von TRPV6- Plasmiden in Bewo-Zelllinien	45
4.3.2	Untersuchung des TRPV6-Antagonisten BlockV6.....	46
4.3.3	Effekt von BlockV6 auf die endogene Ca-Konzentration in Bewo-Zellen.....	48
4.4	Untersuchung des Effektes von Forskolin auf Bewo- und Jeg3-Zellen.....	49
4.4.1	Biochemischer Nachweis der Synzytialisierung mittels hCG-Test.....	50
4.4.2	Lichtmikroskopischer Nachweis der Synzytialisierung.....	51
4.4.3	Nachweis des Zona-occludens-1 Protein in Bewo-Zellen.....	51
4.4.4	Ergebnis der Proteomanalyse Forskolin stimulierter Zellen	54
5.	Diskussion	65
5.1	Nachweis von TRPV6 in Bewo- und Jeg3-Zellen.....	65
5.2	Untersuchung des Einflusses von verminderter Ca ²⁺ -Konzentration auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien	65
5.2.1	Die Reduktion der Kalzium-Konzentration im Zellkulturmedium aktiviert verschiedene Zellsignalwege	66

5.2.2	Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Effektes einer verringerten Kalzium Konzentration auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien	74
5.2.3	Einordnung der aufgeführten Effekte durch Reduktion der Kalzium-Konzentration.....	75
5.3	Untersuchung des Effektes von TRPV6 und BlockV6 in Bewo-Zelllinien.....	76
5.3.1	Bewo-Zelllinien lassen sich mit TRPV6 transfizieren.....	76
5.3.2	Die Substanz BlockV6 hat einen hemmenden Effekt auf die TRPV6-Funktion	76
5.3.3	Es ist keine spezifische Blockierung von endogenem TRPV6-Ionenkanälen in der Bewo-Zelllinie durch BlockV6 feststellbar.....	77
5.4	Untersuchung des Effektes von Forskolin auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien.....	78
5.4.1	Bewo-Zellen zeigen eine Synzytialisierung.....	78
5.4.2	Analyse des Proteoms zeigt verschiedene Zellsignalwege in Bewo- und Jeg3-Zelllinien auf.....	78
5.5	Limitationen.....	83
6.	Ausblick	84
7.	Literaturverzeichnis	86
8.	Publikation	96
9	Lebenslauf	97

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Anatomie der Plazenta; Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Plazenta (Ulfig, 2019). 10

Abbildung 2 Plazentaschranke; eine schematische Darstellung einer Plazentazotte im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft: a) die frühe Plazentaschranke hat vier Schichten bestehend von maternal nach fetal aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, Basallamina des Trophoblasten, Zottenstruma, Basallamina des Endothels und dem Endothel der fetalen Kapillaren b) die reife Plazentaschranke (ab dem 4. Monat) ohne Zytotrophoblasten. Die Kapillaren liegen direkt unter den Synzytiotrophoblasten. Die Basallamina des Trophoblasten und des Endothels sind verschmolzen (Ulfig, 2019). 11

Abbildung 3 Dendrogramm der verschiedenen TRP-Kanäle. Die Farbakzentuierung beschreibt die Zugehörigkeit zu verschiedenen TRP-Unterfamilien. Abbildung modifiziert nach Nilius et al (2011). 15

Abbildung 4 Struktur und Domain-Organisation von TRPV6 A) Seitenansicht auf einen TRPV6-Komplex B) Sicht von oben auf einen TRPV6-Komplex C) Anordnung der Domains einer TRPV6-Untereinheit D) Seitenansicht einer TRPV6-Untereinheit; Bilder von Saotome et al. (2016), modifiziert nach Yelshanskaya et al. (2020). 18

Abbildung 5 Nachweis des TRPV6 Proteins in Bewo- und Jeg3-Zellen nach Immunpräzipitation und anschließender Western-Blot-Analyse. 1. a/b COS TRPV6vl 1:100 10µl 2. COS leer 10µl 3. IP 1 Bewo mit AK429 4. IP 2 Jeg3 mit AK429 5. IP 3 Bewo mit AK429 6. IP 4 Jeg3 mit AK429 Der Pfeil zeigt die zu TRPV6 zugehörige Bande an. Die Proteinkonzentrationen unterscheiden sich unter den Proben (3 IP Bewo mit 1,45mg Protein; 4 IP Jeg3 mit 2,88mg Protein) und sind somit nicht vergleichbar A) Antikörper 429, 1a/b zeigt die Positivkontrolle von TRPV6 bei unterschiedlicher Belichtungszeit B) Antikörper 20C6. ... 35

Abbildung 6 Nachweis von TRPV6 in Jeg3- und Bewo-Zellen mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Die gelb-markierten Bereiche beschreiben die detektierten Aminosäuresequenzen. Eine grüne Markierung der Aminosäuren beschreibt eine Detektion der Aminosäure im oxidierten Zustand. 36

Abbildung 7 Bewo-Zelllinie im Pappenheim-Staining; Veränderung der Morphologie und Konfluenz mit abnehmender Ca²⁺-Konzentration im Medium nach 48 Stunden. A) 0,65mM Ca²⁺ B) 0,45mM Ca²⁺ C) 0,35mM Ca²⁺ D) 0,25mM Ca²⁺ E) 0,15mM Ca²⁺ F) 0,1nM Ca²⁺; Maßstabsbalken entspricht 200µM; n=3 37

Abbildung 8 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellkulturen in niedrigen Kalzium-Bedingungen (0,32mM Ca²⁺) vs. normaler Kalzium-Konzentration (0,62mM Ca²⁺); A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK8, DK9, DK17, DK8 (2)) in normaler Kalzium-Konzentration (48 Stunden, n=4). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK20, DK27, DK25) in Medium mit verringerter Kalzium-Konzentration (48 Stunden, n=3). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von niedrig- vs. normal-Kalzium-Konzentration mittels T-Test bei Signifikanzniveau von p<0.05.....39

Abbildung 9 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3 Zellen in niedrigen Kalzium-Bedingungen(1,37mM Ca²⁺) vs. normaler Kalzium-Konzentration (1,97mM Ca²⁺); A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK13, DK14, DK15, DK24) in normaler Kalzium-Konzentration (48 Stunden, n=4). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK16, DK21, DK29, DK31) in Medium mit verringerter Kalzium-Konzentration (48 Stunden, n=4). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von niedrig- vs. normal-Kalzium-Konzentration mittels T-Test bei Signifikanzniveau von p<0.05.....40

Abbildung 10 Kalzium-Imaging von TRPV6-transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) und der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) sowie nicht transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grau) und der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (rot) B). TRPV6 ohne Inhibitor: Anzahl der Transfektionen T=4, Anzahl der Versuche N=9, Anzahl der Zellen n=396, TRPV6 + BlockV6: T=3, N=9, n=328, Bewo + BlockV6: T=3, N=14, n=768, Bewo ohne Inhibitor: T=3, N=10, n=59745

Abbildung 11 Kalzium-Imaging von TRPV6-transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) oder der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) B) Statistische Auswertung der Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt t0 (Start, dunkel-orange/rot), maximale Steigung zwischen t628 und t698 (f(max)-f(min), grün-dunkelgrün) sowie zwischen t120 und t360 (f120s-360s, blau-orange). TRPV6 ohne Inhibitor: Anzahl der Transfektionen T=4, Anzahl der Versuche N=9, Anzahl der Zellen n=396, TRPV6 + BlockV6: T=3, N=9, n=328.....46

Abbildung 12 Kalzium-Imaging von nicht transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) oder der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) B) Statistische Auswertung der Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt t0 (Start, dunkel-orange/rot), maximale Steigung zwischen t628 und t698 (f(max)-f(min), grün-dunkelgrün) sowie zwischen t120 und t360 (f120s-360s, blau orange). Bewo + BlockV6: Anzahl der Transfektionen T=3, Anzahl der Versuche N=14, Anzahl der Zellen n=768, Bewo ohne Inhibitor: T=3, N=10, n=59748

Abbildung 13 Nachweis des humanen Choriongonadotropin (hCG) im Überstand von Bewo- und Jeg3 Zellen, die mit Forskolin (30µM, 24 Stunden) stimuliert werden im Vergleich zu

unstimulierten Zellen (Überstand nach 48 Stunden gemessen). Der hCG Nachweis erfolgt mit einem kommerziellen Schwangerschaftstest. Als Negativ-Kontrolle wird das entsprechende Zellkulturmedium verwendet (Kontrolle).....	50
Abbildung 14 Pappenheim-Färbung; Inkubation der Bewo- und Jeg3- Zellen mit 30µM Forskolin (48 Stunden); Maßstabsbalken entspricht 200µm, n=3.....	51
Abbildung 15 Bewo-Zellen werden mit/ohne 30µM Forskolin (48 Stunden) inkubiert und mit einem ZO-1 spezifischen Antikörper gefärbt (grün). Die Zellkerne werden mit Höchst-dye (blau) gegengefärbt. Maßstab 100µm.....	52
Abbildung 16 Jeg3-Zellen werden mit/ohne 30µM Forskolin (48 Stunden) inkubiert und mit einem ZO-1 spezifischen Antikörper gefärbt (grün). Die Zellkerne werden mit Höchst-dye (blau) gegengefärbt. Maßstab 100µm.....	53
Abbildung 17, Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK8, DK9, DK17, DK8 (2)) ohne Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, n=4). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK18, DK26, DK28, DK26 (2)) nach Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, n=4). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von Bewo-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$	55
Abbildung 18 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Proteinidentifikationen. B) Proteine, die signifikant mehr abundant sind. C) Volcano-Blot der Untersuchung von Bewo-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$	59
Abbildung 19 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK13, DK14, DK15, DK24) ohne Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, n=4). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK23, DK30, DK32) nach Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, n=3). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von Jeg3-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$	61
Abbildung 20 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Proteinidentifikationen. B) Proteine, die signifikant mehr abundant sind. C) Volcano-Blot der Untersuchung von Jeg3-	

Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$	64
Abbildung 21 UniProt Allignment, Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen der humanen Serinprotease HTRA1 und der humanen Serinprotease HTRA4. 248 identische Positionen, Identität von 50,41%, 124 gleiche Positionen, durchgeführt am 12.10.2021.	68
Abbildung 22 Mevalonat-Weg. Die Phosphomevalonat-Kinase (PMVK, rot) phosphoryliert Mevalonat-Phosphat zu Mevalonatdiphosphat. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IDI1, rot) katalysiert die Umlagerung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat. Die rot markierten Proteine sind abundanter, wenn Bewo-Zellen unter geringer $[Ca^{2+}]$ kultiviert werden. Schemazeichnung modifiziert nach Goldstein et al. (1990).....	72

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primärantikörper für Immunpräzipitation (IP), Western-Blot (WB) und Immunzytochemie (ICC).	27
Tabelle 2 Sekundärantikörper für Western-Blot (WB) und Immunzytochemie (ICC).....	27
Tabelle 3 Errechnete Ca^{2+} -Konzentrationen des Zellkulturmediums für Bewo-Zelllinien (Vorgehen bei Berechnung siehe 2.2.1, Zusammensetzung des Mediums siehe 2.1.1).	33
Tabelle 4 Vergleich der Bewo-Proteome nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration. Proteine die nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgt mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.	41
Tabelle 5 Vergleich der Jeg3-Proteome nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration. Proteine die nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.	43
Tabelle 6 Vergleich der Bewo-Proteome nach Stimulation durch Forskolin. Proteine die nach Stimulation vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.....	56
Tabelle 7 Vergleich der Jeg3-Proteome nach Stimulation durch Forskolin. Proteine die nach Stimulation vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.....	62

III. Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Kalzium Konzentration
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CGB	Choriogonadotropin-Untereinheit beta
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bisoxoethylennitilotetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
hCG	humanes Choriongonadotropin
IDI1	Isopentenyl-Diphosphat delta-Isomerase 1
IP	Immunpräzipitation
KaCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PMVK	Phosphomevalonat-Kinase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tpc	Tag(e) <i>post-conceptionem</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV6	TRP Vanilloid subfamily member 6
UPR	unfolded Protein-Response, ungefaltete Protein-Antwort
ZO	Zona Occludens

1. Zusammenfassung

TRPV6 ist ein kalziumsensitiver Kationenkanal, der in serösen Drüsen und in Plazenta exprimiert wird. In der Schwangerschaft hat TRPV6 einen Einfluss auf den plazentaren Kalziumtransport, da sowohl bei *Trpv6*-defizienten Mäusen als auch bei Menschen, die bestimmte *Trpv6*-Genmutationen besitzen eine Unterminalisierung der Skelettknochen bei Embryonen und Neugeborenen festzustellen ist. Die feto-maternale Versorgung mit Nährstoffen und Mineralien erfolgt bei beiden Spezies über spezialisierte Zellen der Plazentaschranke, die Synzytiotrophoblasten, die das TRPV6 Protein exprimieren.

In dieser Arbeit wurden die aus Chorionkarzinomen abgeleiteten Bewo- und JEG3-Zelllinien als Trophoblasten-Modell genutzt. In beiden Zelllinien konnte die Expression des TRPV6 Proteins nach Immunpräzipitation mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen werden. Die Zellen wurden in Medium mit reduzierter Kalziumkonzentration kultiviert, um eine TRPV6-Defizienz zu simulieren. Sowohl die Zellmorphologie als auch die Proteinexpressionsprofile änderten sich in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration des Kulturmediums. Unter anderem führte dies bei Bewo-Zellen zu einer verminderten Expression von Zellkontakt-assoziierten Proteinen und einer erhöhten Expression der Serinprotease HTRA4. Diese ging einher mit einer erhöhten Expression von Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges und von Apoptose assoziierten Proteinen. Sowohl in TRPV6 defizienten Mäusen als auch in Trophoblasten einer humanen Plazenta, die in Bezug auf TRPV6 homozygote Mutationen aufweist, konnte nachgewiesen werden, dass Proteasen wie HTRA1 vermehrt exprimiert sind.

Zur weiteren Untersuchung der TRPV6 Funktion wurden Bewo-Zellen heterolog mit TRPV6 Plasmiden transfiziert. Ein potenzieller Blocker von TRPV6, die Substanz BlockV6, zeigte einen hemmenden Effekt auf die Funktion von TRPV6 in Kalzium-Imaging Untersuchungen. Allerdings hatte der BlockV6 auf untransfizierte Bewo-Zellen keine Auswirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Dies legt nahe, dass sich zum Zeitpunkt der Messung wenig oder kein TRPV6 Protein in der Plasmamembran der Bewo-Zellen befunden hat. Um zu testen, ob beide Zelllinien einerseits zur Synzytialisierung befähigt sind und andererseits die Protease HTRA4 an diesem Prozess beteiligt ist, wurde die Adenylatcyclase in beiden Chorioncarzinomzelllinien durch Forskolin stimuliert. Die resultierende Erhöhung der cAMP Konzentration induziert in Bewo-Zellen Synzytialisierung, nicht jedoch in JEG3 Zellen. Die massenspektrometrischen Analysen der Proteinexpressionsprofile vor bzw. nach Inkubation mit Forskolin zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression der Serinprotease HTRA4 sowie von Markerproteinen der Synzytialisierung (Syncytine 1 & 2, plazentare alkalische Phosphatase) in Bewo Zellen. Diese Proteine waren in JEG3 Zellen nicht nachweisbar. Zusätzlich wurde nach Forskolinstimulierung in beiden Zelllinien die vermehrte Expression des Schwangerschaftshormons

hCG sowie Enzymen, die an der Steroidhormonsynthese beteiligt sind, induziert. Zusammenfassend implizieren die Ergebnisse, dass Proteasen wie HTRA4 an der Synzytialisierung beteiligt sind.

1.1 Summary

Expression and analysis of TRPV6 in human trophoblast cell lines

TRPV6 is a calcium-sensitive cation channel expressed in serous glands and placenta. In pregnancy, TRPV6 has an impact on placental calcium transport, as both *Trpv6*-deficient mice and humans possessing certain *Trpv6* gene mutations exhibit skeletal bone undermineralisation in embryos and neonates. In both species, the fetomaternal supply of nutrients and minerals takes place via specialised cells of the placental barrier, the syncytiotrophoblasts, which express the TRPV6 protein.

In this work, the chorionic carcinoma-derived Bewo and JEG3 cell lines were used as trophoblast models. In both cell lines, the expression of the TRPV6 protein could be detected after immunoprecipitation by Western blot and mass spectrometric analysis. Cells were cultured in medium with reduced calcium concentration to simulate TRPV6 deficiency. Both cell morphology and protein expression profiles changed depending on the calcium concentration of the culture medium. Among other things, this led to a reduced expression of cell contact-associated proteins and an increased expression of the serine protease HTRA4 in Bewo cells. This was accompanied by increased expression of proteins of the ubiquitin-proteasome signalling pathway and apoptosis-associated proteins. In TRPV6-deficient mice as well as in trophoblasts of a human placenta, which has homozygous mutations of TRPV6, was it possible to prove that proteases such as HTRA1 are increasingly expressed.

To further investigate TRPV6 function, Bewo cells were heterologously transfected with TRPV6 plasmids. A potential blocker of TRPV6, the substance BlockV6, showed an inhibitory effect on TRPV6 function in calcium imaging studies. However, BlockV6 on untransfected Bewo cells had no effect on intracellular calcium concentration. This suggests that little or no TRPV6 protein was present in the plasma membrane of Bewo cells at the time of measurement. To test whether both cell lines are capable of syncytialisation on the one hand and whether the protease HTRA4 is involved in this process on the other hand, the adenylate cyclase in both chorionic carcinoma cell lines was stimulated by forskolin. The resulting increase in cAMP concentration induced syncytialisation in Bewo cells, but not in JEG3 cells. Mass spectrometric analysis of protein expression profiles before and after incubation with forskolin also showed increased expression of the serine protease HTRA4 and marker proteins of syncytialisation (syncytins 1 & 2, placental alkaline phosphatase) in Bewo cells. These proteins were not detectable in JEG3 cells. In addition, after forskolin stimulation, the increased expression of the pregnancy hormone hCG and enzymes involved in steroid hormone synthesis was induced in both cell lines. In summary, the results imply that proteases such as HTRA4 are involved in syncytialisation.

2. Einleitung

2.1 Plazenta

2.1.1 Entwicklung und Anatomie der menschlichen Plazenta

Die menschliche Plazenta entwickelt sich aus der Blastozyste, die eine frühe Form des Embryos, am fünften Tag *post-conceptionem* (Tpc) darstellt und die aus c.a. 200 Zellen besteht [132]. Die Blastozyste entsteht aus der Zygote [44] und besitzt eine innere und äußere Schicht, letztere das sogenannte Trophektoderm, welche aus Trophoblastenzellen besteht aus der sich später große Teile der Plazenta entwickeln. Die innere Zellschicht bildet den Embryoblast, aus welchem sich später der Embryo entwickelt. Umhüllt wird die Blastozyste von einer Glykoproteinhülle, der sogenannten *Zona pellucida* [39].

Um den Tag 6 Tpc löst sich die *Zona pellucida* auf und das Trophektoderm lagert sich an die Zellen des Endometriums an. Zuvor proliferieren die Trophoblasten und bilden eine innere Zellschicht aus Zytotrophoblasten sowie eine äußere Zellschicht aus mehrkernigen Synzytiotrophoblasten. Die Synzytiotrophoblasten wachsen invasiv in das Endometrium ein, die Blastozyste bettet sich ebenfalls im Endometrium ein [39]. Ab dem 10. Tpc ist die Blastozyste vollständig im Uterusstroma eingewachsen, das Endometrium wächst über die Blastozyste, so dass diese den Kontakt zum uterinen Lumen verliert [96]. Die Synzytiotrophoblasten hypertrophieren und bilden ein Synzytium [39].

Das Synzytium bildet ein Netzwerk aus Lakunen, kleine Hohlräume, die Anschluss an den maternalen Blutkreislauf erhalten und mit zunehmendem Verlauf der Plazentation an Volumen gewinnen, sie bilden später den intervillösen Raum. Ab dem 13. Tpc. wachsen Zytotrophoblasten in die Zellschicht der Synzytiotrophoblasten ein und bilden so den Beginn der typischen plazentaren Trabekelstruktur. Wenn die Zytotrophoblasten das Synzytium durchwachsen haben und am maternalen Stroma angelangt sind haben sie eine Primärzotte gebildet. Die Zytotrophoblasten wachsen weiter in das Uterusstroma ein und werden ab diesem Zeitpunkt als extravillöse (sich außerhalb der Plazenta befindlichen) Trophoblasten bezeichnet [52]. Aus dem Embryoblasten fangen mesenchymale Zellen an von innen in die Schicht der Zytotrophoblasten einzuwachsen und bilden so die Sekundärzotten [39]. Ab Ende der dritten Woche fangen embryonale Kapillaren an in das mesenchymale Gewebe der Sekundärzotte einzuwachsen und bilden damit eine Tertiärzotte. Die Kapillaren bilden ein Endothel und vergrößern ihr Lumen im Laufe der Schwangerschaft weiter in Abhängigkeit des embryonalen Bedarfs. Ab jetzt bilden sich an den Zottenoberflächen Ausstülpungen aus Synzytiotrophoblasten, die in das Lumen des intervillösen Raumes einwachsen. Diese Sprossen werden wieder mit mesenchymalem embryonalem Gewebe gefüllt (Sekundärzotten) und mit embryonalen Kapillaren

versehen (=Tertiärzotten). So verzweigen sich die Zottenbäume im Laufe der Gravidität immer weiter [52].

2.1.1.1 Anatomie der Plazenta

Die Plazenta setzt sich, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus der Basalplatte auf der mütterlichen sowie der Chorionplatte auf der fetalen Seite zusammen. Im sogenannten intervillösen Raum, der Raum zwischen der Chorionplatte und der Basalplatte, findet der Stoffaustausch statt. Dabei ragen Zottenbäume aus der Chorionplatte in den intervillösen Raum hinein [39].

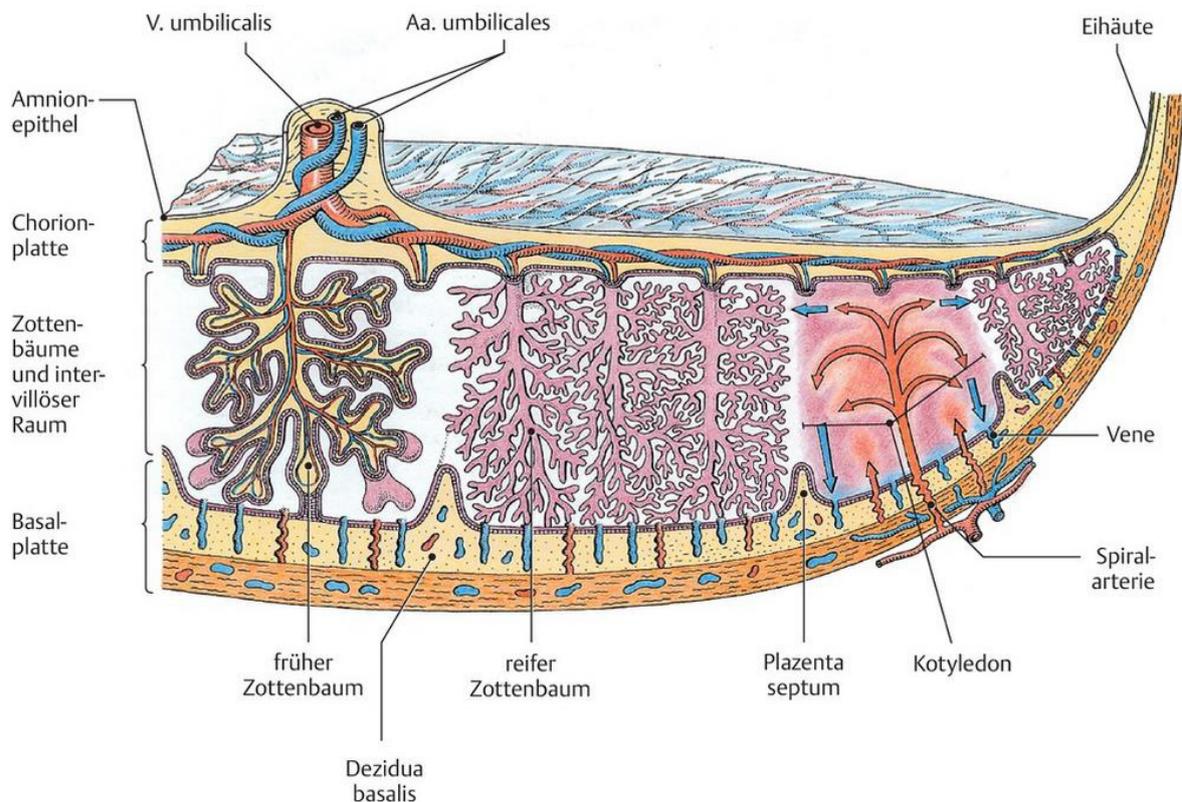


Abbildung 1 Anatomie der Plazenta; Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Plazenta (Ulfig, 2019).

Exemplarisch wird in der Abbildung die Entwicklung eines frühen Zottenbaums mit einigen Primär- und Sekundärzotten und eines reifen Zottenbaumes mit Tertiär- und Terminalzotten gezeigt. Ein Kotyledon bezeichnet eine Funktionseinheit der Plazenta, welche durch das Plazentaseptum begrenzt wird [133].

2.1.1.2 Aufbau der plazentarem Zottenbäume

Die Entwicklung der Plazenta geht mit einer Vergrößerung der Austauschoberfläche auf das bis zu achtfache der Körperoberfläche der Mutter während des letzten Trimenons einher. Diese Entwicklung ist essenziell für die Versorgung des Fetus, weil das Volumenverhältnis von

Plazenta zu Fetus im Laufe der Schwangerschaft stetig sinkt und bis zum Ende der Schwangerschaft bei einem Verhältnis von 1:7 bis 1:10 liegt [110].

2.1.1.3 Plazentaschranke

Die Terminologie der Plazentaschranke bezeichnet die anatomische Grenze zwischen dem fetalen und maternalen Blutkreislauf [39]. Abbildung 2 verdeutlicht die Lage der Synzytiotrophoblasten zu Beginn und Abschluß der Reifung, die verschiedenen Funktionen der Plazentaschranke übernehmen.

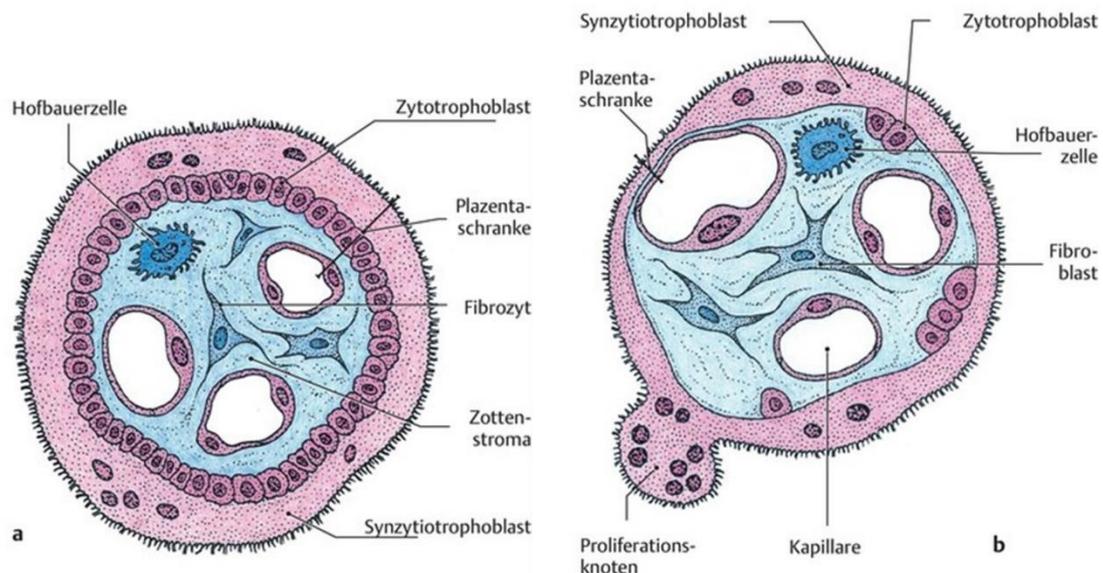


Abbildung 2 Plazentaschranke; eine schematische Darstellung einer Plazentazotte im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft: a) die frühe Plazentaschranke hat vier Schichten bestehend von maternal nach fetal aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, Basallamina des Trophoblasten, Zottenstroma, Basallamina des Endothels und dem Endothel der fetalen Kapillaren b) die reife Plazentaschranke (ab dem 4. Monat) ohne Zytotrophoblasten. Die Kapillaren liegen direkt unter den Synzytiotrophoblasten. Die Basallamina des Trophoblasten und des Endothels sind verschmolzen (Ulfig, 2019).

2.2 Funktion der Synzytiotrophoblasten in der humanen Plazenta

2.2.1 Überblick über die Funktion des Synzytiotrophoblasten beim Nährstofftransport

Der Gasaustausch zwischen Mutter und Embryo durch den Synzytiotrophoblasten erfolgt passiv über Diffusion. Kohlenhydrate gelangen in Form von Glucose durch verschiedenen Transporter der GLUT-Familie durch die Synzytiotrophoblasten [54]. Da die Plasmakonzentration von Aminosäuren im Fetus höher ist als in der Mutter, vermutet man einen aktiven Transport von Aminosäuren über die Plazenta. Hierbei scheint die Transportkapazität des Synzytiotrophoblasten die limitierende Entität des Aminosäuretransfers darzustellen [56]. Der Transport von Lipiden durch den Synzytiotrophoblasten erfolgt auf verschiedenen Wegen. Freie Fettsäuren sind im maternalen Serum hauptsächlich an Albumin gebunden. Phospholipide, Triglyceride und Cholesterol werden im maternalen Serum in Form von verschiedenen

Lipoproteinkomplexen transportiert [39]. Der Transport von Eisen erfolgt transzellulär über den Transferinrezeptor 1. Magnesium wird vermutlich über den Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6 (TRPM6) transportiert. Phosphor wird vermutlich mit Phosphortransportproteinen aus der Familie der Natrium-dependent Phosphate Transporter transportiert [52]. Kalzium wird durch verschiedene Transportproteine durch die apikale Membran der Synzytiotrophoblasten transportiert. Ein positiver Kalzium-Konzentrations-Gradient scheint dabei einen Einfluss auf den Transport zu haben. Das Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) scheint dabei in Bezug auf den Kalziumtransport in Synzytiotrophoblasten eine übergeordnete Rolle einzunehmen. Daneben gibt es noch weitere Kalziumkanäle mit Einfluss auf Kalziumtransport- und Homöostase in Synzytiotrophoblasten. Dazu zählen vor allem die apikal lokalisierten spannungsabhängige Kalziumkanäle, vornehmlich intrazelluläre Store-operated Channels (SOC) sowie basolateral lokalisierte Ca^{2+} -ATPasen und $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher. Die Kalziumbindepoteine Calbindin und Calmodulin regulieren den intrazellulären Kalziumhaushalt der Synzytiotrophoblasten. Neben dem transzellulären Transport besteht auch die Möglichkeit eines parazellulären Transports von Kalzium durch Zell-Kontakte [5].

2.2.2 Endokrine Funktion des Synzytiotrophoblasten

Da die Plazenta nicht neural innerviert ist stellen endokrine Signale die einzige Art der Kommunikation der Plazenta mit dem Organismus dar. Der Großteil der endokrinen Funktion der Plazenta geht dabei auf den Synzytiotrophoblasten zurück. Dieser kann Hormone sowohl in den maternalen intervillösen Raum sezernieren als auch parakrin und autokrin auf plazentares Gewebe wirken. Neben den Synzytiotrophoblasten sind auch Zytotrophoblasten und extravillöse Trophoblasten an endokriner Regulation der Plazenta beteiligt. Die in Synzytiotrophoblasten synthetisierten Hormone können gemäß ihrer biochemischer Struktur in Steroidhormone und Peptidhormone aufgeteilt werden [52]. Im nachfolgenden soll daher kurz auf die wichtigsten in der Plazenta gebildeten Hormone sowie ihre Wirkung in der Plazenta eingegangen werden.

2.2.2.1 Steroidhormone in der humanen Plazenta

Progesteron hat eine wichtige Funktion während des Schwangerschaftsbeginns und ist für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft essenziell. Es wird in den ersten 8 Wochen der Schwangerschaft im *Corpus luteum gravidarum* gebildet, bis der plazentare Synzytiotrophoblast im Zuge des luteo-plazentaren Shifts die Progesteronsynthese übernimmt. Progesteron wird aus Cholesterin gebildet [52]. Cholesterin wird dabei durch Ablösung der Seitenkette von P450_{scc}, dem Cholesterin Side-Chain Cleavage Enzyme (CYP11A1) zu Pregnenolon

konvertiert. Dieser erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Progesteron Synthese findet in der inneren Mitochondrienmembran statt. Die benötigten Elektronen zur Ablösung der Seitenkette bekommt P450_{scc} dabei von mitochondrialen Adrenodoxin (ADX). Pregnenolon wird weiterhin von der Typ1 3-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD3B1) zu Progesteron konvertiert. Da das Zytochrom P450-17alpha (CYP17) kaum in der Plazenta synthetisiert wird, ist ein Syntheseweg von Estrogenen aus Progesteron in der Plazenta ausgeschlossen. Der geschwindigkeitsregulierende Faktor der Progesteronsynthese ist neben der Aktivität von P450_{scc} und dem Transport von Cholesterin in die innere mitochondriale Membran auch die Aktivität von Adrenodoxin. In verschiedenen Trophoblastenzelllinien wurde gezeigt, dass die Erhöhung von cAMP durch Forskolin oder cAMP-Analoga zwar die Expression der CYP11A1 sowie die hCG-Synthese verstärkt, die Aktivität der Progesteronbildung aber weiterhin relativ konstant bleibt [15,130]. Progesteron bindet an nukleäre Rezeptoren, Progesteron Rezeptor A (PRA) und Progesteron Rezeptor B (PRB), die ubiquitär in den anderen Organen wie z.B. Gehirn, Genitaltrakt, Plazenta und Mammæ vorhanden sind. Progesteron ist zudem in der Lage nicht-nukleäre Zellsignalwege durch membranständige Rezeptoren zu vermitteln [52]. Diese nicht nukleären PR stellen Isoformen der nuklearen Progesteronrezeptoren dar und sind in die Zellmembranen eingebettet [36].

Estrogene werden in den ersten Schwangerschaftswochen im Corpus Luteum gravidarum gebildet, während später die placentaren Synzytiotrophoblasten den Großteil der Estrogenproduktion übernehmen. Von den in der Plazenta gebildeten Estrogenen Estron (E1), 17-beta Estradiol (E2), Estriol (E3) und Estetrol (E4) sind nur E2 und E3 klinisch von Bedeutung. Der größte Unterschied der Estrogensynthese in der Plazenta im Vergleich zur Nebennierenrinde besteht wie oben beschrieben in der geringen Expression der CYP17, so dass die Substrate der placentaren Estrogensynthese, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und 16-OH-DHEAS, aus hauptsächlich der fetalen, aber auch maternalen Nebennierenrinden stammen. Die Substrate werden dann durch die Aromatase (CYP19A1) aromatisiert. Da die Aromatase O₂ abhängig agiert, zeigt eine erhöhte Plasmakonzentration von 16-OH-DHEAS eine beginnende Plazentainsuffizienz an [15,52]. Die Estrogenrezeptoren ER-alpha und ER-beta sind nukleäre Rezeptoren die ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert werden [58]. Neben nukleären Rezeptoren gibt es auch membranständige Rezeptoren, die unter anderem an der Aktivierung der Adenylatcyclase und der Kalziummobilisation beteiligt sind [52].

2.2.2.2 Glykoproteine

Humanes Choriongonadotropin (hCG) ist das essenzielle Peptidhormon zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Da der Embryo bereits vor der Implantation mit der hCG Produktion beginnt und hCG am 8. Tag post-conceptionem im Serum nachweisbar ist, wird es klinisch als Marker für die Existenz eines Embryos genutzt. Es wird hauptsächlich in

Synzytiotrophoblasten gebildet. HCG gehört zur Familie der Glykoproteine und hat eine ähnliche Struktur wie die das luteinisierende Hormon (LH), follikelstimulierende Hormon (FSH) und sowie das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH), welche der Hypophyse entstammen. Die genannten Proteine setzen sich aus jeweils einer identischen alpha-Untereinheit zusammen und unterscheiden sich in ihrer beta-Untereinheit. Daher wird die beta-Untereinheit des hCG Hormons zum Nachweis einer Schwangerschaft oder zur massenspektrometrischen Analyse genutzt. HCG hat einen Einfluss auf verschiedenste Zellsignalwege in verschiedenen Geweben. In der Plazenta, in den Zytotrophoblasten aktiviert hCG die Adenylatcyclase, welche wiederum über Proteinkinase A die Zellfusion der Zytotrophoblasten und eine Bildung von Mikrovilli aktiviert und damit die Ausdifferenzierung zum Synzytiotrophoblasten fördert [52].

Leptin wird hauptsächlich in Adipozyten der Plazenta gebildet, in der Frühschwangerschaft können aber auch Synzytiotrophoblasten die Bildung von Leptin übernehmen. Die Wirkung von Leptin auf die Plazenta erfolgt parakrin und könnte an Zellproliferation und Immunmodulation beteiligt sein. In Chorionkarzinom-Zelllinien wird ein Zusammenhang von Leptin mit Zellproliferation diskutiert [108].

Auch das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wird zu einem Großteil in Synzytiotrophoblasten gebildet. Serumwerte steigen vor allem gegen Ende der Schwangerschaft an, wobei die Produktion von plazentarem CRH durch Progesteron gehemmt und durch Cortisol aktiviert wird. Es beeinflusst die physiologische Geburtsauslösung. CRH führt in der fetalen adrenergen Achse zur Sekretion von DHEAS, welches in der Plazenta zu Estrogen aromatisiert wird. Die hohe lokale Konzentration von Estrogen führt daraufhin zu Expression von z.B. Oxytocin Rezeptoren, Gap-Junction-Proteine oder Prostaglandinen im Myometrium. CRH kann auch direkt über myometrale CRH-Rezeptoren die Uteruskontraktilität beeinflussen [52].

2.2.3 Bewo- und Jeg3- Zelllinien als Modell für humane Trophoblasten

Bewo- und Jeg3- Zelllinien entstammen ursprünglich aus verschiedenen humanen Chorionkarzinomen. Sie dienen als Modell für humane Trophoblasten und haben sich seit vielen Jahren als ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Zellsignalprozesse in Trophoblasten bewährt [122]. 1968 beschrieben Pattillo und Gey erstmals die Immortalisierung von Zellen aus humanem Chorionkarzinom. Dazu wurde eine Probe einer zerebralen Metastase eines Chorionkarzinoms in der Backe eines Hamsters kultiviert. Anschließend wurden Proben dieser Kultur *in vitro*-kultiviert. Diese Bewo-Zellen waren damit die erste stabile Trophoblastenzelllinie *in vitro* [99]. 1971 beschrieben Kohler und Bridson das erste Mal die erfolgreiche stabile *in vitro*-Isolation von klonalen hormonproduzierenden Zellen, diese sind heute als die Jeg3 Zelllinie bekannt [68]. Obwohl beide Zelllinien ursprünglich aus dem Chorionkarzinom stammen, unterscheiden sich die Zelllinien in verschiedenen Eigenschaften. Bei der Bewo-Zelllinie ist die

Produktion von hCG abhängig von cAMP, Proteinkinase C und der Kalzium-Konzentration. Sie kann u. a. durch GnRH gesteigert werden. Die Proliferation von Bewo-Zellen wird durch Estradiol oder Progesteron gemindert [122]. Des Weiteren wird bei Bewo-Zellen durch cAMP, 8-bromo-cAMP oder Forskolin die Synzytialisierung ausgelöst [97]. Bei Jeg3-Zellen hingegen gibt es in der Literatur Hinweise auf eine verstärkte Expression der CYP11A1 und Adrenodoxin sowie der 11-Beta-HSD (2.2.2.1) nach Inkubation mit cAMP [122].

2.3 TRP Kanäle – ein Überblick

Transient Receptor Potential (TRP) Proteine bilden eine heterogene Gruppe von Kationenkanälen. Insgesamt gibt es in Vertebraten 28 verschiedene TRP-Kanäle, die sich in sieben Unterfamilien aufteilen (Abbildung 3).

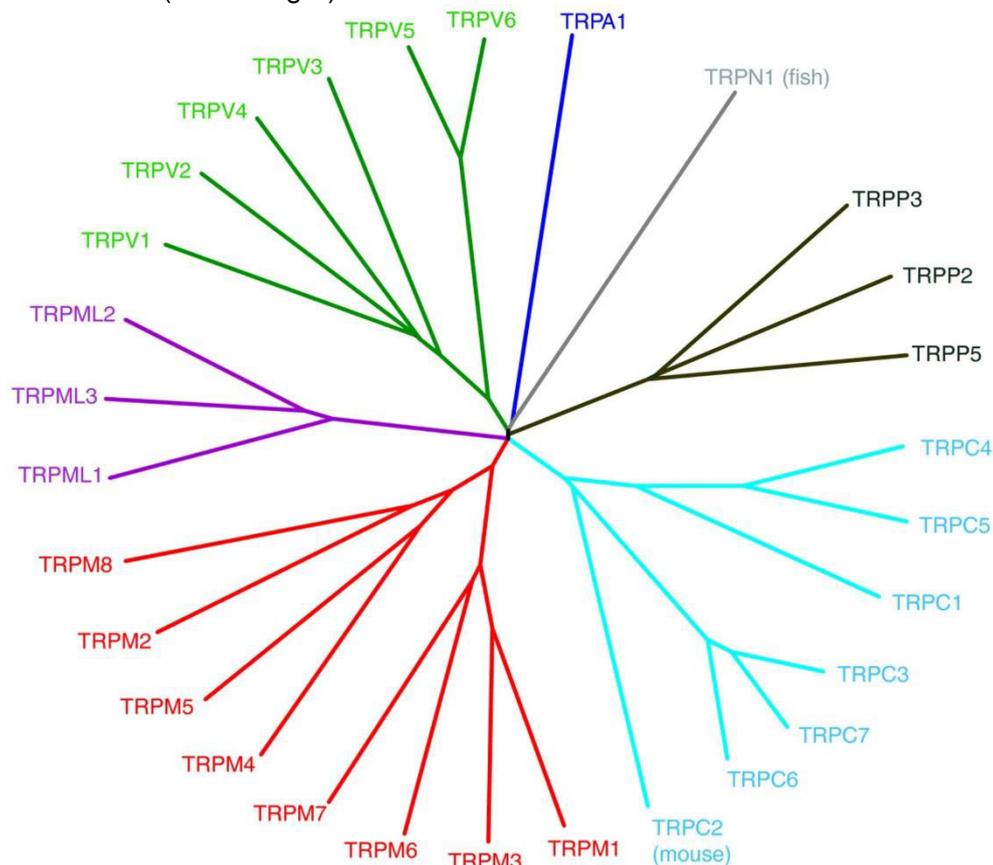


Abbildung 3 Dendrogramm der verschiedenen TRP-Kanäle. Die Farbakzentuierung beschreibt die Zugehörigkeit zu verschiedenen TRP-Unterfamilien. Abbildung modifiziert nach Nilius et al (2011).

Bei der TRPC-Unterfamilie steht das C für „classical“ oder „canonical“. Die ersten entdeckten TRP-Kanäle in Säugetieren waren TRPC-Kanäle, welche eine hohe Homologie zu Trp und Trpl Ionenkanälen aus Photorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* haben. TRPM-Kanälen sind nach der Substanz Melastatin benannt. TRPML-Kanäle sind nach der Substanz Mucolipin benannt, namensgebend ist hier die Mucolipidose Typ IV, welche mit TRPML assoziiert ist. Der TRPA-Kanal hat N-Terminal mehrere namensgebende Ankyrin-

Repeat-Domänen [105]. Der TRPN-Kanal wurde auch erstmals in *Drosophila* identifiziert und erhält seine Namensgebung durch den Zusatz „no mechanoreceptor potential C“ weil eine Mutation in TRPN in *Drosophila* zu Funktionsverlust von Mechanorezeptoren in Flimmerhärchen führt [72]. TRPP-Kanäle leiten sich von Polycystin 1 ab, ein Protein, das bei Mutation zur polyzystischen Nierenerkrankung führt und dadurch namensgebend ist [105]. TRPV-Kanäle werden auf Grund ihrer Homologie zum ersten identifizierten Vertreter, dem Vanilloidrezeptor TRPV1, auch als Capsaicinrezeptor bekannt, eingruppiert und sind durch Vanilloide und Capsaicin aktivierbar [31]. TRPV1-4 sind thermosensibel, sie übernehmen Funktionen im Bereich der Thermosensation und Thermoregulation. TRPV5 und TRPV6 sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 74% identisch, teilen sich mit den anderen TRPV-Kanälen jedoch lediglich ca. 22% der Aminosäuresequenz und sind somit als eine eigene Gruppe zu verstehen. Weiteres Charakteristikum für TRPV5 und TRPV6 ist die hohe Selektivität für Kalzium [105].

2.3.1 TRPV6 Kanäle

Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) ist auch unter den Synonymen ECAC2, CaT1 und CaT-like in der Literatur zu finden [30]. TRPV6 wurde erstmals aus dem Darm der Ratte isoliert, später erfolgte die Identifikation der orthologen humanen und murinen Proteine [46,145]. Die Expression von TRPV6 in der Maus unterscheidet sich stark von der im Menschen. So wird TRPV6 im murinen Gewebe z.B. stark in Prostata und Epididymidis exprimiert, während der Nachweis über die Expression des Kanals in humanem Gewebe in besagten Organen nach wie vor unsicher ist. Da die Arbeit an humanen Zelllinien durchgeführt wird beziehen sich die nachfolgenden Informationen auf humanes Gewebe. TRPV6 wird im menschlichen Gewebe vor allem in der Plazenta, Pankreas und eventuell auch in Prostata und Dünndarm exprimiert. Eine Expression in der Niere wird diskutiert. Eine verstärkte Expression von TRPV6 findet sich in Carcinomen der Prostata, Mammae und Endometrium [30].

2.3.1.1 Besondere Situation der Translation von TRPV6 im Menschen

Das humane TRPV6-Protein besteht aus 765 Aminosäuren (Uniprot Accession Number Q9H1D0). Eine besondere Eigenschaft von TRPV6 ist der Start der Translation von einem non-AUG-Codon, einem ACG-Codon, das sich 120 Basenpaare 5` terminal vor dem ersten *In-Frame* AUG Codon, das für Methionin codiert, befindet. Damit ist das längere TRPV6 mit 765 Aminosäuren etwa 40 Aminosäuren länger als das am AUG-Codon translatierte TRPV6 mit 725 Aminosäuren [31].

Interessanterweise beginnt das humane TRPV6 Protein, obwohl es von einem ACG Codon translatiert wird, welches normalerweise für Threonin codiert, dennoch mit der Aminosäure Methionin [29]. Die Effizienz der Translation von TRPV6 wird durch Verwendung des ACG-

Startcodons im Menschen vermindert. Ein AUG-Startcodon führt zu effizienterer Translation und Expression von TRPV6 [147]. Da die Aktivierung von TRPV6 durch das starke Kalziumsignal zu Apoptose führen kann [114], ist die Verwendung des ACG-Startcodons eventuell als evolutionäre Schutzfunktion vor überschießender Translation von TRPV6 mit der damit verbundenen Gefahr der Apoptose zu verstehen. Fledermäuse hingegen haben an dem im Menschen existierenden ACG-Startcodon ein AUG-Startcodon, sodass sich deren Translation von TRPV6 deutlich effizienter gestaltet. Dies könnte eventuell ein Resultat der Anpassung an verminderte Kalziumkonzentrationen in der Nahrung sein [147]. In der Literatur wird im Zusammenhang mit verschiedenen Experimenten die Vermutung formuliert, dass eine verminderte Kalziumkonzentration in Zellen zu einer vermehrten Expression oder Aktivität von TRPV6 führen könnte [9,74,147]

2.3.1.2 Struktur des TRPV6 Proteins

Ein funktionaler TRPV6-Kanal besteht aus 4 identischen Untereinheiten, welche sich zu einem Komplex zusammenlagern und damit den Kanal bilden. Eine Untereinheit besteht wiederum

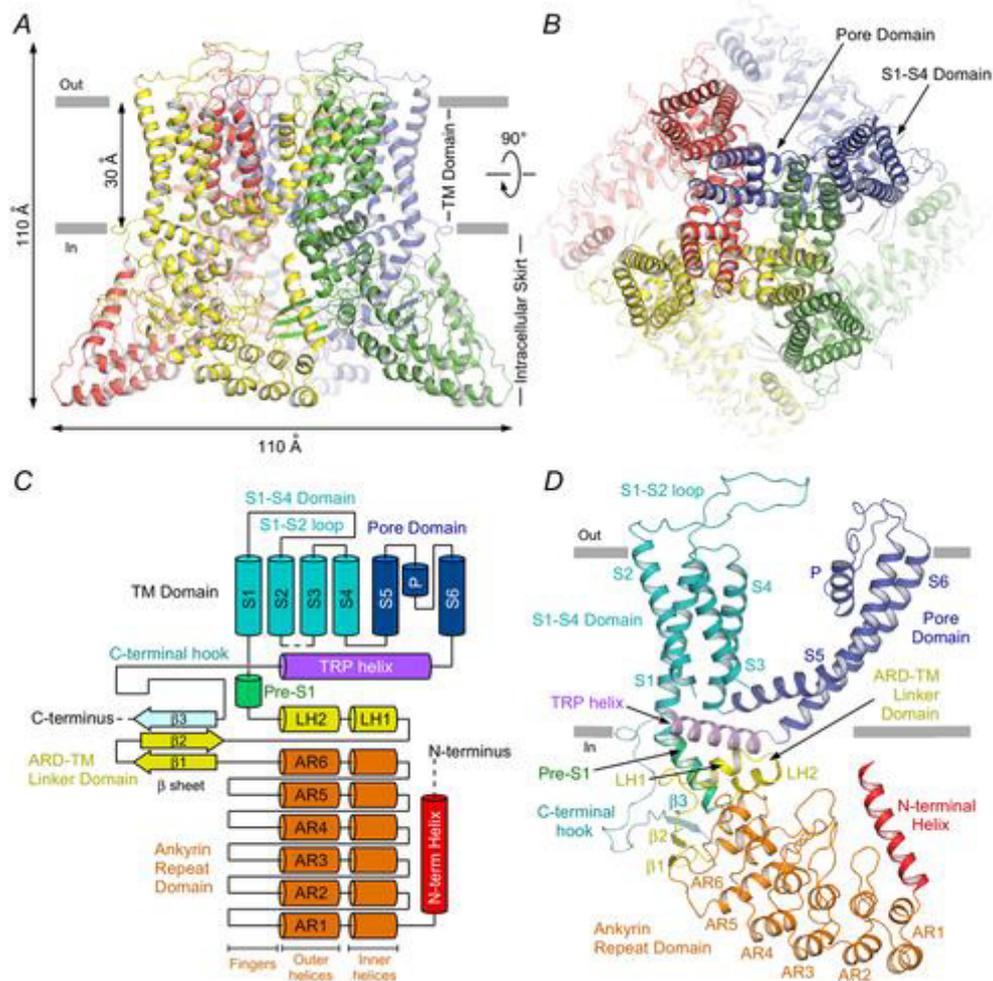


Abbildung 4 Struktur und Domain-Organisation von TRPV6 A) Seitenansicht auf einen TRPV6-Komplex B) Sicht von oben auf einen TRPV6-Komplex C) Anordnung der Domains einer TRPV6-Untereinheit D) Seitenansicht einer TRPV6-Untereinheit; Bilder von Saotome et al. (2016), modifiziert nach Yelshanskaya et al. (2020).

aus sechs Transmembransegmenten (TM1-TM6). C-Terminal befindet sich eine Calmodulin-Bindestelle über die der Kanal in Anwesenheit einer erhöhter intrazellulären Kalzium-Konzentration inaktiviert wird [95].

Vier homomere TRPV6 Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal. Jede Untereinheit enthält eine N-Terminale Helix, auf die eine Ankyrin-Repeat-Domain folgt (Abbildung 4). Weiter C-Terminal findet sich eine Linker Domain mit einem beta-Hairpin. Darauf folgt eine Helix-turn-Helix Einheit gefolgt von einer pre-S1 Helix. Diese verbindet die Linker Domain mit der Transmembran-Domäne. Die Transmembran-Domänen werden mit S1 bis S6 nummeriert, wobei sich ein Poren-Loop zwischen S5 und S6 befindet. Nach S6 folgt eine TRP-Helix und ein aus

Polypeptiden geformte Loop-Struktur, einen sogenannten C-terminalen hook, auf den wiederum ein beta-Strang folgt, welcher sich an die beta-Stränge der Linker Domain anfügt [150].

2.3.1.3 Funktion

TRPV6 ist neben TRPV5 der TRP-Kanal mit der höchsten Kalziumselektivität. Jedoch ist auch der Transport von anderen divalenten Kationen wie u. a. Barium, Strontium und Mangan beschrieben. Auch monovalente Kationen können den Kanal in divalent-freien Lösungen passieren. Die Expression von TRPV6 beschränkt sich hauptsächlich auf Kalzium-transportierende Epithelien, daher liegt die Vermutung nahe, dass TRPV6 an Vorgängen der Absorption und Reabsorption von Kalzium in Epithelien beteiligt sein könnte [31].

2.3.1.4 TRPV6 Expression in der Plazenta

Wie oben beschrieben wird TRPV6 in der Plazenta exprimiert [30]. In der murinen Plazenta wurde gezeigt, dass TRPV6-defiziente Embryonen, die in TRPV6-defizienten Müttern ausgetragen werden, eine Verzögerung des Wachstums und eine verringerte Knochenmineralisierung aufweisen, die dem klinischen Bild eines humanen Hyperparathyreoidismus ähneln [32]. Im Menschen wurde im Zuge von verschiedenen Case-Reports gezeigt, dass Loss-of-Function-Mutationen von TRPV6 mit einer verringerten Kalzifizierung der Knochen und einem sekundären Hyperparathyreoidismus einhergehen. Die Kalzifizierung sowie der Hyperparathyreoidismus betroffener Patienten können sich innerhalb von einigen Wochen nach der Geburt, wenn der Fötus nicht mehr von der Versorgung durch die Plazenta abhängt, normalisieren [1,12,85,94,124]. Einige Autoren bezeichnen besagte Klinik auch als transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus, weil der Hyperparathyreoidismus die Folge eines verminderten Kalziumtransports über die Plazenta darstellt [124].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Plazenten von TRPV6 defizienten Embryonen bestimmte Proteasen gegenüber dem Wildtyp abundanter waren und die Menge an extrazellulären-Matrix-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp reduziert war [143]. Die Plazenten des Wildtyps waren verglichen mit Plazenten aus Mäusen mit einer Deletion von TRPV6 (TRPV6^{-/-}) oder einer Inaktivierung durch eine Punktmutation von TRPV6 (TRPV6^{mt/mt}) gleich groß und schwer, allerdings waren die Embryonen E14.5 und E18.5 deutlich kleiner. Zudem enthielt die Struktur des Labyrinths mehr Zell-freie Räume und war im Vergleich zum Wildtyp weniger kompakt [32]. Auch wenn bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine endogene Aktivität von TRPV6 in Zellmembranen von Trophoblasten nachgewiesen werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass TRPV6 den transzellulären Transport von Kalzium durch Plazenta reguliert [145].

2.3.2 Zielsetzung der Arbeit

2.3.2.1 Fragestellung

Wie oben erörtert, ist TRPV6 an der Regulation des transzellulären Kalzium-Transports in murinen Trophoblasten beteiligt. Es liegen Hinweise aus Case-Reports vor, die dieses auch für humane Trophoblasten vermuten lassen (siehe 2.3.1.4).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Funktion TRPV6 bei der Regulation des plazentaren Kalziumtransportes in humanem Trophoblasten-Zelllinien einnehmen könnte.

Dazu wurden die beiden Chorionkarzinom-Zelllinien Bewo und Jeg3 in Zellkulturmedium mit niedriger extrazellulärer Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]$) kultiviert. Unter der Annahme, dass TRPV6 an der Kalziumhomöostase beteiligt ist, wurden die Chorionkarzinomzelllinien in Medium mit einer reduzierten extrazellulärer Kalziumkonzentration kultiviert, um den Effekt, den eine TRPV6 Defizienz nach sich zöge, zu mimicken.

Da Bewo-Zellen eine geringe Menge an TRPV6 Protein bilden, wurde untersucht, ob sich eine endogene TRPV6-Aktivität nachweisen lässt und ob ein potenzieller TRPV6 Inhibitor, BlockV6, die zytosolische Kalziumkonzentration beeinflusst. Außerdem wurde TRPV6 in Bewo-Zellen überexprimiert, um zu testen, ob die Überexpression TRPV6-abhängige Änderungen der zytosolischen Kalzium-Konzentration hervorruft, wie es beispielsweise in HEK293-Zellen der Fall ist. Der Effekt des Inhibitors BlockV6 wurde ebenso in TRPV6-überexprimierenden Bewo-Zellen getestet.

Schließlich wurde untersucht ob in beiden Zelllinien, Bewo und Jeg3, durch Forskolin die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten induziert werden kann und ob dieser Prozess von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängt.

2.3.2.2 Vorgehen

Zuerst wird TRPV6 mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot sowie massenspektrometrischer Analyse in Bewo- und Jeg3-Zelllinien nachgewiesen.

Als Zweites wird der Einfluss einer Kultivierung der Bewo-Zelllinie in Medium mit erniedrigter $[Ca^{2+}]$ in Bezug auf Wachstumsverhalten und Morphologie mit Hilfe einer Pappenheim-Färbung analysiert. Außerdem wird der Einfluss einer niedrigen extrazellulären Kalziumkonzentration auf das Proteom von Bewo- und Jeg3-Zellen untersucht.

Des Weiteren wird der Kalzium-Haushalt der Bewo-Zelllinie sowohl nativ als auch nach TRPV6 Überexpression von TRPV6 mittels Kalzium-Imaging-Verfahren mit FURA-2AM und der Einfluss des TRPV6-Inhibitors, BlockV6, untersucht werden.

Schließlich möchten wir die durch Forskolin ausgelöste Synzytialisierung von Bewo- und Jeg3-Zellen immunzytochemisch untersuchen und das Proteom beider Zelllinien vor und nach der Synzytialisierung massenspektrometrisch analysieren.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Zellkultur

JEG-3 (ATCC® HTB-36™)

Bewo (ATCC® CCL-98™)

Zellkulturmedium für Bewo-Zelllinien

Ham's F-12 Nutrient Mix (Gibco) Nr. 21765029 (0,3mM Ca²⁺)

2mM Glutamax (Gibco)

10% (v/v) fetales Kälberserum (Corning) Nr. 35079016 (3,5mM Ca²⁺)

100U/mL Penicillin (Sigma-Aldrich)

100µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)

Kalzium-Konzentration: 0,65mM

Finale Kalzium-Konzentration nach Einstellung: 0,65mM

Zellkulturmedium für Jeg3-Zelllinien

Minimum Essential Medium (Gibco) Nr. 31095029 (1,8mM Ca²⁺)

10% (v/v) fetales Kälberserum (Corning) Nr. 35079016 (3,5mM Ca²⁺)

Finale Kalzium-Konzentration nach Einstellung: 1,97mM

PBS

136mM NaCl

2,7mM KCl

1,47mM KH_2PO_4

8mM Na_2HPO_4

pH 7,4

2x Lämmli

120mM TRIS-HCl

20% (v/v) Glycerin

10% (v/v) β -Mercaptoethanol

8% (w/v) SDS

0,01% (w/v) Bromphenolblau

pH 6,8

3.1.2 Immunpräzipitation

RIPA-Puffer

150mM NaCl

50mM Tris HCl

5mM EDTA

1% (w/v) Nonidet P40

0,1% (w/v) SDS

0,5% (w/v) Na-Deoxycholat

pH 8,0

cOmplete™, Mini, (EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail) (Roche) Nr. 04693159001

3.1.3 Western-Blot

MOPS-Puffer

NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)

Transferpuffer

20% (v/v) Methanol

10% (v/v) 10x SDS Elektrophoresepuffer

Ponceau-Rot-Lösung

0,5% (w/v) Ponceau S

1% (v/v) Essigsäure

Blockierungspuffer

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

10x TBS

0,5M TRIS-HCl

1,5M NaCl

pH 7,5

Primärantikörperlösung

0,05% (w/v) NaN_3

1% (w/v) BSA

Primärantikörper Tabelle 1

in 1x TBS

Sekundärantikörperlösung

5% (m/v) Magermilchpulver

Sekundärantikörper Tabelle 2

in 1x TBS

ECL-Lösung

Pierce™ Fast Western Blot Kit, ECL Substrate (Thermo Scientific™)

Stripping-Puffer

0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol

2% (w/v) SDS

50mM Tris-HCl

3.1.4 Immunzytochemie

Fixierungslösung

100% Methanol

Blocking-Puffer

3% (w/v) BSA

1% (v/v) Ziegenserum

0,1% (v/v) TritonX-100

in PBS

Primärantikörperlösung

Primärantikörper

1% (w/v) BSA

0,05% (v/v) TritonX-100

Sekundärantikörperlösung

Sekundärantikörper

0,1% (v/v) Höchst in PBS

3.1.5 Massenspektrometrie

Blue Silver Färbelösung:

0,125% (w/v) Coomassie G250

20% (v/v) Methanol

10% (v/v) Phosphorsäure

10% (w/v) Ammoniumsulfat

Fixierungslösung:

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Lösung A

50mM NH_4HCO_3

Lösung B

50% (v / v) Lösung A

50% (v / v) Acetonitril

Reduktionslösung

10mM Dithiothreitol in Lösung A

Alkylierungspuffer

5mM Iodacetamid in Lösung A

Sequencing Grade Trypsin

20µg "Sequencing Grade Modified Trypsin" (Promega) in 1 ml Lösung A

Extraktionspuffer

50% (v / v) Acetonitril

2,5% (v / v) Ameisensäure

Fließmittel A

0,1% (v/v) Ameisensäure

Fließmittel B

0,1%(v/v) Ameisensäure

90% (v/v) Acetonitril

Aufnahmepuffer für nano-HPLC-Proben

2% (v/v) Acetonitril

0,05% (m/v) Trifluoressigsäure

3.1.6 Kalzium-Imaging

Fura-2-AM-Lösung

1mM Fura-2-AM (Invitrogen) in DMSO

B1-Puffer

115mM NaCl

2mM MgCl₂

5mM KCl

10mM HEPES

pH 7,4

BlockV6-Stock

0,5M BlockV6 in DMSO

Puffer 1

2,5 mM CaCl₂ in B1

Puffer 2 A/B

50µM BlockV6 (A) oder äquivalente DMSO-Kontrolle (B) in Puffer 1

Puffer 3

12.5mM EGTA in B1-Puffer

Puffer 4

5mM CaCl₂ in B1-Puffer

3.1.7 Antikörper

Tabelle 1 Primärantikörper für Immunpräzipitation (IP), Western-Blot (WB) und Immunzytochemie (ICC).

Name	Epitop	Klonalität	Lage Epitop	Herkunft	Konzentration	Hersteller
429	TRPV6	Polyklonal	C-terminal	Kaninchen	IP 20µg WB 1:100	AG Flockerzi
20C6	TRPV6	Monoklonal	C-terminal	Maus	WB 1:50	AG Flockerzi
ZO-1	ZO-1	Polyklonal	N-terminal	Kaninchen	ICC 1:500	Invitrogen

Tabelle 2 Sekundärantikörper für Western-Blot (WB) und Immunzytochemie (ICC)

Name	Epitop	Klonalität	Herkunft	Hersteller	Konzentration
-------------	---------------	-------------------	-----------------	-------------------	----------------------

Anti-mouse HRP (horse-radish peroxidase)	IgG schwere und leichte Kette	Polyklonal	Schaf	GE Healthcare	WB 1:10 000
Anti-rabbit HRP	IgG schwere und leichte Kette	Polyklonal	Affe	GE-Healthcare	WB 1:30 000
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	IgG schwere und leichte Kette	Polyklonal	Ziege	Invitrogen	ICC 1:1000

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Transfektion

Die verwendeten Zelllinien, Bewo und Jeg3 (3.1.1), wurden in dem jeweils empfohlenen Zellkulturmedium (3.1.1) bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ in 75cm²- oder 175cm²-Flaschen (Greiner) kultiviert und für Experimente in Zellkulturschalen (Falcon, Ø 35mm) ausplattiert. Sofern die [Ca²⁺] des Zellkulturmediums verändert wurde, erfolgte die Berechnung der benötigten EDTA-Menge mit dem Programm WEBMAXC. Die bereits in den Zellkulturmedien und den Zusätzen vorhandene [Ca²⁺] wurde mit einem Ca²⁺-Messgerät (Fuji DRI-CHEM NX500) bestimmt. Für die Proteomanalyse wurden jeweils zwei Zellkulturschalen mit einer Konfluenz von 40% ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dies geschah mit Medium, zu welchem vorher die errechnete Menge EDTA (0,3mM) oder Forskolin (30µM) hinzugegeben wurde. Die Kontrollzellen wurden sowohl in Gegenwart mit/ohne Forskolin gezogen aber ohne EDTA-Zusatz. Nach weiteren 48 Stunden wurden jeweils zwei Zellkulturschalen drei Mal mit PBS (3.1.1) gewaschen und die Zellen in 200µl Lämmli-Puffer (3.1.1) pro Versuchsbedingung aufgenommen, bei 60°C für 20 Minuten denaturiert und mit einem Bandelin Sonoplus HD2200 (Bandelin Electronic) aufgeschlossen und die DNA geschert (10x1s, 31% Intensität).

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Lipofektion. Hierzu wurden ca. 80% konfluent bewachsene Zellkulturschalen mit je 2,5 µg der jeweiligen Plasmide (pcAGGS-IRES-GFP-TRPV6vl; pcAGGS-IRES-GFP) in einer Konzentration von 1µg/µl mit 125µl Optimem (Thermo Scientific™) und 4µl P3000 (Thermo Scientific™) vermischt. Die Plasmide wurden von PD Dr. Ullrich Wissenbach zur Verfügung gestellt. In einem anderen Eppendorfgefäß wurden 125µl Optimem (Thermo Scientific™) und 4µl Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific™) gemischt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde der Inhalt des Eppendorfgefäßes in das erste

Eppendorfgefäß überführt und weitere fünf Minuten Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Inhalt tropfenweise in das Schälchen mit 2ml Zellkulturmedium (3.1.1) pipettiert.

3.2.2 RIPA-Lysat Herstellung für die Immunpräzipitation

Zur Herstellung des Ripa-Zell Lysates wurden Bewo- und Jeg3-Zellen in jeweils zehn Zellkulturschalen (Greiner, \varnothing 50mm) bis zu 90% Konfluenz angezüchtet. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen ohne den Einsatz von Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst und in PBS (3.1.1) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml RIPA-Puffer (3.1.2) aufgenommen, auf Eis zehn Mal mit einer Kanüle (27G) geschert und anschließend 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die gescherte Suspension wurde schließlich bei 100.000xg für 45 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen, der Überstand wurde zur Weiterverarbeitung in ein anderes Eppendorf Gefäß überführt und direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) genutzt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Verdünnung wurde in einem Bereich von 1:100 bis 1:500 durchgeführt. Die im Kit vorhandene BSA-Standardlösung diente zur Erstellung der Eichgerade mit folgenden Proteinkonzentrationen: 0µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml und 100µg/ml. Standardreihe und Proben wurden hergestellt. Hierzu wurden 50µl der Verdünnung und Eichlösung mit jeweils 300µl des Reagenz (A:B, 50:1) gemischt und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 300µl jeder Probe in eine Mikrotiterplatte (Thermo Scientific™) überführt und die Extinktion bei 540nm gemessen. Die Messung wurde an einem Infinite M200 (Tecan) durchgeführt und mit Excel (Microsoft) ausgewertet.

3.2.4 Immunpräzipitation

50µl Dynabeads™ Protein G (Invitrogen) wurden nach einmaligem Waschen mit Ripa-Puffer in 4ml Ripa-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurden 20µg AK429 hinzugegeben und die Suspension wurde eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Die Suspension wurde mit dem Ripa-Zelllysate gemischt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit Ripa-Puffer im Magnetständer wurden das Pellet in 50µl Lämmli-Puffer aufgenommen, bei 60°C für 20 Minuten denaturiert und mit einem Ultraschallhomogenisator (Bandelin Sonoplus HD2200; Bandelin Electronic) geschert (10x1s, 31% Intensität). Im Anschluss wurden die Proben bei Bedarf mit 33% Iodacetamid versetzt und noch einmal mit dem Ultraschall-Homogenisator geschert. Die Zugabe von Iodacetamid hatte den Zweck, eine Präzipitation von TRPV6

vorzubeugen, bzw. zu beheben. In verschiedenen Vorexperimenten hatte sich dieses Phänomen gezeigt.

3.2.5 Western-Blot der Immunpräzipitation

Die Proben wurden in Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gelen (Thermo Scientific™) unter Verwendung eines NuPAGE MOPS SDS Running Buffers (Invitrogen) aufgetrennt. Die bei der Gelelektrophorese angelegte Spannung wurde nach 15 Minuten von 80V auf 200V gesteigert. Die aufgetrennten Proteine wurden mit einem TransBlot Turbo Transfer System (BioRad) unter Nutzung des Programmes „High Molecular Weight“ mit Transferpuffer (3.1.3) auf eine Nitrocellulose-Membran (BioRad) transferiert. Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten mit Ponceau-Rot gefärbt, mit H₂O wieder entfärbt und beschriftet. Die Membran wurde mit 5% Magermilch/TBS für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurde die Magermilch verworfen und der erste Antikörper in der angegebenen Konzentration (3.1.7) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten à zehn Minuten mit TBS (3.1.3) wurde der zweite Antikörper in 5% Magermilch für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten à zehn Minuten mit TBS (3.1.3) wurde die Membran für eine Minute in insgesamt 5ml ECL-Lösung (3.1.3) in einem Hybridisierungsbag inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal mit einem LAS3000 Imaging System (Fuji) detektiert. Für die nochmalige Inkubation mit einem anderen Primärantikörper wurde die Membran vorher für 30 Minuten bei 50°C mit Stripping-Puffer (3.1.3) inkubiert und fünf Mal für fünf Minuten mit TBS (3.1.3) gewaschen.

3.2.6 Massenspektrometrie

3.2.6.1 Aufbereitung von Proben der Immunpräzipitation und Zelllysaten für die massenspektrometrische Analyse

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden 40µl der Laemmli Eluate nach der Immunpräzipitation auf ein NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung wurde in den ersten 15 Minuten bei 80V und anschließend bis zur gewünschten Migrationsstrecke bei 200V durchgeführt. Die „IP“-Proben war die Migrationsstrecke im Gel ca. 2cm, für die „Proteom“-Proben lag die Migrationsstrecke bei ca. 8cm. Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten bei RT mit Fixierlösung (3.1.5) fixiert, dreimal in H₂O gewaschen und mit Blue Silver Färbelösung (3.1.5) für 45 Minuten gefärbt. Das Gel wurde mit H₂O entfärbt und gescannt (Epson). Schließlich wurde jede Probe für die IP in vier Banden, für die Proteom-Analyse in 16 Banden aufgeteilt. Jede Probe wurde jeweils zwei Mal mit Lösung A (3.1.5) und Lösung B (3.1.5) gewaschen. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proben für 30

Minuten bei 56°C in Reduktionslösung (3.1.5) inkubiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke für 30 Minuten bei RT in Dunkelheit in Alkylierungspuffer inkubiert, um die freien Thiolgruppen der Cysteinreste zu alkylieren. Die Proben wurden nochmal jeweils zwei Mal mit Lösung A (3.1.5) und Lösung B (3.1.5) gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac) bei 40°C getrocknet. Für den Proteinverdau wurden die Gel-Stücke über Nacht bei 37°C in je 20µl Sequencing Grade Trypsin (3.1.5) inkubiert. Die Peptide wurden mit 20µl Extraktionspuffer (3.1.5) zwei Mal zehn Minuten im Ultraschallbad aus dem Gel extrahiert und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Die Peptide wurden mittels Vakuum Zentrifugation (Savant SpeedVac) konzentriert und in 20µl 0,1% Ameisensäure aufgenommen. Die Probe wurde für fünf Minuten RT bei 16162x g zentrifugiert. 18µl des Überstandes wurden in für Autosamplergereignete Glasgefäße (Macherey-Nagel GmbH) überführt und mit einem Bördelverschluss (Macherey-Nagel GmbH) verschlossen. Die Proben wurden entweder direkt gemessen oder bei -20°C eingefroren.

3.2.6.2 Massenspektrometrische Messung

Jede Probe der Immunpräzipitation bestand aus vier Banden, aus denen die Proteine für die Analyse vorbereitet wurden. Nach dem tryptischen Verdau der Gelbanden wurden die Peptide extrahiert und in vier Glasvials überführt. Jede Probe der Proteom Analyse bestand aus 16 einzelnen Analysen der tryptischen Peptide die aus einer Probe, das heißt aus 16 Banden, generiert wurde. Der erste Schritt der Analyse bestand in der Aufnahme von jeweils 6µl einer Probe durch den Autosampler (RS-Autosampler Ultimate3000, Thermo Scientific™) und der anschließenden chromatographischen Reinigung und Trennung der Peptide über C18 Säulen (Nano Viper Acclaim PepMap100C18, 3µm, Dionex). Als mobile Phase dienten Fließmittel A/B (2.1.5). Im Laufe der Messung wurde der Anteil des organischen Fließmittels (Fließmittel B) kontinuierlich erhöht, um die Peptide ihrer Polarität entsprechend aufzutrennen. Je länger sich der Zeitraum der kontinuierlichen Erhöhung des organischen Fließmittels erstreckt, desto besser werden die Peptide aufgetrennt und desto genauer kann man die Probe mit der Massenspektrometrie untersuchen. In der nachfolgenden Arbeit wurde der Messzeitraum von 94 Minuten gewählt, die Flussrate der mobilen Phase betrug 200nl/Minute mit einer Zusammensetzung von 96 % Fließmittel A und 4% Fließmittel B, mit anschließender linearer Erhöhung von Fließmittel B mit einhergehender Reduzierung von Fließmittel A mit einer Endzusammensetzung von 4% Fließmittel A und 96% Fließmittel B. Nach dem die Probe die UHPLC-Einheit passiert hatte wurde sie der Elektrosprayionisation zugeführt. Diese Einheit bestand aus einer Nano-Kapillare (PicoTipEmitter Silica Tip, 30µm, New Objective), an welche eine Spannung von 2.2kV angelegt wurde, um die Peptide in den Eingang des Massenspektrometers zu beschleunigen.

Die Peptidionen wurden mit Hilfe eines LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometers analysiert, wobei die intakte Peptidmasse und nach Fragmentierung die daraus resultierende Fragmentationen auf Basis ihrer m/z Verhältnisse in der linearen Ionenfalle und dem Orbitrap Analysator detektiert wurden. Der Messbereich (m/z) lag zwischen 300-1700. Die Messungen erfolgten unter Leitung von Frau Dr. C. Fecher-Trost am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (UdS).

3.2.6.3 Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten

Die massenspektrometrischen Messdaten wurden mit der Software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific™) und dem Mascot Algorithmus analysiert (Version 2.4.0, Thermo Scientific™). Dazu wurden die Messdaten mit einer SwissProt_2013_2018-Datenbank, spezifiziert für *Homo sapiens* unter Annahme der Nutzung von Trypsin als Enzym analysiert. Des Weiteren wurde Mascot mit einer Fragment-Ionen-Massentoleranz von 0,50 Da und einer Mutterionen-Toleranz von 7,0 ppm erlaubt. Die Carbamidomethylierung von Cystein wurde als feste Modifikation, die Deamidierung von Asparagin und Glutamin, Oxidation von Methionin und Acetylierung von Lysin und dem n-Terminus wurden als variable Modifikationen zugelassen. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der Proteome Discoverer/Mascot Suche in Form der sogenannten dat.-files, in die Software Scaffold (Scaffold_5.0.1, Proteome Software Inc.) zur weiteren Analyse von MS/MS-basierten Peptid- und Proteinidentifizierungen geladen. Dafür wurden alle dat.-files einer Probe mit Hilfe der MudPIT-Funktion zu einer Probe zusammengefasst. Für die Peptididentifizierung in Scaffold wurde eine Signifikanzgrenze von 90% festgelegt. Die Signifikanzgrenze für Proteine lag bei 95%. Damit ein Protein als identifiziert galt, mussten mindestens zwei spezifische Peptide identifiziert werden. Diese Einstellung wurde nur für die Detektion kurzer Proteine in ein spezifisches Peptid/Protein geändert. Sämtliche statistischen Auswertungen wurden mit dem Students-t-Test durchgeführt. Venn-Diagramme wurden mit Scaffold oder unter Zuhilfenahme der Webseite „Bioinformatics & Evolutionary Genomics“ [158] der Universität Gent generiert. Die Kategorisierung der Daten erfolgte mit dem Protein Analysis Trough Evolutionary Relationships Classification System (PANTHER, [87]), einem Teilprogramm des Gene Ontology Phylogenetic Annotation Projects (GO-Terms).

3.2.7 Bewo Schnellfärbung

Für Versuche mit unterschiedlichen $[Ca^{2+}]$ wurden Bewo-Zellen in gleicher Konfluenz auf zuvor mit Poly-L-Lysin-beschichteten Glasplättchen ($\varnothing = 1,2\text{cm}$; ORSAtec) nach in 3.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Für Versuche mit Forskolin wurden Bewo- und Jeg3-Zellen in Zellkulturschalen (Falcon, $\varnothing 35\text{mm}$) nach in 3.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach

24 Stunden wurde das Medium gewechselt um die in Tabelle 3 angegebenen $[Ca^{2+}]$ oder eine Forskolin Konzentration von $30\mu M$ einzustellen. Als Negativkontrolle diente die entsprechende DMSO-Kontrolle ohne Forskolin/EDTA. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Glasplättchen mit einem Haema Schnellfärbekitt (Lehmann) nach Herstellerangaben gefärbt. Dafür wurden die Glasplättchen je fünf Mal für eine Sekunde in Methanol fixiert, in Eosin Färbelösung und anschließend in Azur Färbelösung getaucht. Die Glasplättchen wurden direkt im Anschluss der Färbung ohne Eindeckelmedium und Deckglas mikroskopiert und fotografiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop (Axio Imager M2, Zeiss) mit einer Farbkamera (Axiocam MRc, Zeiss) durchgeführt und unter Verwendung einer Analysesoftware (AxioVision, Zeiss) ausgewertet.

Tabelle 3 Errechnete Ca^{2+} -Konzentrationen des Zellkulturmediums für Bewo-Zelllinien (Vorgehen bei Berechnung siehe 2.2.1, Zusammensetzung des Mediums siehe 2.1.1).

EDTA-Konzentration im Medium (in mM)	Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]$) im Medium nach EDTA Zugabe (in mM)
0,0	0,65
0,2	0,45
0,3	0,35
0,4	0,25
0,5	0,15
1,0	$1,0 \cdot 10^{-7}$

3.2.8 Immunzytochemie

Die Zellen wurden gemäß den in 3.2.1 genannten Bedingungen auf Glasplättchen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde wie in 3.2.1 beschrieben, ein Mediumwechsel mit Forskolin durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen vier mal mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung (3.1.4) fixiert. Nach weiterem Waschen mit PBS und Blocking-Puffer (3.1.4) bei RT für eine Stunde wurden die Zellen in Primärantikörperlösung (3.1.4) bei $4^{\circ}C$ über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal für zehn Minuten mit PBS gewaschen und für zwei Stunden bei RT und Dunkelheit in Sekundärantikörperlösung (3.1.4) inkubiert. Nach weiterem Waschen wurden die Zellen in Immumount (Thermo Fisher) aufgenommen und für mindestens 30 Minuten getrocknet. Die Proben wurden entweder direkt im Anschluss mikroskopiert oder bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Die Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop (Axio Imager M2, Zeiss) unter Verwendung einer Lichtquelle (HXP 120C, Pulch und Lorenz) angefertigt. Nach Anregung mit monochromatischem Licht erfolgte die Detektion der blauen (DAPI) und grünen (Alexa488/eGFP) Fluoreszenzsignale mit den jeweiligen Filtern (461nm und 516nm).

3.2.9 Kalzium Imaging

Zellen wurde auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen ($\varnothing = 2,5\text{cm}$; ORSAtec) kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit 2ml Medium pro Zellkulturschale, die Transfektion (3.2.1) erfolgte direkt im Anschluss. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen gemessen. Dafür wurde den Zellkulturschalen $5\mu\text{l}$ FURA-2-AM-Lösung (3.1.6) hinzugefügt. Nach 30 Minuten Beladungszeit unter Zellkulturbedingungen (3.2.1) wurden die Zellen dreimal mit Puffer 1 (3.1.6) gewaschen. Anschließend wurden $200\mu\text{l}$ Puffer 1 (3.1.6) in der Badkammer belassen. Vor dem Start der Messung wurden die Zellen mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 360nm visualisiert, so das entsprechende Regions of Interest (ROIs) in den Zellkörpern definiert werden konnten. Sofern eine Transfektion erfolgte, wurden die Zellen unter Verwendung eines GFP-Filters mit einer Wellenlänge von 480nm angeregt, ROIs wurden dann anhand der grünen GFP-assoziierten Signale definiert. Alle Messungen hatten eine Mindestanzahl von 30 ROI's. Nach Definition der ROIs erfolgte der Start der Messung. Die Messung wurde immer mit einem FURA-2-AM-Filter durchgeführt. Die Fura-2-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von $>510\text{nm}$ wurden nach Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 340 und 380nm für jeweils 30ms bei einer Rate von 1 Hertz über eine Gesamtmessdauer von 1200s (= 20 Minuten) erfasst. 120s nach Start der Messung wurde $200\mu\text{l}$ Puffer 2 A/B (3.1.6) in die Badkammer gegeben. 360s nach Messstart wurde $100\mu\text{l}$ EDTA-haltiger Puffer 3 (3.1.6) hinzugegeben, um intrazelluläre Kalziumspeicher zu entleeren. 660s nach Messstart wurde $500\mu\text{l}$ von Kalziumreichem Puffer 4 (3.1.6) in die Badkammer gegeben, um ein möglichst starkes Kalziumsignal detektieren zu können. Die Puffer wurden mit einer Pipette direkt auf die zu messenden Zellen appliziert. Zur Detektion wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss) mit $20\times$ Objektiv (Zeiss Fluor $20\times/075$; Zeiss) genutzt, welches an einen Fast-switching Monochromator (Polychrom V, T.I.L.L. Photonics) gekoppelt wurde. Die Aufnahme wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera (SensiCam; PCO) durchgeführt. Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Messdaten bestanden aus dem Hintergrund korrigierten Verhältnis der Fluoreszenzen nach Anregung mit 340 oder 380nm (F340/F380), welche gegen die Zeit aufgetragen wurden. Daten wurden mit TillVision (Fei Software) erfasst und in Excel (Microsoft) gespeichert. Auswertungen der Daten wurden unter Zuhilfenahme der Programme Excel (Microsoft) und Prism 9 (GraphPad Software) vorgenommen. Datensätze wurde von Messfehlern bereinigt und gruppiert. Statistische Auswertungen wurden mit Students t-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von TRPV6 in Bewo und Jeg3-Zelllinien

Zunächst wurde untersucht, ob das TRPV6 Protein in den beiden Chorionkarzinom Zelllinien (Bewo und Jeg3) exprimiert wird. Hierzu wurden verschiedene Immunpräzipitationen mit dem Antikörper 429 (polyklonal Kaninchen), der gegen den C-Terminus des TRPV6 Proteins gerichtet ist, durchgeführt (Abb. 6). Die Detektion des TRPV6 Proteins (MW 87kD) erfolgte entweder mit AK429 (Abb. 6A) oder dem AK20C6 (monoklonal, Maus, Abb. 6B). Die in Abbildung

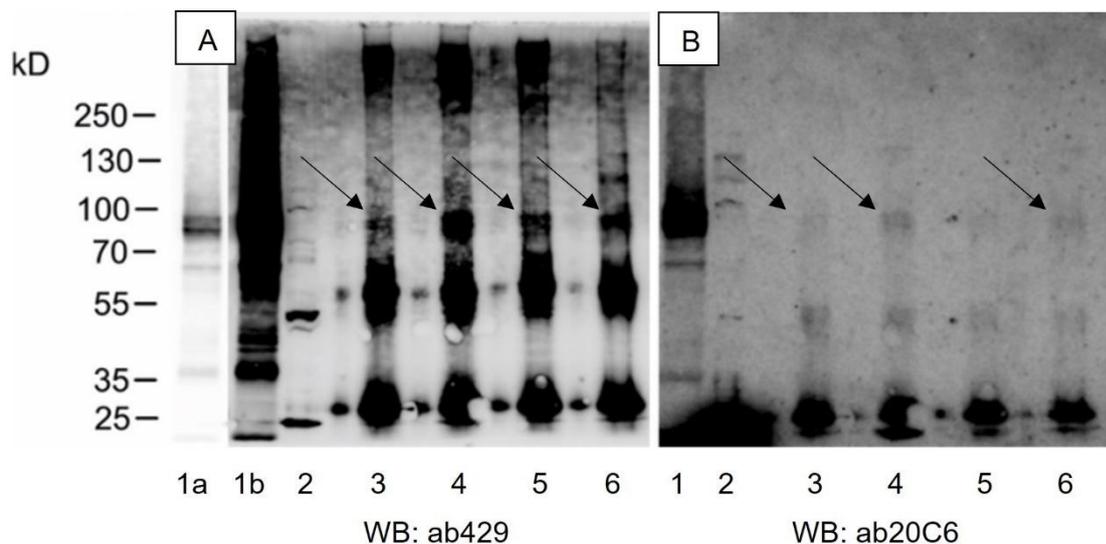


Abbildung 5 Nachweis des TRPV6 Proteins in Bewo- und Jeg3-Zellen nach Immunpräzipitation und anschließender Western-Blot-Analyse. 1. a/b COS TRPV6vl 1:100 10 μ l 2. COS leer 10 μ l 3. IP 1 Bewo mit AK429 4. IP 2 Jeg3 mit AK429 5. IP 3 Bewo mit AK429 6. IP 4 Jeg3 mit AK429 Der Pfeil zeigt die zu TRPV6 zugehörige Bande an. Die Proteinkonzentrationen unterscheiden sich unter den Proben (3 IP Bewo mit 1,45mg Protein; 4 IP Jeg3 mit 2,88mg Protein) und sind somit nicht vergleichbar A) Antikörper 429, 1a/b zeigt die Positivkontrolle von TRPV6 bei unterschiedlicher Belichtungszeit B) Antikörper 20C6.

5 gezeigten Banden bei 50kD und 25kD in A stellen die schweren und leichten Ketten des AK429 dar. Die Immunglobuline von AK429 (aus dem Kaninchen) befinden sich in der Probe und wurden bei Zugabe des Zweitantikörpers, der gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet ist (Tabelle 2), im Western-Blot detektiert. Dieser Effekt ist in Abbildung 5 B deutlich vermindert, weil hier bei Inkubation ein anti-TRPV6-Antikörper aus der Maus als erster Antikörper und ein Anti-Mouse-HRP (Tabelle 2) als zweiter Antikörper verwendet wurde, welcher vor allem die schweren IgG Ketten (MW: 50-55kD), die von AK429 stammen, weniger gut detektiert. Die kurzen Antikörper-Ketten von AK429 weisen eventuell eine höhere Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Spezies auf und werden deshalb trotzdem zu einem gewissen Anteil von dem gegen die Maus gerichteten Sekundärantikörper detektiert. Außerdem werden in Abbildung 5A Banden aus größeren Proteinen >250kD detektiert. Diese stellen eventuell Multimere des TRPV6-Proteins dar.

IP Jeg3

TRPV6_HUMAN (100%), 87,289.2 Da

Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPV6 PE=1 SV=3
3 exclusive unique peptides, 3 exclusive unique spectra, 6 total spectra, 35/765 amino acids (5% coverage)

MGPLQGDGGP	ALGGADVAPR	LSPVVRVWPRP	QAPKEPALHP	MGLSLPKEKG	LILCLWSKFC
RWFQRRESWA	QSRDEQNLLQ	QKR IWESPLL	LAAK DNDVQA	LNKLLKYEDC	KVHQRGAMGE
TALHIAALYD	NLEAAMVLM	AAPELVFPEM	TSELYEGQTA	LHIAVFNQNM	NLVRALLARR
ASVSARATGT	AFRRSPCNLI	YFGEHPLSFA	ACVNSEEIVR	LLIEHGADIR	AQDSLGNLTVL
HILILQPNKT	FACQMYNLLL	SYDRHGDHLQ	PLDLVFNHQQ	LTPFKLAGVE	GNTVMFQHLM
QKRKHTQWTY	GPLTSTLYDL	TEIDSSGDEQ	SLELEIITTK	KREARQILDQ	TPVKELVSLK
WKRYGRPYFC	MLGAIYLLYI	ICFTMCCIYR	PLKPRNTNRT	SPRDNLTLQ	KLLQEAYMTP
KDDIRLVGEL	VTVIGAI IIL	LVEVPDIFRM	GVTRFFGQTI	LGGPFHVLI	TYAFMVLVTM
VMRLISASGE	VVPMSFALVL	GWCNVMYFAR	GFQMLGPFTI	MIQKMIFGDL	MRFCWLMVAV
ILGFASAFYI	IFQTEDPEEL	GHFYDYPMAL	FSTFELFLTI	IDGPANYNVD	LPFMYSIYA
AFAIIATLLM	LNLLIAMMGD	THWRVAHERD	ELWR AQIVAT	TVMLER KLPR	CLWPRSGICG
REYGLGDRWF	LRVEDRQDLN	RQRIQRYAQA	FHTR GSEDL	KDSVEK LLELG	CPFSPHLSLP
MPSVSRSTSR	SSANWERLRQ	GTLRRDLRGI	INRGLLEDGES	WEYQI	

IP Bewo

TRPV6_HUMAN (100%), 87,289.2 Da

Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPV6 PE=1 SV=3
2 exclusive unique peptides, 2 exclusive unique spectra, 3 total spectra, 23/765 amino acids (3% coverage)

MGPLQGDGGP	ALGGADVAPR	LSPVVRVWPRP	QAPKEPALHP	MGLSLPKEKG	LILCLWSKFC
RWFQRRESWA	QSRDEQNLLQ	QKR IWESPLL	LAAK DNDVQA	LNKLLKYEDC	KVHQRGAMGE
TALHIAALYD	NLEAAMVLM	AAPELVFPEM	TSELYEGQTA	LHIAVFNQNM	NLVRALLARR
ASVSARATGT	AFRRSPCNLI	YFGEHPLSFA	ACVNSEEIVR	LLIEHGADIR	AQDSLGNLTVL
HILILQPNKT	FACQMYNLLL	SYDRHGDHLQ	PLDLVFNHQQ	LTPFKLAGVE	GNTVMFQHLM
QKRKHTQWTY	GPLTSTLYDL	TEIDSSGDEQ	SLELEIITTK	KREARQILDQ	TPVKELVSLK
WKRYGRPYFC	MLGAIYLLYI	ICFTMCCIYR	PLKPRNTNRT	SPRDNLTLQ	KLLQEAYMTP
KDDIRLVGEL	VTVIGAI IIL	LVEVPDIFRM	GVTRFFGQTI	LGGPFHVLI	TYAFMVLVTM
VMRLISASGE	VVPMSFALVL	GWCNVMYFAR	GFQMLGPFTI	MIQKMIFGDL	MRFCWLMVAV
ILGFASAFYI	IFQTEDPEEL	GHFYDYPMAL	FSTFELFLTI	IDGPANYNVD	LPFMYSIYA
AFAIIATLLM	LNLLIAMMGD	THWRVAHERD	ELWR AQIVAT	TVMLER KLPR	CLWPRSGICG
REYGLGDRWF	LRVEDRQDLN	RQRIQRYAQA	FHTR GSEDL	KDSVEK LLELG	CPFSPHLSLP
MPSVSRSTSR	SSANWERLRQ	GTLRRDLRGI	INRGLLEDGES	WEYQI	

Abbildung 6 Nachweis von TRPV6 in Jeg3- und Bewo-Zellen mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Die gelb-markierten Bereiche beschreiben die detektierten Aminosäuresequenzen. Eine grüne Markierung der Aminosäuren beschreibt eine Detektion der Aminosäure im oxidierten Zustand.

Zusätzlich zur Western-Blot-Analyse wurden die Eluate der Immunpräzipitationen massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 6 zeigt den Nachweis von mehreren tryptischen Peptiden in TRPV6 Proteins in Jeg3- und Bewo-Zellen. Das Ergebnis zeigt, dass die im Western-Blot detektierbaren Banden TRPV6 zugeordnet werden können.

4.2 Untersuchung des Einflusses von verminderten extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen ($[Ca^{2+}]$) auf Bewo und Jeg3-Zelllinien

4.2.1 Effekt von $[Ca^{2+}]$ auf Konfluenz und Morphologie

Wie in 2.3.1.4 erörtert, ist TRPV6 am Transport von Kalzium über die Trophoblasten in der Plazenta beteiligt. Es galt zu untersuchen, welche Funktion TRPV6 in den beiden humanem Chorionkarzinom-Zelllinien (Bewo und Jeg3) einnehmen könnte, die Modellzellen für humane Trophoblasten darstellen.

Dazu wurden die beiden Chorionkarzinom-Zelllinien in Zellkulturmedium mit erniedrigter $[Ca^{2+}]$ kultiviert. Die Zellen wurden dazu in gleicher Zellzahl ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit Medium mit verschiedenen $[Ca^{2+}]$. Nach weiteren 48 Stunden wurden Bewo Zellen mittels Pappenheim-Staining gefärbt und mikroskopiert (Abbildung 7). Weiterhin

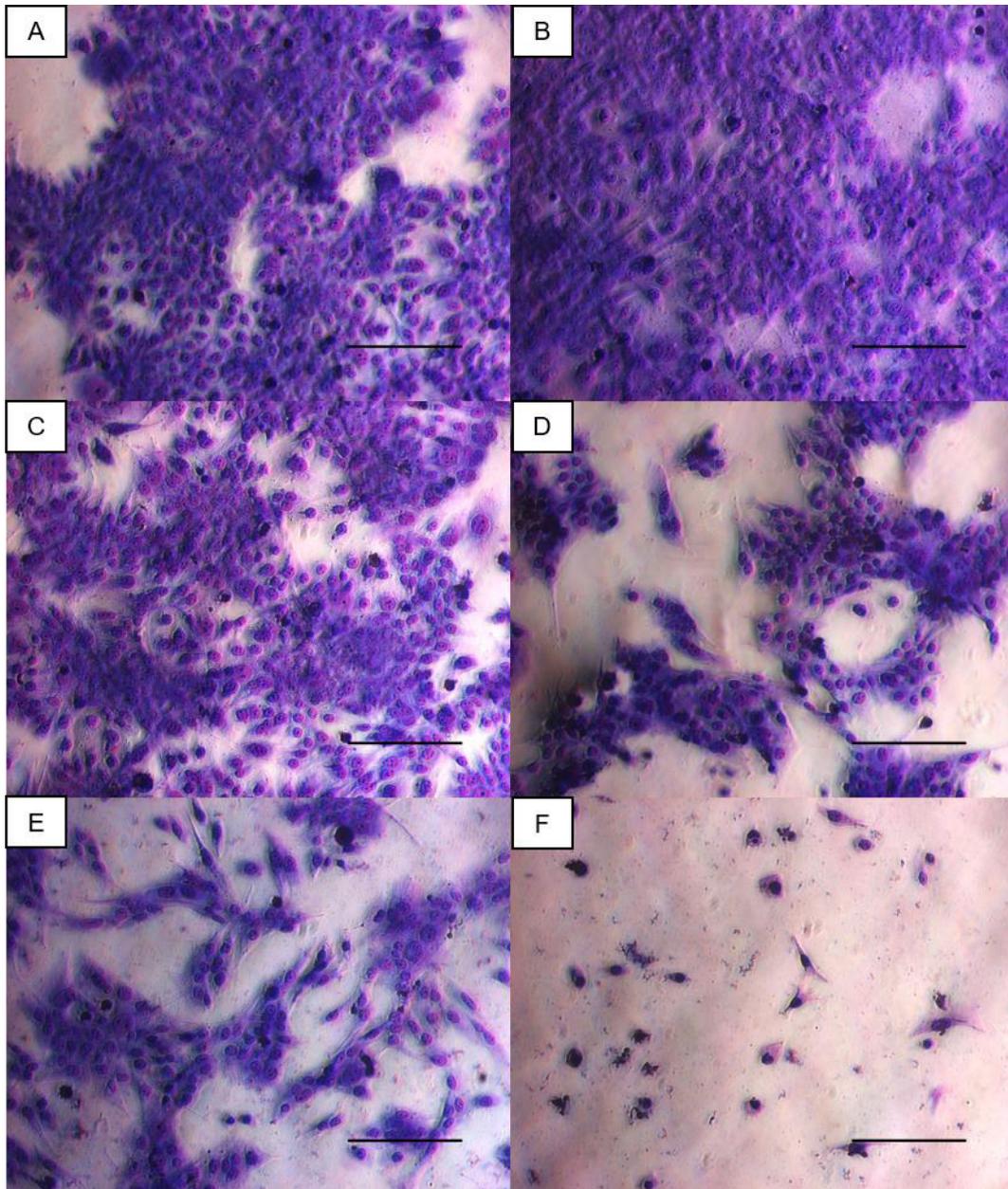


Abbildung 7 Bewo-Zelllinie im Pappenheim-Staining; Veränderung der Morphologie und Konfluenz mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration im Medium nach 48 Stunden. A) 0,65mM Ca^{2+} B) 0,45mM Ca^{2+} C) 0,35mM Ca^{2+} D) 0,25mM Ca^{2+} E) 0,15mM Ca^{2+} F) 0,1nM Ca^{2+} ; Maßstabsbalken entspricht 200 μ M; n=3

wurden Zelllysate für die weitere massenspektrometrischen Analyse hergestellt. Die Kultivierung der Zellen bei reduzierter $[Ca^{2+}]$ dient als Modell um einen möglichen Einfluss des TRPV6 Proteins auf die Kalziumhomöostase der Bewo Zellen zu analysieren. Es sollte geprüft werden, ob das Modell für Untersuchungen des placentaren Kalziumtransportes und placentare pathophysiologische Fragestellungen genutzt werden kann.

Wie in Abbildung 7 gezeigt ändert sich die Morphologie von Bewo-Zellen abhängig von der $[Ca^{2+}]$. Ab einer $[Ca^{2+}]$ unterhalb von $0,35mM Ca^{2+}$ verringert sich die Anzahl der adhärennten Zellen drastisch, so dass eine Proteom-Analyse nicht mehr möglich gewesen wäre. Des Weiteren zeigen die Zellkörper bei abnehmender $[Ca^{2+}]$ eine Veränderung der Morphologie. Die Zellkörper bilden längliche Strukturen und bilden scheinbar ungerichtet spitz zulaufende Zellfortsätze (Abb. 7 C, E). Daher wurden für die weitergehende Analyse der Bewo-Zelllinien mittels massenspektrometrischer Untersuchung eine $[Ca^{2+}]$ von $0,35mM Ca^{2+}$ genutzt. Die verwendete $[Ca^{2+}]$ des Zellkulturmediums für Jeg3-Zellen von $1,37mM Ca^{2+}$ basiert auf Beobachtungen aus Vorversuchen.

4.2.2 Analyse des Proteoms der Bewo- und Jeg3-Zelllinien in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration

Im Nachfolgenden wurde das Proteom der Bewo- und Jeg3-Zellen untersucht. Abbildung 8 und 9 zeigen den Vergleich der Proteome zwischen der Gruppe mit normaler $[Ca^{2+}]$ und einer erniedrigten $[Ca^{2+}]$ beider Zelllinien.

Die als normal definierte extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ beträgt $0,65mM Ca^{2+}$ für Bewo- und $1,97mM Ca^{2+}$ für Jeg3-Zelllinie. Die Konzentrationen ergeben sich aus der Analyse des Mediums. Diese höheren Konzentrationen werden im nachfolgenden als normale $[Ca^{2+}]$ bezeichnet. Die $[Ca^{2+}]$ von $0,35mM Ca^{2+}$ in Bewo Zelllinien und $1,37mM Ca^{2+}$ in Jeg3 Zelllinien werden im nachfolgenden als niedrige $[Ca^{2+}]$ bezeichnet.

Abbildung 8 zeigt, dass bei der massenspektrometrischen Analyse der Bewo-Zellen 2501 Proteine identifiziert werden konnten. In Bewo-Zellen mit normaler $[Ca^{2+}]$ wurden insgesamt 2108 Proteine identifiziert. Davon wurden 948 Proteine in allen vier Proben, inklusive technischem Replikat, identifiziert. Bei Bewo-Zellen mit reduzierter $[Ca^{2+}]$ wurden 2210 Proteine identifiziert, davon wurden 1194 Proteine in allen drei Proben identifiziert. Die semiquantitative Auswertung basierend auf der identifizierten Spektrenzahl/Protein ergibt, dass Bewo-Zellen unter $[Ca^{2+}]$ -

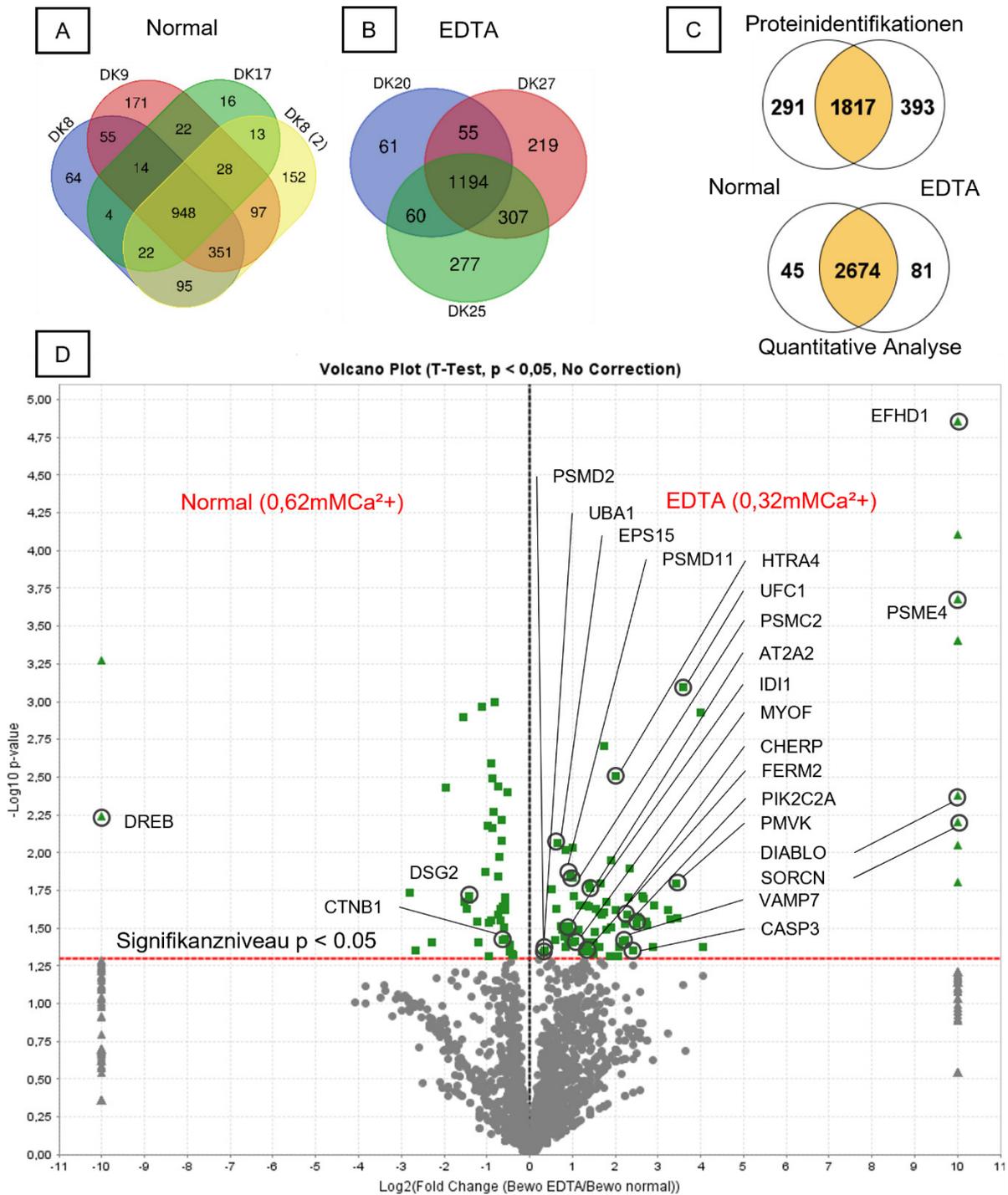


Abbildung 8 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellkulturen in niedrigen Kalzium-Bedingungen (0,32mM Ca^{2+}) vs. normaler Kalzium-Konzentration (0,62mM Ca^{2+}); A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK8, DK9, DK17, DK8 (2)) in normaler Kalzium-Konzentration (48 Stunden, $n=4$). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK20, DK27, DK25) in Medium mit verringerter Kalzium-Konzentration (48 Stunden, $n=3$). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von niedrig- vs. normal-Kalzium-Konzentration mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

reduzierten Bedingungen im Vergleich zur Normal- $[Ca^{2+}]$ 45 Proteine signifikant geringer und 81 Proteine vermehrt exprimiert werden (Abbildung 8).

Abbildung 9 zeigt, dass bei der massenspektrometrischen Analyse der Jeg3-Zellen 2576 Proteine identifiziert wurden. In Jeg3-Zellen mit normaler $[Ca^{2+}]$ wurden insgesamt 2252 Proteine

identifiziert. Davon wurden 983 Proteine in allen vier Proben identifiziert. Bei Jeg3-Zellen mit reduzierter $[Ca^{2+}]$ wurden 2178 Proteine identifiziert, davon wurden 874 Proteine in allen vier

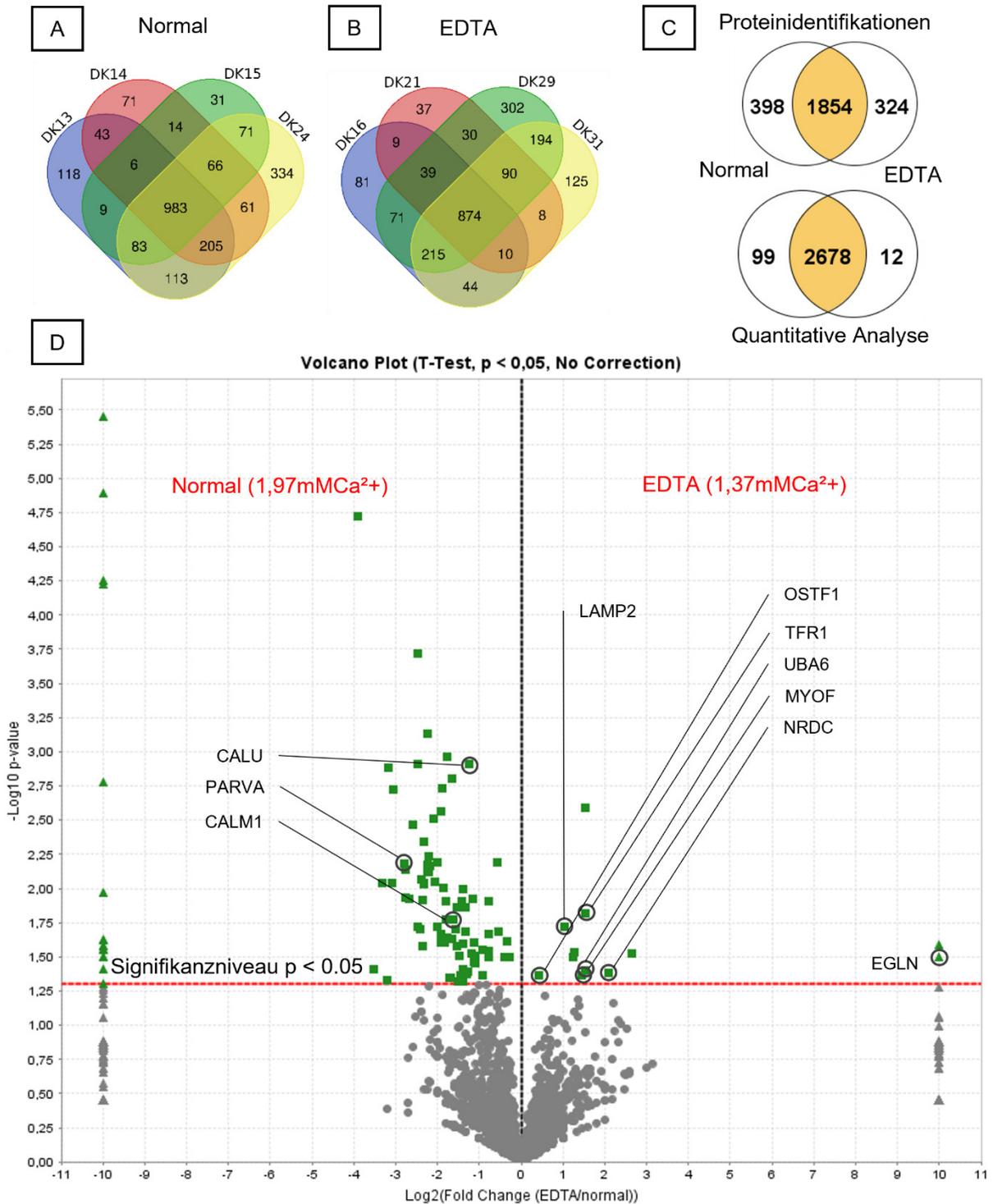


Abbildung 9 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3 Zellen in niedrigen Kalzium-Bedingungen ($1,37mM Ca^{2+}$) vs. normaler Kalzium-Konzentration ($1,97mM Ca^{2+}$); A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK13, DK14, DK15, DK24) in normaler Kalzium-Konzentration (48 Stunden, $n=4$). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK16, DK21, DK29, DK31) in Medium mit verringerter Kalzium-Konzentration (48 Stunden, $n=4$). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von niedrig- vs. normal-Kalzium-Konzentration mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Proben identifiziert. Nach quantitativer Auswertung der Proteinidentifikationen zeigen sich in

normaler $[Ca^{2+}]$ 99 Proteine signifikant verstärkt exprimiert, bei reduzierter $[Ca^{2+}]$ sind 12 Proteine signifikant verstärkt exprimiert.

Die abundanten Proteine wurden anschließend mit Panther Classification Systems (PCS) (3.2.6.3) bezüglich ihrer Gene Ontology (GO) Terms analysiert. Als erstes wird auf durch das PCS kategorisierte Proteine gemäß der Reihenfolge der Tabellen 4 und 5 eingegangen. Es folgt ein kurzer Abgleich der Kategorisierung des PCS mit der Literatur. Überdies werden Kategorien um signifikant abundante Proteine vervollständigt, die nicht durch das PCS kategorisiert werden, bei welchen sich aber Belege in der Literatur finden, die eine Kategorisierung rechtfertigen.

4.2.2.1 Das Proteom der Bewo-Zelllinie in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration

Die Proteine in Bewo-Zellen, die bei niedriger $[Ca^{2+}]$ abundanter bzw. weniger abundant sind, werden in fünf verschiedenen durch das PCS vorgeschlagene GO-Kategorien zugeordnet.

Tabelle 4 Vergleich der Bewo-Proteome nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration. Proteine die nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgt mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.

Gene Ontology Klassifikation (Panther)	Gene ID
Kalzium-Bindeprotein (<i>Kalzium binding protein</i>)	EFHD1, SORCN
Zellkontakt (<i>cell junction</i>)	DSG2, CTNB1, DREB, FERM2
Ubiquitin-Proteasom Signalweg (<i>ubiquitin-proteasome-pathway</i>)	UBA1, PSMC2, PSMC5, PSMD2, PSMD11
Cholesterinbiosynthese (<i>cholesterol biosynthesis</i>)	PMVK, IDI1
Apoptose-Signalweg (<i>apoptosis signaling pathway</i>)	DBLOH, MPRI, CASP3

Das PCS kategorisiert zwei Proteine in die Gruppe der Kalzium-Bindeproteine. Die Proteine EF-hand domain containing protein D1 (EFHD1) und Sorcin (SORCN) übernehmen Funktionen in der Ca^{2+} -Homöostase, wobei EFHD1 zudem als mitochondrialer Kalziumsensor fungiert [23,51,92]. Nicht von PCS kategorisiert, aber trotzdem von Bedeutung in Bezug auf ER-Signalwege werden die sarcoplasmatic/ endoplasmatic reticulum Kalzium ATPase2 (SERCA2, AT2A2) sowie das Kalzium homeostasis reticulum protein (CHERP), dass in Gegenwart niedriger $[Ca^{2+}]$ in Bewo-Zellen signifikant erhöht ist. SERCA2 ist eine Kalzium-Pumpe, die in Abhängigkeit von ATP Kalzium in das endoplasmatische Retikulum pumpt [16]. CHERP ist ein

im ER lokalisiertes Protein und hat Einfluss auf die Funktion verschiedener Kalzium-Kanäle, u. a. des Ryanodin-Rezeptors. Es ist am Kalzium-Signaling beteiligt [76].

Die drei Zellkontakt-assoziierten Proteine Desmoglein-2 (DSG2), Catenin Beta-1 (CTNNB1) und Drebrin (DREB) werden in Gegenwart normaler $[Ca^{2+}]$ vermehrt gebildet, wobei DSG2 an der Struktur von Desmosomen und CTNNB1 an der Struktur von Adhärenz-Junctions beteiligt sind [18,135]. Auch das Protein Drebrin (DREB, DBN1) könnte Funktionen in Cell-Junctions übernehmen, ist aber eher als Aktin-Bindeprotein bekannt und scheint funktionell eher in der Strukturierung des Zytoskeletts und der Membran zu agieren [126]. Das von GO-terms kategorisierte fermitin family homolog 2 (FERM2), welches in normaler $[Ca^{2+}]$ abundant ist, aktiviert Integrin-abhängige Signalwege. In der Literatur wird zudem gezeigt, dass FERM2 in extravillösen Trophoblasten Funktionen im Bereich der Migration und Invasion übernimmt [64].

Das PCS ordnet außerdem fünf Proteine aus der Gruppe der niedrigen $[Ca^{2+}]$ dem Ubiquitin-Proteasom Signalweg zu. Darunter sind verschiedene Bestandteile von Proteasomen. Es werden ausschließlich 26s Proteasomen gefunden, welche verschiedene Funktionen der Protein-degradation ubiquitinylierter Proteine übernehmen [22]. Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (UBA1) ist an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt, die der Degradation zugeführt werden sollen [129]. Die von PCS kategorisierten Proteasome-assoziierten Proteine PSMC2, PSMC5, PSMD2, PSMD11 sollen noch um PSMC3 vervollständigt werden, dass nicht von PCS in die Kategorie der Proteasen kategorisiert wird. Es gehört auch zu den Proteasom-assoziierten Proteinen [4]. Ebenso gehört der proteasome activator subunit 4 (PSME4) zu den in niedriger $[Ca^{2+}]$ detektierten Proteine [149]. Auch Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 (UFC1) [38] und E3-ubiquitin-protein ligase Listerin (LTN1) [60] sind Proteine in der Ubiquitin-Kaskade und werden detektiert. In normaler $[Ca^{2+}]$ wird lediglich eine Proteasom-beta-Untereinheit (PSB6, PSMB6) gefunden [123].

Zudem werden zwei in niedriger $[Ca^{2+}]$ abundante Proteine der Cholesterin-Biosynthese zugeordnet. Phosphomevalonat-Kinase (PMVK) sowie Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 1 (IDI1) sind Enzyme, welche wichtige Schritte der Mevalonatsynthese, der erste Teil der Cholesterinbiosynthese, katalysieren [6,102].

Drei Proteine werden dem Apoptose-Signalweg zugeordnet. Diablo (DBLOH, SMAC) induziert Apoptose und aktiviert gleichzeitig Apoptose-inhibierende Proteine (Inhibitor of apoptosis proteins ,IAP) [155]. Cation-independent mannose-6-phosphat receptor (MPRI, IGF2R) ist ein Rezeptor für insulin-like growth factor 2 (IGF2) und geht in Kontakt mit Proteinen, die mit Mannose-6-Phosphat markiert werden und bringt diese in die Lysosomen. In Bewo-Zellen hat IGF2R verschiedene Funktionen, unter anderem scheint die verstärkte Expression von IGF2R zum einen mit der Induktion von Apoptose-Signalwegen, zum anderen mit Induktion der Zellmigration und verstärktem Nährstofftransport über die Plazenta assoziiert zu sein [42].

Caspase-3 (CASP3) ist eine Protease, die im Zusammenhang mit Apoptosesignalwegen steht. Jedoch wird CASP3 auch mit verstärkter Migration und Invasion von Tumorzellen assoziiert. Es kann verschiedene Metalloproteasen aktivieren, die ihrerseits die Proteolyse extrazellulärer-Matrix-Proteine induzieren können [79].

Schließlich werden noch zwei Proteine in verminderter Kalziumkonzentration verstärkt exprimiert, die an Prozessen der Veränderung der Zellmorphologie beteiligt sein könnten. EPS15 moduliert das Zytoskelett und ist an Prozessen der Reparatur der Zellmembran beteiligt. Es interagiert unter anderem mit EFHD1 und Proteinen der Ferlin-Familie [26]. Myoferlin (MYOF) ist ein Membranprotein aus der Ferlin Familie. Es ist an Prozessen der Membranorganisation und Reparatur beteiligt und kann Proteine der extrazellulären Matrix degradieren [28].

Ebenso unter verminderter Kalziumkonzentration verstärkt exprimiert wird HTRA4. Die Serinprotease high-temperature requirement factor A4 (HTRA4) ist in der Lage Catenine und Cadherine zu degradieren und wird in Plazenten von Präeklampsie-Patienten vermehrt exprimiert [55,120,128].

4.2.2.2 Das Proteom der Jeg3-Zelllinie in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration

Die Proteine in Jeg3-Zellen, die bei niedriger $[Ca^{2+}]$ abundanter bzw. weniger abundant sind, werden drei verschiedenen durch das PCS vorgeschlagene GO-Kategorien zugeordnet.

Tabelle 5 Vergleich der Jeg3-Proteome nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration. Proteine die nach Inkubation in reduzierter Kalziumkonzentration vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.

Gene Ontology Klassifikation (Panther)	Gene ID
Kalzium-Bindeproteine (Kalzium binding protein)	CALM1, CALU, AIF1L
Zellkontakt (cell junction)	PARVA
Ubiquitin-Proteasom Signalweg (<i>ubiquitin-proteasome-pathway</i>)	UBA6

Insgesamt werden in Jeg3-Zelllinien drei Kalziumbindeproteine gefunden, welche alle in normaler $[Ca^{2+}]$ abundant sind. Calmodulin 1 (CALM1) gilt als universeller Kalzium Sensor, welcher in der Lage ist, TRPV6 bei hohen intrazellulären $[Ca^{2+}]$ zu inaktivieren [119]. Auch Calumenin (CALU) ist ein Kalziumbindeprotein, welches normalerweise sehr hoch in Trophoblasten exprimiert wird. Eine Runterregulation von CALU wird in Plazenten von Patientinnen mit wiederholtem Schwangerschaftsverlust (*recurrent pregnancy loss*) beschrieben [35]. Allograft Inflammatory Factor 1-like (AIF1L) ist ein mit Inflammation assoziiertes Protein, welches

hauptsächlich von Immunzellen produziert wird und Kalzium mit EF-Hand-Motiven binden kann [156].

Ein Zellkontakt-assoziiertes Protein ist in normaler $[Ca^{2+}]$ abundant. Alpha Parvin (PARVA) scheint dabei als Connector zwischen Integrin und dem aus Aktin bestehenden Zytoskelett zu agieren [103].

Das Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 (UBA6) ist in niedriger $[Ca^{2+}]$ signifikant erhöht und als Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom Signalweg an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt [38].

Überdies wird in Zellen mit Inkubation in verminderter Kalziumkonzentration die Zink-Peptidase Nardilysin (NRDC) vermehrt exprimiert. NRDC wird mit dem Wachstum von Tumoren assoziiert und scheint die Zell-Invasion von Tumorzellen zu fördern, indem es die Expression von Metalloproteasen MMP2 und MMP3 induziert, welche wiederum an der Degradation extrazellulärer-Matrix-Proteine beteiligt sind [134].

Im Vergleich zur Bewo Zelllinie finden sich in Jeg3-Zellen bei Kultivierung in reduzierter $[Ca^{2+}]$ keine signifikant veränderten exprimierten Proteine mit Assoziation zu Apoptose-Signalwegen oder der Cholesterinbiosynthese.

4.3 Untersuchung des Effektes von TRPV6 und eines potenziellen TRPV6-Antagonisten in Bewo-Zellen

Wie unter 4.1 gezeigt exprimieren Bewo-Zellen endogen das TRPV6-Protein. Im Folgenden soll ein möglicher Beitrag des TRPV6 Proteins bei Regulation der Kalziumhomöostase mittels Kalzium Imaging-Messungen untersucht werden. Dazu wurden wie in 3.2.9 beschrieben Bewo-Zellen mit einem TRPV6 enthaltenen Plasmid transfiziert und Kalzium-Imaging-Messungen durchgeführt. Dabei wurde ein Messprotokoll verwendet, das normalerweise zur Aktivierung von TRPV6-Kanälen in transfizierten Zellen führt [145]. Zudem wurde ein Blocker von TRPV6, die Substanz BlockV6 (von der AG Prof. Schäfer, Universität Leipzig), an Bewo-Zellen, die TRPV6 überexprimieren, untersucht. Es galt zu untersuchen, ob sich die Bewo-Zelllinie mit TRPV6 transfizieren lässt und ob sich ein Kalzium Signal von TRPV6 überexprimierenden Zellen mit BlockV6 inhibieren lässt. Weiterhin wurde untersucht, ob endogen exprimiertes TRPV6 messbar und ggf. mit BlockV6 inhibierbar ist.

4.3.1 Nachweis des TRPV6-Kanals nach transienter Transfektion von TRPV6-Plasmiden in Bewo-Zelllinien

Eine Transfektion von TRPV6 in Bewo-Zelllinien wurde bisher noch nicht beschrieben, daher war ungewiss, ob sich etwaige Versuche durchführen lassen. Wie in Abbildung 10 gezeigt unterscheiden sich die Fluoreszenzintensitäten der mit TRPV6-transfizierten Zellen (TRPV6 DMSO; TRPV6 BlockV6) deutlich von den mit Leer-Vektor, pCAGGS IHRES-GFP transfizierten Zellen (IGFP BlockV6; IGFP DMSO).

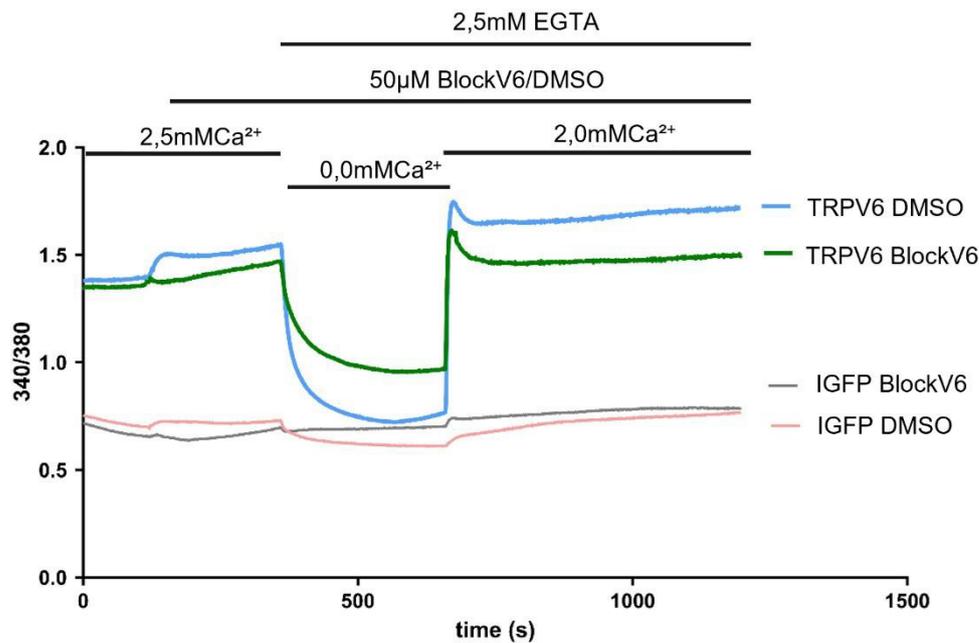


Abbildung 10 Kalzium-Imaging von TRPV6-transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) und der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) sowie nicht transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grau) und der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (rot) B. TRPV6 ohne Inhibitor: Anzahl der Transfektionen T=4, Anzahl der Versuche N=9, Anzahl der Zellen n=396, TRPV6 + BlockV6: T=3, N=9, n=328, Bewo + BlockV6: T=3, N=14, n=768, Bewo ohne Inhibitor: T=3, N=10, n=597

Der Quotient (F340/380) der Fluoreszenz, der ein Maß für die intrazelluläre Kalziumkonzentration darstellt, ist direkt zu Beginn der Messung bei den TRPV6 transfizierten Zellen in Anwesenheit von erhöhtem Kalzium in der Badlösung deutlich höher als in den Kontrollzellen, die nicht mit TRPV6 Plasmiden transfiziert wurden. Durch Zugabe von EGTA werden die Kalziumionen der Badlösung komplexiert, woraufhin die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den TRPV6 transfizierten Zellen innerhalb weniger Sekunden stark abnimmt, da sich die intrazellulären Kalziumspeicher entleeren. Dieser Effekt ist umkehrbar bei erneuter Zugabe von Kalzium. Nicht transfizierte Zellen zeigen praktisch keine Veränderung in der Fluoreszenz. Es ist also davon auszugehen, dass das TRPV6 Protein als funktioneller Kanal in der Plasmamembran exprimiert wird.

4.3.2 Untersuchung des TRPV6-Antagonisten BlockV6

Da die Expression des TRPV6 Proteins nach Transfektion in Bewo Zellen als Folge des starken Kalziumanstiegs eindeutig nachweisbar war, sollte untersucht werden, ob die Funktion des endogen exprimierten TRPV6 Ionenkanals durch den potenziellen Blocker ebenfalls verändert wird. Hierzu wurden wiederum Kalzium-Imaging-Messungen durchgeführt. Das Messschema ist ausführlich in 3.2.9 dargelegt. Abbildung 11 zeigt deutlich, das BlockV6 einen Effekt auf die Kalziumsignale der Bewo-Zelllinie hat.

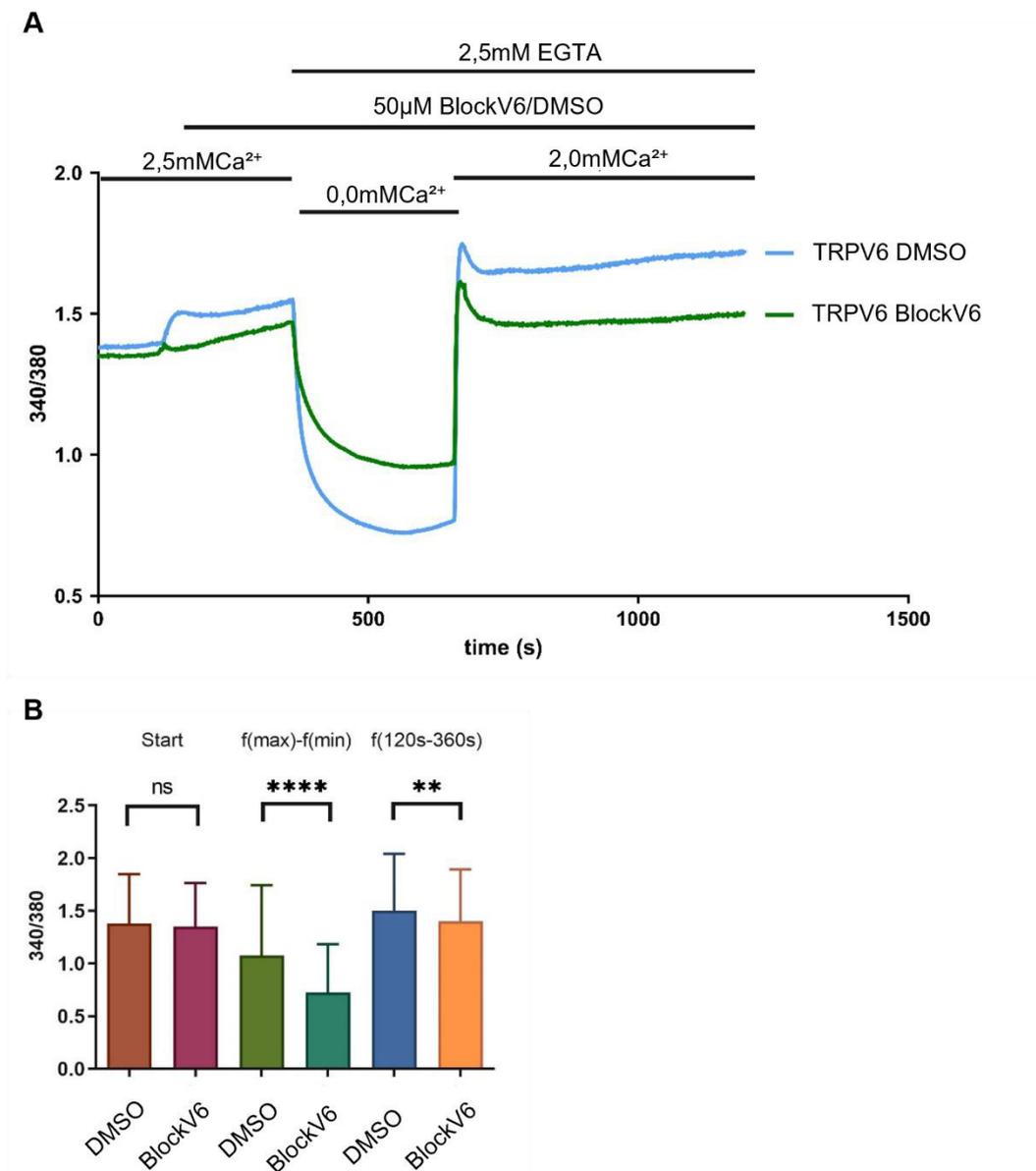


Abbildung 11 Kalzium-Imaging von TRPV6-transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) oder der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) B) Statistische Auswertung der Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt t0 (Start, dunkel-orange/rot), maximale Steigung zwischen t628 und t698 (f(max)-f(min), grün-dunkelgrün) sowie zwischen t120 und t360 (f120s-360s, blau-orange). TRPV6 ohne Inhibitor: Anzahl der Transfektionen T=4, Anzahl der Versuche N=9, Anzahl der Zellen n=396, TRPV6 + BlockV6: T=3, N=9, n=328

Nachdem vorher mit einem t-Test getestet wird, dass sich die Fluoreszenz zu Beginn der Messung nicht signifikant unterscheidet, ist es möglich den Effekt, den der Inhibitor BlockV6 hat, direkt zu erkennen. Eine Kalziumzugabe nach vorherigem Entleeren der Kalziumspeicher ($f(\max)-f(\min)$) führt zu einem signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Anwesenheit von BlockV6. Dieser Unterschied ist auf die inhibierende Wirkung von BlockV6 zurückzuführen. Nach Zugabe von BlockV6 im Zeitraum von 120s bis 360s des Messzeitraumes (Abbildung 11 A und B) zeigen Bewo Zellen ein signifikant geringeres Fluoreszenzsignal. Dieser Effekt wird in 5.3 im Detail erläutert.

4.3.3 Effekt von BlockV6 auf die endogene Ca-Konzentration in Bewo-Zellen

Nachdem ein Effekt von BlockV6 auf die $[Ca^{2+}]_i$ in mit TRPV6 transfizierten Zellen festgestellt werden kann, bestand der nächste Schritt in der Untersuchung des endogenen TRPV6 in Bewo-Zellen. Das TRPV6 von der Bewo-Zelllinie exprimiert wird ist in 4.1 gezeigt. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis untransfizierter Bewo-Zellen nach dem in 3.2.9 beschriebenen Messschema.

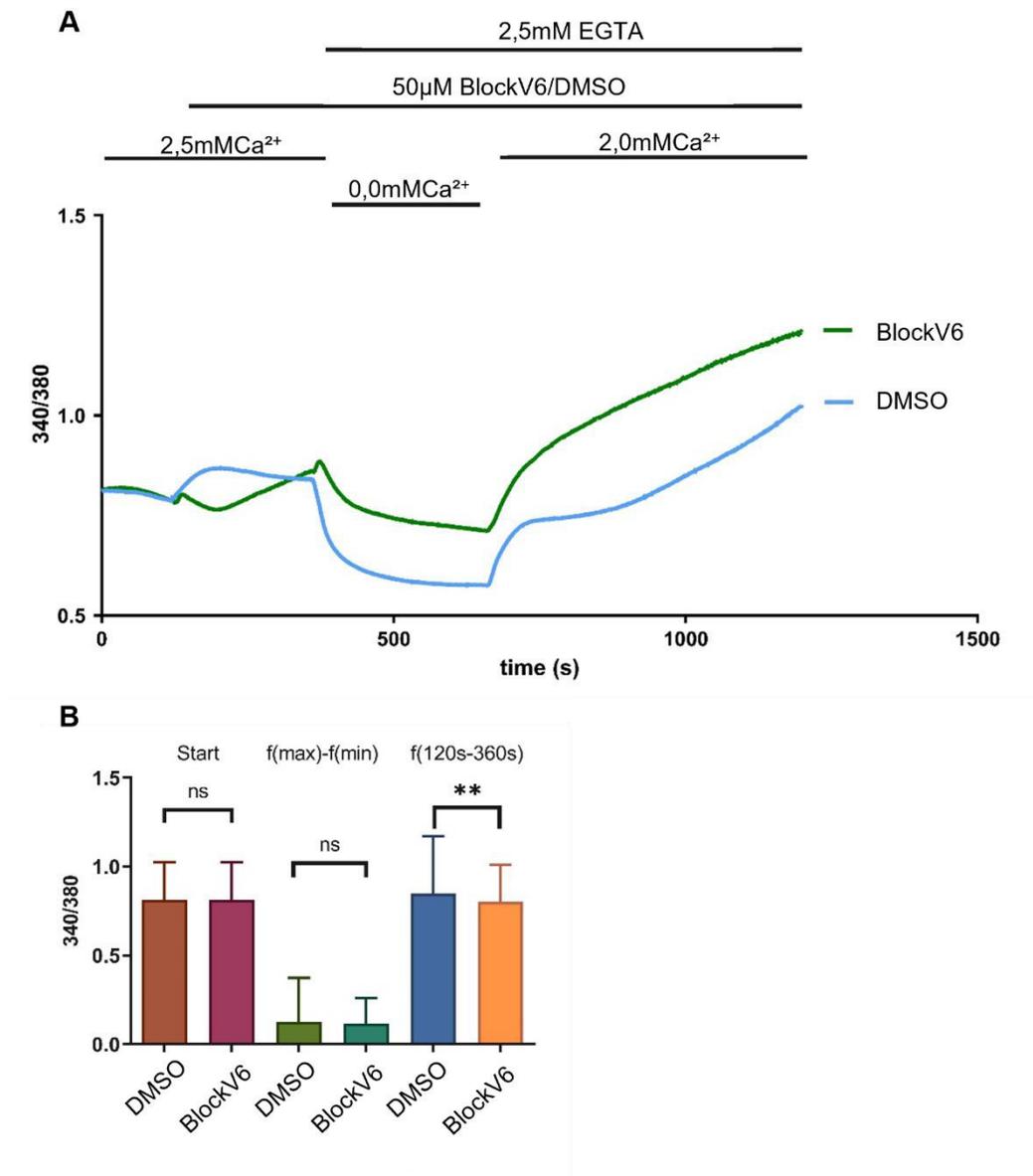


Abbildung 12 Kalzium-Imaging von nicht transfizierten Bewo-Zellen unter Einfluss von 50µM BlockV6 (grün) oder der dazugehörigen DMSO-Kontrolle (blau) B) Statistische Auswertung der Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt t₀ (Start, dunkel-orange/rot), maximale Steigung zwischen t₆₂₈ und t₆₉₈ (f(max)-f(min), grün-dunkelgrün) sowie zwischen t₁₂₀ und t₃₆₀ (f(120s-360s), blau orange). Bewo + BlockV6: Anzahl der Transfektionen T=3, Anzahl der Versuche N=14, Anzahl der Zellen n=768, Bewo ohne Inhibitor: T=3, N=10, n=597

Die basale Kalziumkonzentration zu Beginn der Messung ist nicht signifikant unterschiedlich und ermöglicht die direkte Vergleichbarkeit beider Kurven. Bei der Zugabe von Kalzium nach vorheriger Entleerung der Kalziumspeicher, in Abbildung 12 B als f(max)-f(min) beschrieben,

ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Steigung der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen der Bewo-Zelllinie mit BlockV6 und deren DMSO-Kontrolle. Ein Effekt von BlockV6 auf endogen von der Bewo-Zelllinie exprimiertes TRPV6 muss daher als unwahrscheinlich erachtet werden. Nach Zugabe von BlockV6 nach 120s (Abbildung 12 A,B) ergibt sich ein signifikanter Unterschied, der dem der transfizierten Zellen in Abbildung 11 ähnelt. Der Effekt, dessen Interpretation und etwaige Zusammenhänge zu Abbildung 11 werden in 5.3 weiter erörtert.

Die Ergebnisse der Kalzium-Imaging-Versuche implizieren, dass entweder die endogen exprimierte Proteinmenge in Bewo-Zellen sehr gering ist oder sich TRPV6 Kanäle nicht in der Plasmamembran befinden.

4.4 Untersuchung des Effektes von Forskolin auf Bewo- und Jeg3-Zellen

Die Forskolin induzierte Differenzierung der Jeg3- und Bewo-Zelllinie zu Synzytiotrophoblasten geht einher mit Expression verschiedener Hormone und Veränderungen der Morphologie und wird gemeinhin als Synzytialisierung bezeichnet [97]. Es gilt zu untersuchen, ob sich Bewo und Jeg3 Zellen durch Forskolin zur Ausbildung von Synzytien stimulieren lassen und ob die Synzytialisierung abhängig von der $[Ca^{2+}]_i$ oder der Expression von TRPV6-Kanälen ist.

Forskolin führt in der Bewo-Zelllinie über eine Aktivierung der Adenylatzyklen zu erhöhten cAMP-Spiegeln. Dies sorgt über die Aktivierung der Proteinkinase A und des Chorionic-specific Transcriptionfactor GCMa (GCM1) zur Bildung von Syncytin-1. Syncytin induziert neben der Bildung von beta-hCG und der plazentaren alkalischen Phosphatase die Synzytialisierung der Bewo-Zelllinie [97]. Die daran beteiligten Zellsignalwege sowie der Effekt von Forskolin auf Jeg3-Zellen werden nun weiter untersucht.

4.4.1 Biochemischer Nachweis der Synzytialisierung mittels hCG-Test

Als Erstes wird untersucht, ob eine Aktivierung der Zellen mit Forskolin mittels der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eintritt. Diese führt neben einer Synzytialisierung auch zur Produktion verschiedener Sexualhormone, unter anderem von humanem Choriongonadotropin (hCG) [97]. Abbildung 13 zeigt, dass sowohl Bewo- als auch Jeg3-Zellen bereits 24 Stunden nach Inkubation mit Forskolin vermehrt hCG in das Medium sekretieren.

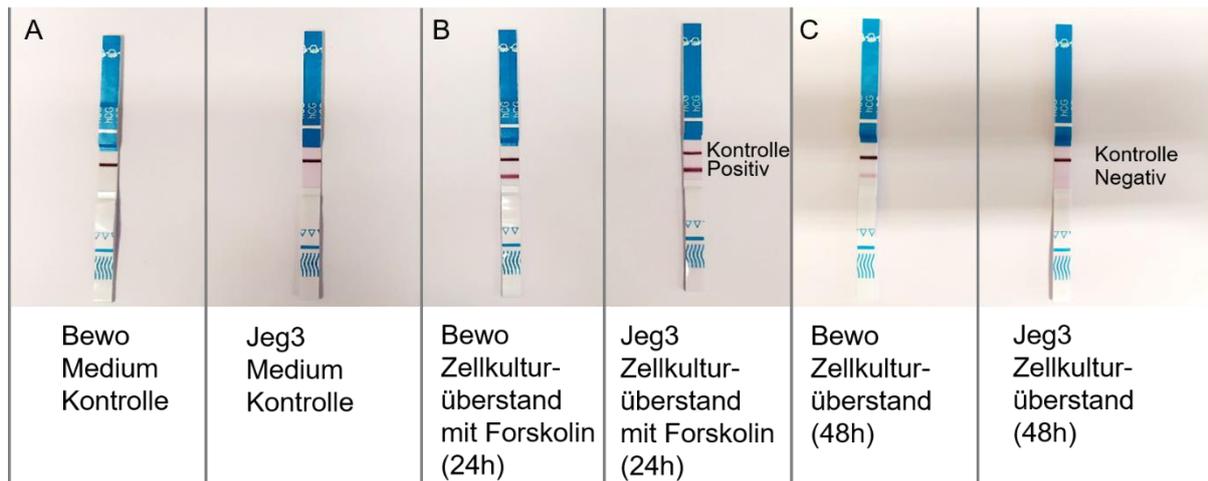


Abbildung 13 Nachweis des humanen Choriongonadotropin (hCG) im Überstand von Bewo- und Jeg3 Zellen, die mit Forskolin ($30\mu\text{M}$, 24 Stunden) stimuliert werden im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Überstand nach 48 Stunden gemessen). Der hCG Nachweis erfolgt mit einem kommerziellen Schwangerschaftstest. Als Negativ-Kontrolle wird das entsprechende Zellkulturmedium verwendet (Kontrolle).

4.4.2 Lichtmikroskopischer Nachweis der Synzytialisierung

Eine Inkubation von Bewo-Zellen mit 30 μ M Forskolin führt zu einer Veränderung der Morphologie (Abb 14, Pappenheim Färbung, lichtmikroskopische Aufnahme). Die Zellkerne und Zell-somata sind vergrößert und zeigen die Verschmelzung mehrerer Zellen zu einem großen Zellverband. Diese Entwicklung wird als Synzytialisierung bezeichnet [97]. Bei Jeg3-Zellen lässt sich keine morphologische Veränderung nach Forskolin-Stimulation erkennen.

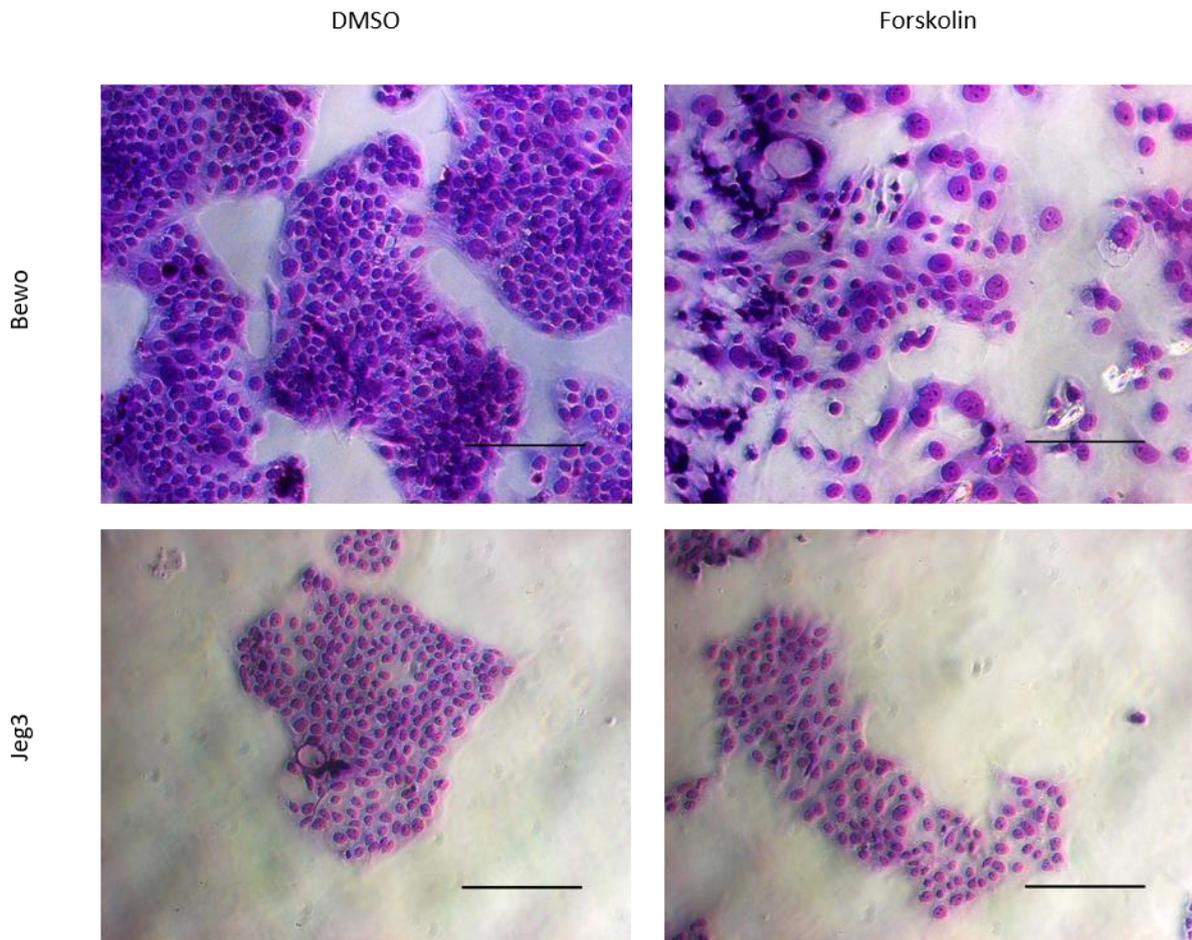


Abbildung 14 Pappenheim-Färbung; Inkubation der Bewo- und Jeg3- Zellen mit 30 μ M Forskolin (48 Stunden); Maßstabsbalken entspricht 200 μ m, n=3

4.4.3 Nachweis des Zona-occludens-1 Protein in Bewo-Zellen

In der Literatur ist neben der Veränderung der Morphologie der Zellen auch eine Abnahme der Expression der Tight-Junction-Proteine bei der Bewo-Zelllinie beschrieben [91]. Der Effekt von Forskolin auf die Expression und zelluläre Lokalisation des Tight-Junction-Proteins Zona-occludens-1 (ZO-1) wird hier durch immunzytochemische Antikörperfärbung bei Bewo- und Jeg3

Zellen untersucht. Abbildung 15 zeigt Bewo-Zellen, Abbildung 16 zeigt Jeg3 Zellen im ZO-1 Staining.

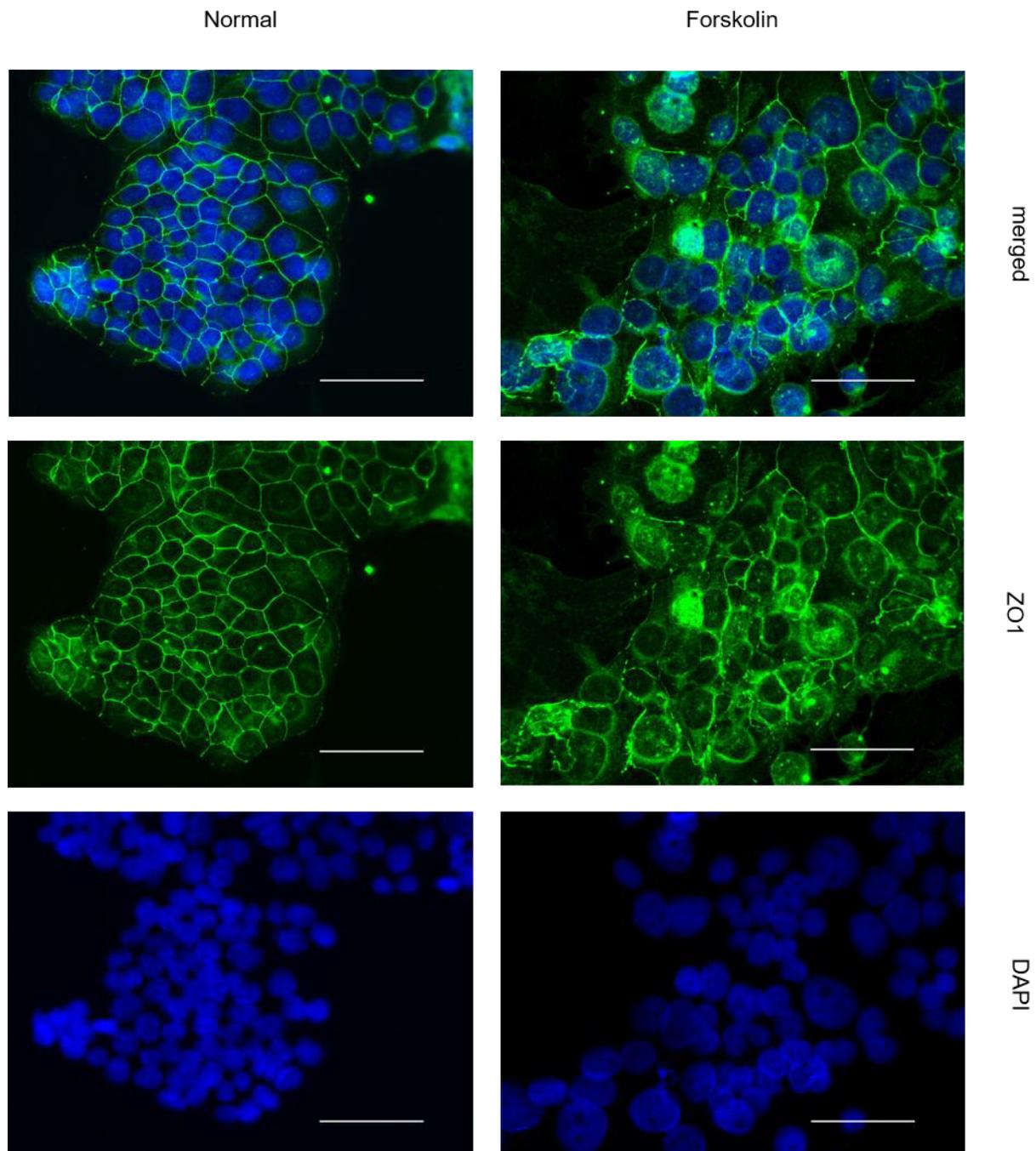


Abbildung 15 Bewo-Zellen werden mit/ohne 30µM Forskolin (48 Stunden) inkubiert und mit einem ZO-1 spezifischen Antikörper gefärbt (grün). Die Zellkerne werden mit Höchst-dye (blau) gegengefärbt. Maßstab 100µm.

Nicht stimulierte Bewo-Zellen zeigen eine starke auf die Plasmamembran begrenzte Lokalisation des ZO1 Proteins. Man erkennt deutlich, dass die mit Forskolin stimulierten Zellen im Bereich der Zellgrenzen ein schwächeres ZO-1 Signal und dafür eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation als die Vergleichsgruppe zeigen. Dies kann als Fusionierung der Zellen im Sinne der Bildung eines Synzytiums interpretiert werden. Bei Jeg3 Zellen (Abbildung 16) kann durch

Forskolin keine Abnahme der ZO-1 Färbung beobachtet werden. Der Zellverband behält sein kopfsteinpflasterartiges Aussehen bei. Die Ergebnisse decken sich mit der Literatur [91].

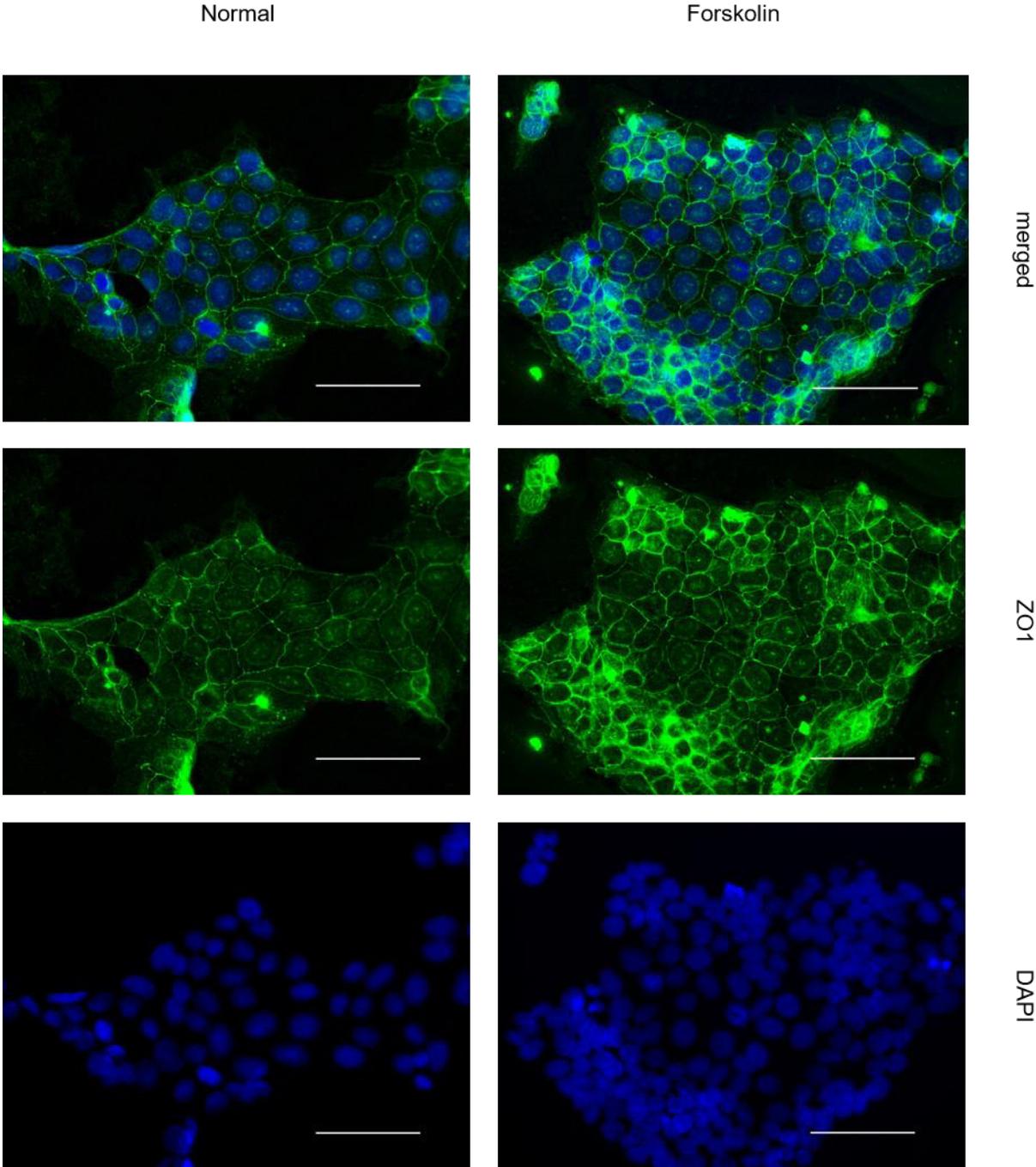


Abbildung 16 JEG3-Zellen werden mit/ohne 30μM Forskolin (48 Stunden) inkubiert und mit einem ZO-1 spezifischen Antikörper gefärbt (grün). Die Zellkerne werden mit Höchst-dye (blau) gegengefärbt. Maßstab 100μm.

4.4.4 Ergebnis der Proteomanalyse Forskolin stimulierter Zellen

Beide Zelllinien wurden in Gegenwart und Abwesenheit von Forskolin massenspektrometrisch untersucht, um die Synzytialisierung und damit einhergehende Bildung von Hormonen zu analysieren.

4.4.4.1 Einfluss von Forskolin auf die Veränderung des Proteoms der Bewo-Zelllinie

4.4.4.1.1 Identifizierte Proteine, bei denen mindestens zwei unabhängige Peptide pro Protein nachgewiesen werden

Abbildung 17 zeigt, dass bei der massenspektrometrischen Analyse der Bewo-Zellen 2634 Proteine identifiziert werden. In Zellen ohne Zusatz von Forskolin im Medium werden insgesamt 2108 Proteine identifiziert. Davon werden 948 Proteine in allen vier Proben identifiziert. Bei Zellen mit Zusatz von Forskolin im Medium werden 2346 Proteine identifiziert, davon werden 888 Proteine in allen vier Proben identifiziert. Nach quantitativer Auswertung der Proteinidentifikationen zeigen sich bei Zellen ohne Inkubation mit Forskolin 85 Proteine signifikant verstärkt exprimiert, bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin sind 171 Proteine signifikant verstärkt exprimiert.

Bei dem Vergleich der signifikant abundanten Proteine aus der Proteomanalyse fallen bestimmte Kategorien auf, in denen ein Unterschied zwischen Bewo-Zellen nach Inkubation in normalem Zellkulturmedium und Bewo-Zellen nach Inkubation mit Forskolin besteht. Die Ergebnisse des Vergleichs beider Gruppen mit Hilfe des PCS werden in Tabelle 6 dargestellt.

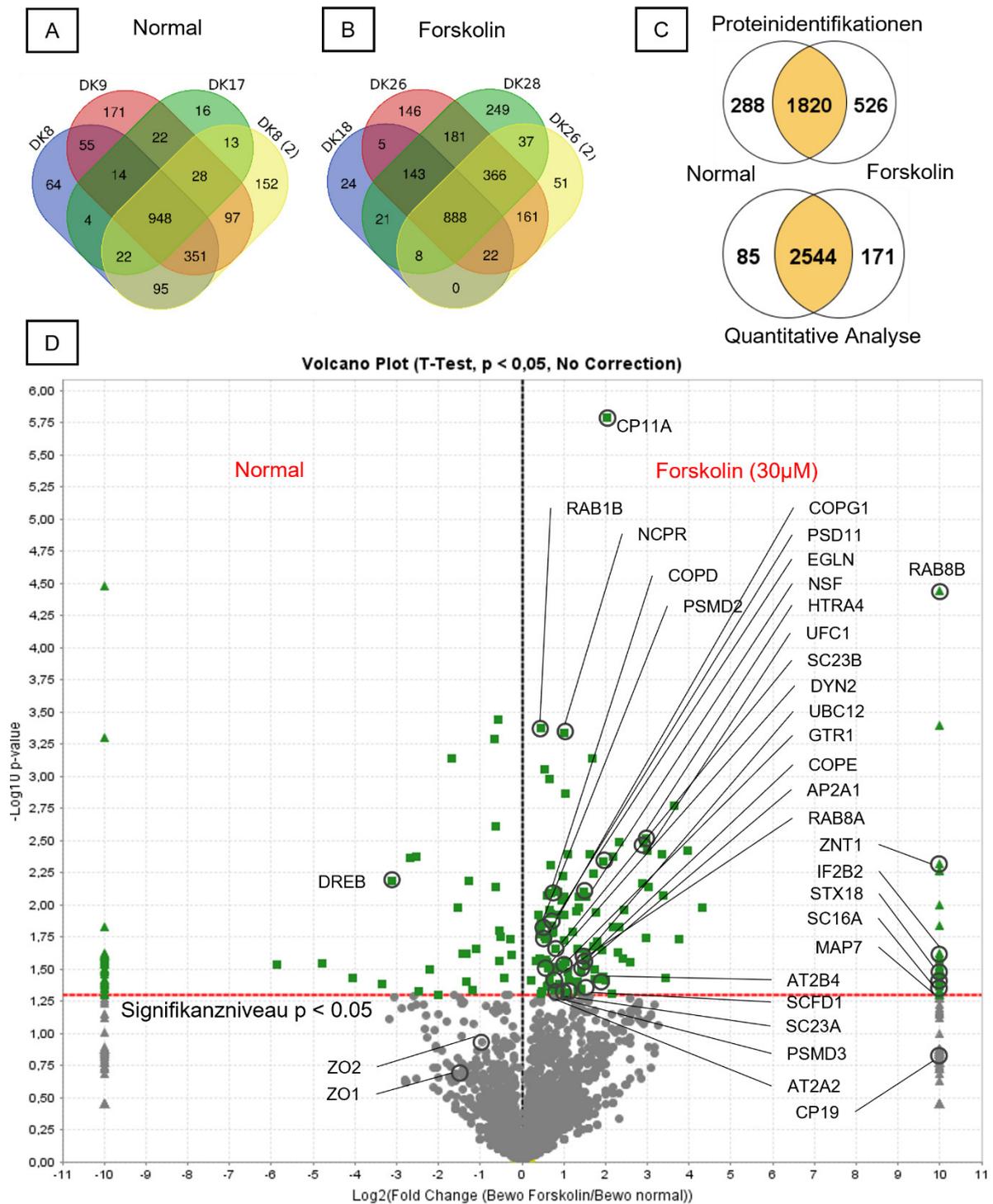


Abbildung 17, Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30 μ M) inkubiert worden waren. A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK8, DK9, DK17, DK8 (2)) ohne Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, $n=4$). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Bewo-Zellproben (DK18, DK26, DK28, DK26 (2)) nach Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, $n=4$). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von Bewo-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30 μ M) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

Wie bereits in 4.2.2 erläutert, werden die signifikant abundanten Proteine mit dem Panther Classification System kategorisiert, um einen Überblick über die Unterschiede der detektierten Proteinexpression von Bewo-Zellen mit und ohne Inkubation mit Forskolin zu erhalten.

Tabelle 6 Vergleich der Bewo-Proteome nach Stimulation durch Forskolin. Proteine die nach Stimulation vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.

Gene Ontology Klassifikation (Panther)	Gene ID
Vesikulärer Transport (<i>vesicle mediated transport</i>)	VAMP8, ARF1, AP2A1, AP2A2, PACN2, DYN2, SC23A, SC23B, SC16A, TFG, COPE, SAR1B, COG1, COPD, ERD21, SCFD1, STX18, NSF, EHD1, ARL1, CHMB1B, CHM4B, RAB8A, RAB8B, GDIA, TNAP2, RAP1B
Zellkontakt (<i>cell junction</i>)	DREB, DYN2, RAB8B, RAB8A
Ubiquitin-Proteasom Signalweg (<i>ubiquitin-proteasome-pathway</i>)	UBE2C, PSMD2, PSMD3, PSMD11, PSMC2, PSMC5, ATG7
Vitamin D Metabolismus und Signalweg (<i>Vitamin D metabolism and Pathway</i>)	NCPR

Unter der Kategorie des vesikulären Transports werden in Zellen ohne Inkubation mit Forskolin die zwei Proteine VAMP8, ein SNARE-Protein [61], sowie ADP Ribosylation Factor (ARF1), ein Protein, das durch Hydrolyse von GTP Vesikelfusion am Golgi ermöglicht [157], detektiert. In der Kategorie werden 25 Proteine detektiert, die in Zellen nach Inkubation mit Forskolin abundant waren. Besonders die zwei Adapterproteine Subunit Alpha 1/2 (AP2A1/AP2A2) sind Bestandteile des AP-2-Komplexes, welcher die cAMP-induzierte Expression von hCG aktiviert [75]. Protein Kinase C and Casein kinase substrate in neurons protein 2 (PACN2) reguliert zusammen mit Dynamin-2 (DYN2) die apikale Endozytose und Mikrovilli-Bildung [104]. Die Proteine Transport Proteine SEC23A, SEC23B und SEC16A sind Bestandteile des coat protein complex 2 (COP2) und für den Transport von neu gebildeten Lipiden in Vesikeln von ER zum Golgi zuständig, um sie der Sekretion zuzuführen. Dabei interagieren die Isoformen SEC23 A und B mit SEC16 [59]. TFG interagiert ebenfalls mit Sec-Proteinen und COP2 Untereinheiten [146]. Die beiden Mantel-Proteine Coatamer subunit epsilon (COPE) [65] und SAR1B [107] interagieren ebenfalls mit dem COP2-Komplex. Coatamer subunit gamma 1 (COG1, SEC21) [49,148], Coatamer subunit delta (COPD) [121] und ER lumen protein-retaining receptor 1 (ERD21, KDELR1) sind als COP1 Proteine am Golgi-zu-ER Transport beteiligt [83]. Sec1 family domain-containing protein 1 (SCFD1) ist zusammen mit STX18, einem SNARE-Protein, an dem Export von Proteinen durch Fusion von Membranvesikeln mit der Zellmembran beteiligt [50]. Die Vesicle-Fusing ATPase (NSF) gehört ebenfalls zu den SNARE-Proteinen [10]. EHD1 ist beteiligt an Prozessen der endosomalen Vesikelbildung [13]. ADP-ribosylation factor-like protein 1 (ARL1) ist beteiligt an Golgi-Vesikeltransport [81]. Charged multivesicular body protein 4b (CHM4B, CHMP4b) und Charged multivesicular body

protein 1b (CHMB1B, CHMP41b) haben Funktionen in vesikulären Sortierungsprozessen [63]. RAB8A ist ein intrazelluläres Transportprotein mit der Funktion einer Veränderung von Adhärenzkontakten. Selbiges könnte auch für RAB8B gelten [70]. Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDIA) interagiert mit RAB-Proteinen und scheint unter anderem an deren Transport im Cytosol beteiligt zu sein [66]. Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 (TNAP2, TNFAIP2) ist ein mit Proinflammation assoziiertes Protein mit Wechselwirkung mit TNF-alpha. Eine Beteiligung an vesikulären Transport scheint bei diesem Protein nicht im Vordergrund zu stehen [57]. Ras related Protein Rap-1b (RAP1B) ist im Mausmodell an der LH-Sekretion beteiligt, die Expression von RAP1B kann durch hCG induziert werden [151].

In Zellen nach Inkubation ohne Forskolin befindet sich ein Protein mit Assoziation zu Zellkontakt-Funktion, in Zellen nach Inkubation mit Forskolin befinden sich drei dieser Proteine. Drebrin (DREB, DBN1) ist als Aktin-Bindeprotein an der Strukturierung des Zytoskeletts beteiligt, könnte aber auch an Funktion der Cell-Junctions beteiligt sein [126]. In Zellen mit Inkubation mit Forskolin wird u. a. Dynamin 2 kategorisiert, welches im obigen Absatz bereits erläutert wird. Es ist an Prozessen der Endo- und Exozytose und Mikrovilibildung beteiligt und interagiert dabei mit PACN2 [104]. RAB8A und RAB8B werden ebenso im vorherigen Absatz genannt und sind beteiligt an intrazellulärem Transport und Veränderung von Adhärenzkontakten [70].

Das Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBE2C) ist in Zellen mit reduzierter Kalziumkonzentration reprimiert. Die Proteasom Untereinheiten PSMD2, PSMD3, PSMD11, PSMC2, PSMC5 [4] sowie das Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 [21] sind Teile des Ubiquitin-Proteasom Signalweges und in Zellen nach Inkubation mit Forskolin verstärkt exprimiert.

In Zellen nach Inkubation mit Forskolin wird dem Vitamin-D-Signalweg ein Protein zugeordnet. Die NADPH-Cytochrom-P450-Oxydoreduktase (NCPR, POR) ist ein mikrosomales Flavoprotein das an Reaktionen verschiedener Oxygenase-Komplexe beteiligt ist, unter anderem gehören auch alle Cytochrom P450 Monooxygenasen dazu. Damit ist NCPR unter anderem essenziell für die Steroidsynthese [152].

Des Weiteren soll in diesem Abschnitt auf weitere Proteine der Proteomanalyse aufmerksam gemacht werden, die über die Kategorisierung des PCS hinausgehen. Hierbei sind vor allem nach der Inkubation mit Forskolin verschiedene Proteine signifikant hochreguliert. Die Cholesterin-Monooxygenase (CP11A) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidhormonsynthese von Cholesterin zu Pregnenolon und ist somit Enzym der Steroidsynthese. Zudem kann CP11A Vitamin D3 zu 20-Hydroxyvitamin-D3 hydroxylieren und so in den Vitamin D-Signalweg eingreifen. [131]. Die Abundanz des Zinc-Transporter 1 (ZNT1) wird bereits durch Forskolin in Bewo-Zellen beschrieben [2]. Die bereits bekannte Serin Protease HTRA4 (HTRA4) ist abundant. Hier wurde vor Kurzem gezeigt, dass ein Knockdown von

HTRA4 die Synzytialisierung in Bewo-Zellen verhindert [84]. Das Glycoprotein Endoglin (EGLN) übernimmt in Trophoblasten verschiedene Funktionen der Migration, Invasion und Angiogenese [111]. Die Tight-junction assoziierten Proteine ZO-1 und ZO-2 sind nicht signifikant unterschiedlich exprimiert (ZO1 $p=0,23$; ZO2 $p=0,12$).

4.4.4.1.2 Identifizierte Proteine, bei denen mindestens ein unabhängiges Peptid pro Protein nachgewiesen wird

Bewo-Zellen sind wie in 2.2.2 beschrieben in der Lage hCG zu produzieren. In der oben beschriebenen massenspektrometrischen Auswertung ist jedoch hCG nicht nachweisbar. Nach Änderung der Scaffold-Einstellung zur Identifizierung der Proteine, bei denen mindestens ein unabhängiges Peptid pro Protein nachgewiesen wird, wird hCG detektiert (Abbildung 18).

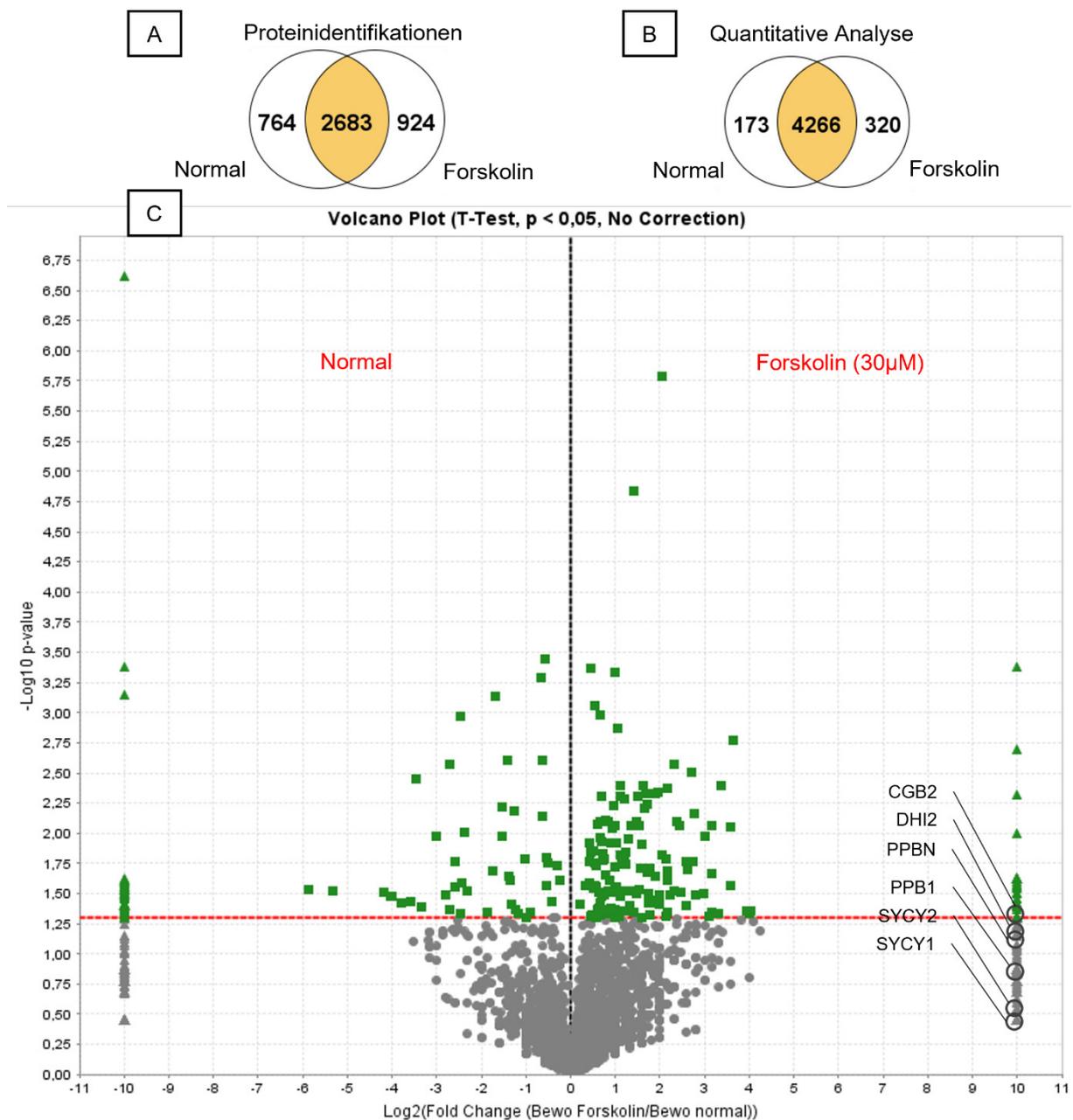


Abbildung 18 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Bewo-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Proteinidentifikationen. B) Proteine, die signifikant mehr abundant sind. C) Volcano-Blot der Untersuchung von Bewo-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

Diese Einstellung scheint die Detektion besonders kurzer Proteine, wie z.B. die detektierte beta-Untereinheit des hCG, mit nur 163 Aminosäuren (UniProt) zu verbessern. Im Zuge dieser

Auswertung waren weitere Proteine detektierbar, deren Expression in Synzytiotrophoblasten oder als Synzytialisierungs-Marker bereits beschrieben worden sind.

Die Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase Isozyme 2 (DHI2, HSD11B2) wird hauptsächlich in Synzytiotrophoblasten gebildet, kommt aber auch in anderen Organen wie z.B. der Niere vor. Es inaktiviert Cortisol zu Cortison [127]. Die plazentare alkalische Phosphatase (PPB1, n.s.) sowie die plazentaassoziierte alkalische Phosphatase (PPBN, n.s.) sind alkalische Phosphatasen. PPB1 ist spezifisch für Synzytiotrophoblasten [48]. Überdies wird beta-hCG (CGB2, 3, 7) detektiert. Auch Syncytin 1 und 2 (SYC1, n.s., SYC2, n.s.), ebenfalls spezifische Marker für eine Synzytialisierung der Trophoblasten, werden detektiert [97]. Schließlich wird die Aromatase (CP19A, n.s.) detektiert, ein Protein mit Ähnlichkeit zu oben genanntem CYP11A2, auch ein Zytochrom P450-Enzym, welches in der Lage ist, aus C19-Steroiden (Androgenen=Androstendion und Testosteron) C18 Steroide (Östrogene=Estron und Estradiol) zu bilden [118].

4.4.4.2 Einfluss von Forskolin auf die Veränderung des Proteoms in Jeg3-Zelllinien

4.4.4.2.1 Identifizierte Proteine, bei denen mindestens zwei unabhängige Peptide pro Protein nachgewiesen werden

Abbildung 19 zeigt, dass bei der massenspektrometrischen Analyse der Jeg3-Zellen 2573 Proteine identifiziert werden. In Zellen nach Inkubation ohne Forskolin werden insgesamt 2252 Proteine identifiziert. Davon werden 983 Proteine in allen vier Proben identifiziert. Bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin werden 2229 Proteine identifiziert, davon werden 1161 Proteine in allen vier Proben identifiziert. Nach quantitativer Auswertung der Proteinidentifikationen zeigen sich bei Zellen ohne Forskolin-Stimulation 36 Proteine signifikant verstärkt exprimiert, bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin sind 93 Proteine signifikant verstärkt exprimiert.

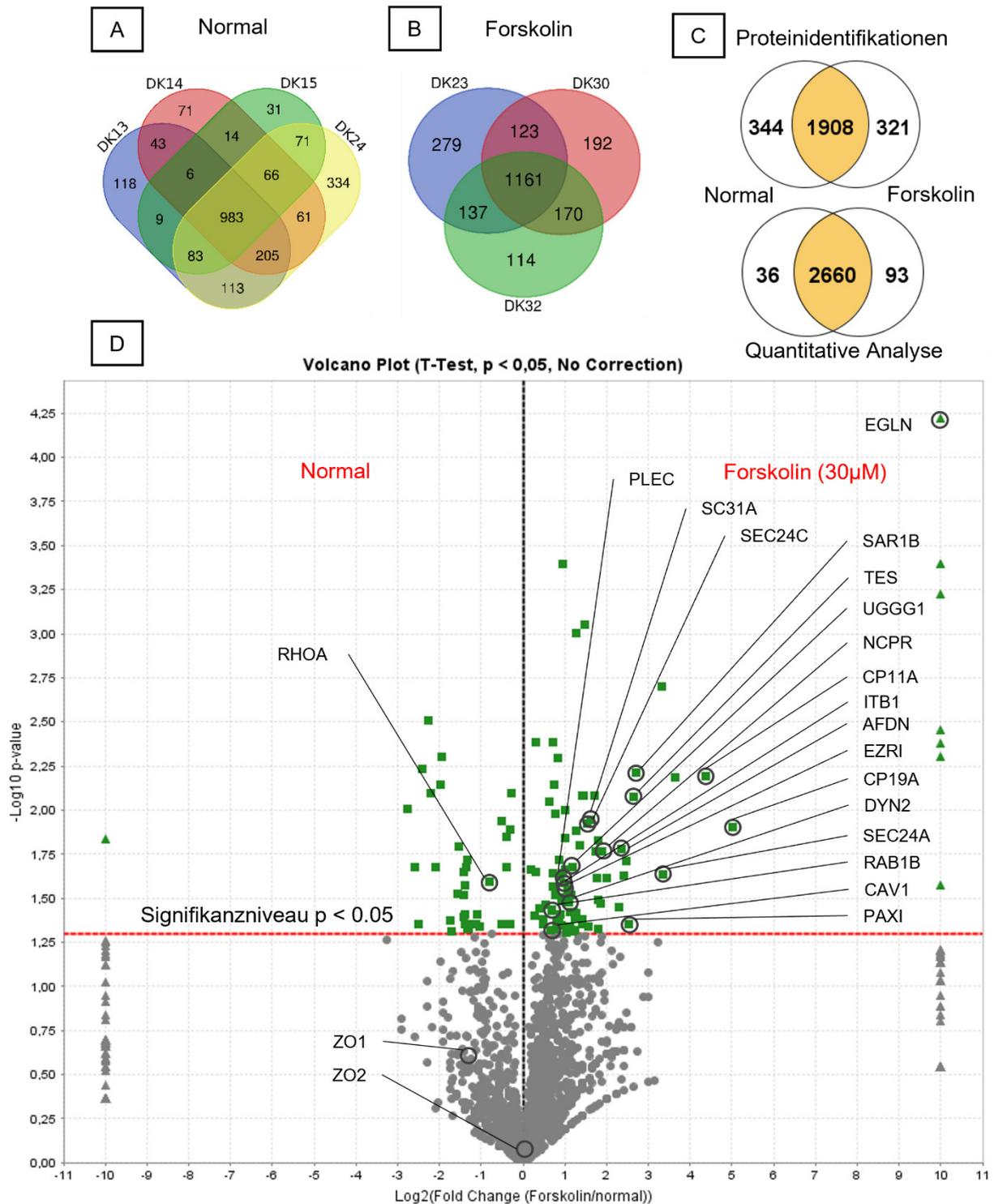


Abbildung 19 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30 μ M) inkubiert worden waren. A) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK13, DK14, DK15, DK24) ohne Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, $n=4$). B) Venn-Diagramm identifizierter Proteine der Jeg3-Zellproben (DK23, DK30, DK32) nach Inkubation mit Forskolin (48 Stunden, $n=3$). C) Proteinidentifikationen (oben) und Proteine, die signifikant mehr abundant sind (unten). D) Volcano-Blot der Untersuchung von Jeg3-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30 μ M) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Tabelle 7 Vergleich der Jeg3-Proteome nach Stimulation durch Forskolin. Proteine die nach Stimulation vermehrt gebildet werden sind schwarz und Proteine die reprimiert werden sind rot dargestellt. Die Protein-Klassifikation erfolgte mittels Panther-Software unter Nutzung der Gene Ontology.

Gene Ontology Klassifikation (Panther)	Gene ID
Vesikulärer Transport (<i>vesicle mediated transport</i>)	ANXA1, CHM1A, SC24A, SC24C, SC31A, SCFD1, COPG1, RAP1B, SAR1B, DYN2
Ubiquitin-Proteasom Signalweg (<i>ubiquitin-proteasome-pathway</i>)	PSMC4
Zellkontakt (<i>cell junction</i>)	RHOA, AFAD, PAXI, DYN2, ITB1, PLEC
Vitamin D Metabolismus und Signalweg (<i>Vitamin D metabolism and Pathway</i>)	NCPR

PCS kategorisiert zehn Proteine der Zellen nach Inkubation mit Forskolin in die Kategorie des vesikulären Transports. Annexin A1 (ANXA1) ist an der Sekretion von Steroidhormonen beteiligt und in geringen Mengen physiologisch in Hoden, Ovarien und Plazenta exprimiert [43]. Charged multivesicular body protein 1A (CHM1A) ist ein intrazelluläres Transportprotein [73]. Protein Transport Protein SEC24A ist an Transport von ER zu Golgi beteiligt. Zudem zeigt ein Knockout von SEC24A in Mäusen ein erniedrigtes Plasma-Cortisol [17]. Selbiges könnte eventuell auch für SEC24C gelten. SC31A ist als Teil des COP2-Komplexes an vesikulärem Transport von ER zu Golgi beteiligt [125]. Wie auch in den Bewo-Zellen wird Sec1 Family Domain-Containing Protein 1 (SCFD1) gefunden, es ist zusammen mit STX18 (in Bewo-Zellen detektiert) und SNARE-Proteinen an Export von Proteinen durch Fusion von Membranvesikeln mit der Zellmembran beteiligt [50]. Auch coatomer subunit gamma 1 (COPG1, SEC21) ist am Transport von Endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat sowie am Export von Proteinen beteiligt, es ist in beiden Zelllinien signifikant abundant [49,148]. Ras related Protein Rap1b (RAP1B) ist im Mausmodell an der LH-Sekretion beteiligt, die Expression von RAP1B kann durch hCG induziert werden [151]. GTP-binding protein SAR1B (SAR1B) ist an Synthese und Export von Cholesterin und an Chylomikronen-Synthese beteiligt [107]. Dynamin-2 (DYN2) reguliert die apikale Endozytose und Mikrovilli-Bildung [104].

Aus der Kategorie der Proteine mit Assoziation zu Zellkontakten ist RHOA in Zellen nach Inkubation mit Forskolin reprimiert. Es ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt [139]. Afadin (AFAD) ist ein Scaffold-Protein, welches an der Bildung von Adhärens- und Tight-Junctions beteiligt ist [53]. Paxillin (PAXI) ist auch ein Scaffold Protein, das an der Bildung von Adhärens-Kontakten beteiligt ist. Es gibt auch eine Verbindung zu Zellmigration und Myoferlin (siehe 4.2.2) [80] sowie den MAPK-Pathway [27]. Integrin beta 1 (ITB1) ist ein heterodimerer Rezeptor, der je nach Abhängigkeit der zugehörigen Alpha-Untereinheit verschiedene Funktionen übernehmen kann. Für ITB1 sind sowohl Zelladhäsions- und Migrationssignalwege beschrieben [14]. In Endothelzellen ist eine Verbindung zu Angiogenese und Wundheilungsprozessen beschrieben [153]. Auch Plectin (PLEC) übernimmt diverse Adhäsionsfunktionen in Zellen, wird in Hemi-Desmosomen, Desmosomen und Adhärenzkontakten aber z.B. auch in

Z-Linien der Skelettmuskulatur identifiziert und zeigt eindrucksvoll in z.B. der pathologischen Manifestation der Epidermolysis Bullosa die Konsequenz einer verminderten Expression von Plectin [142]. Dynamin 2 (DYN2) wird bereits im vorherigen Absatz erläutert.

26S proteasome regulatory subunit 6B (PSMC4) wird in Zellen nach Inkubation mit Forskolin vermehrt exprimiert. Es ist Teil des Ubiquitin-Proteasom Signalweges [62].

Schließlich wird auch das Protein NCPR, wie in der Bewo-Zelllinie (Abbildung 17), signifikant erhöht exprimiert.

Es soll noch auf Endoglin (EGLN) hingewiesen werden, welches auch in Jeg3-Zellen gebildet wird. EGLN ist ein Glycoprotein das in Trophoblasten verschiedene Funktionen der Migration, Invasion und Angiogenese übernimmt [111]. Auch das Protein Ezrin (EZRIN) ist in Zellen nach Inkubation mit Forskolin abundant. Es ist Bestandteil des FERM-Komplexes und sorgt vor allem in Epithelzellen für die Bildung und Reparatur von Mikrovilli [140]. Zudem sind die beiden Proteine CP19A (Aromatase) sowie CP11A wie in Bewo-Zellen (CP19A in Bewo-Zellen jedoch nicht signifikant) erhöht. Die Serinprotease HTRA4 wird in Jeg3-Zellen nicht detektiert. Abschließend sei bemerkt, dass die Tight-junction assoziierten Proteine ZO-1 und ZO-2 nicht signifikant unterschiedlich exprimiert werden.

4.4.4.2.2 Identifizierte Proteine, bei denen mindestens ein unabhängiges Peptid pro Protein nachgewiesen wird

Abbildung 20 zeigt die Analyse von Proteinen, bei denen mindestens ein unabhängiges Peptid pro Protein nachgewiesen wird. Dies ermöglicht eine verbesserte Detektion von Proteinen mit

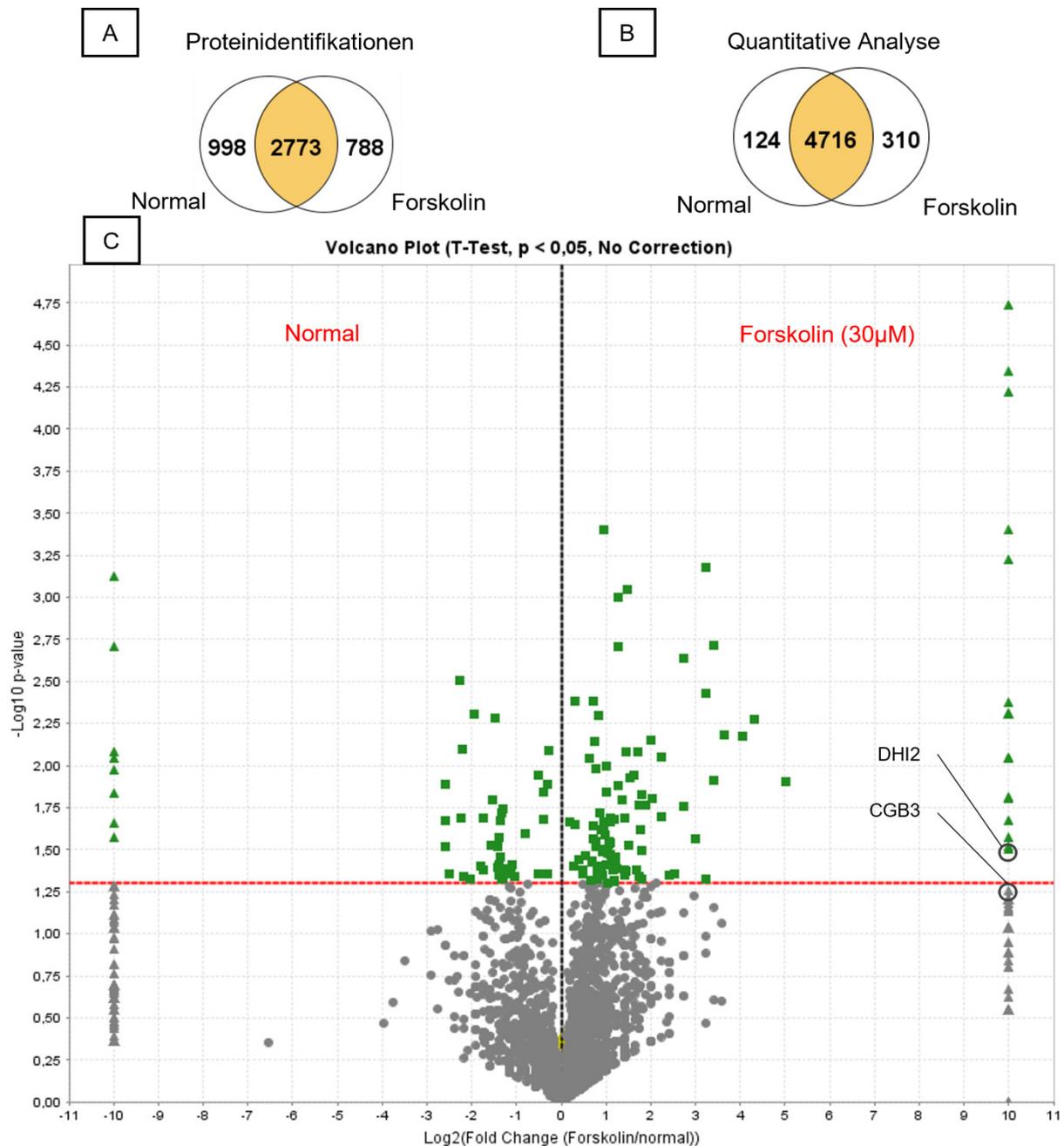


Abbildung 20 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Jeg3-Zellen, die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren. A) Proteinidentifikationen. B) Proteine, die signifikant mehr abundant sind. C) Volcano-Blot der Untersuchung von Jeg3-Zellen die 48 Stunden mit/ohne Forskolin (30µM) inkubiert worden waren, mittels T-Test bei Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

geringerer Größe. Hier zeigte sich keine signifikante Abundanz von beta-hCG (CGB3). Im Zuge dessen zeigt sich, im Gegensatz zu den Bewo-Zellen, die Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2 (DH12, HSD11B2) abundant. Es wird keine PPBN, PPB1, Syncytin oder

Syntaxin detektiert. Das Proteom der Jeg3-Zellen zeigte nach Forskolinbehandlung im Gegensatz zum Proteom der Bewo Zellen, dass weniger an der Synzytialisierung beteiligte Proteine induziert wurden.

5. Diskussion

5.1 Nachweis von TRPV6 in Bewo- und Jeg3-Zellen

In dieser Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass TRPV6 in den humanen Chorionkazinomzelllinien Bewo und Jeg3 exprimiert wird. Der Expressionsnachweis von TRPV6-Proteinen wurde bereits zuvor gezeigt [89], nicht jedoch für Jeg3. Die Existenz von TRPV6 Proteinen in der menschlichen Plazenta wurde auch bereits zuvor beschrieben [145]. Da die o.g. Zelllinien ursprünglich aus menschlichem Chorionkarzinom entnommen [100] bzw. geklont [68] wurden, kann davon ausgegangen werden, dass TRPV6 in der menschlichen Plazenta gebildet wird. Es zeigt sich, dass TRPV6 in den beiden Zelllinien allerdings nur in geringem Maße exprimiert wird. Denn um überhaupt TRPV6 Proteine mittels Western Blot Analyse oder Massenspektrometrie eindeutig zu detektieren, musste zuvor aus beiden Zelllinien eine Anreicherung mittels Immunpräzipitation durchgeführt werden. Das Ergebnis deckt sich mit der ebenfalls geringen Expression von TRPV6 in Plazenta-Gewebe *in vivo* [145].

5.2 Untersuchung des Einflusses von verminderter Ca^{2+} -Konzentration auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien

TRPV6 ist am Transport von Kalzium in der Plazenta über die Synzytiotrophoblasten beteiligt (siehe 2.3). Bewo- und Jeg3-Zelllinien stellen ein Model für Trophoblasten bzw. Synzytiotrophoblasten der Plazenta dar. Eine reduzierte extrazelluläre Kalziumkonzentration sollte den Mangel an TRPV6 simulieren. Dazu wurden die Zellen in verschiedenen $[\text{Ca}^{2+}]$ inkubiert und anschließend mikroskopisch unter Zuhilfenahme der Pappenheim-Färbung auf Konfluenz und Morphologie untersucht. Des Weiteren wurden Bewo- und Jeg3-Zelllinien in Medium mit verringerter $[\text{Ca}^{2+}]$ inkubiert, um anschließend das Proteom dieser Zellen mit dem Proteom von Zelllinien zu vergleichen, die unter normalen Bedingungen kultiviert wurden. Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse aus 4.2 erörtert.

5.2.1 Die Reduktion der Kalzium-Konzentration im Zellkulturmedium aktiviert verschiedene Zellsignalwege

In den gezeigten Bewo- und Jeg3-Zellversuchen (4.2) wurden die Kulturbedingungen bezüglich der $[Ca^{2+}]$ variiert. Sowohl die morphologische Analyse als auch die Proteomanalyse zeigen, dass die Zellen empfindlich auf eine Reduktion der $[Ca^{2+}]$ im Medium reagieren. Allerdings werden in Jeg3- und Bewo-Zellen unterschiedliche Effekte auf verschiedene Prozesse beobachtet.

5.2.1.1 *Bewo- und Jeg3-Zelllinien reagieren unterschiedlich auf Reduktion der Kalzium-Konzentration in Bezug auf die Expression von Kalzium-Bindeproteinen*

In Bewo-Zelllinien waren die Kalzium-Bindeproteine EFHD1, SORCN, SERCA2 und CHERP bei Kultivierung in niedriger $[Ca^{2+}]$ vermehrt exprimiert. EFHD1 ist dabei ein mitochondrialer Kalziumsensor mit Aktin-Binde-Funktion, der für die mitochondriale Flash-Aktivierung (Mitoflash), bei der es zu stochastischen Ausbrüchen der Superoxidproduktion kommt, verantwortlich ist. Diese Mitoflash Ereignisse sind wichtig für die neuronale Entwicklung [92]. SORCN ist ein Kalzium-Bindeprotein, das in verschiedenen Tumorzellen überexprimiert wird und den intrazellulären Kalziumhaushalt durch Regulation anderer Kalzium-Kanäle in Zellmembran, ER und sarkoplasmatischem Retikulum beeinflusst [23]. SERCA2 ist eine Kalzium-Pumpe, welche unter Abhängigkeit von ATP Kalzium in das ER transportiert [16]. CHERP ist an der Modulation der endoplasmatischen Kalzium-Homöostase beteiligt indem es u. a. die Aktivität des Ryanodinrezeptor moduliert [76].

In Jeg3-Zelllinien waren in normaler $[Ca^{2+}]$ vor allem die zwei Kalzium-Bindeproteine Calmodulin (CALM1) und Calumenin (CALU) abundanter. CALM1, ein universeller intrazellulärer Kalzium-Sensor mit 4 Kalzium-Bindestellen inaktiviert TRPV6 bei hohen intrazellulären $[Ca^{2+}]$ [119]. Auch das ER-Protein CALU ist ein Kalzium-Bindeprotein mit 6 Kalzium-Bindestellen im ER [86], welches unter physiologischen Bedingungen in Trophoblasten exprimiert wird. Eine reduzierte Expression von CALU wird in Plazenten von Patientinnen mit wiederholtem Schwangerschaftsverlust (recurrent pregnancy loss) beschrieben [35]. Es scheint die Kalzium-Affinität der SERCA-ATPasen in ER und SR bei hoher intrazellulärer Kalzium-Konzentration negativ zu regulieren [136].

EFHD1, SORCN, SERCA2 und CHERP scheinen in Bewo-Zellen im Sinne der Reaktion auf die Inkubation in verminderter $[Ca^{2+}]$ an der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase beteiligt zu sein. SORCN, SERCA2 und CHERP sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die signifikante erhöhte Detektion der drei Proteine kann als ein Hinweis auf durch die erniedrigte $[Ca^{2+}]$ induzierten ER-Stress gewertet werden [16,23,77]. In Jeg3-Zelllinien lassen sich Kalzium-Bindeproteine lediglich in normaler $[Ca^{2+}]$ nachweisen. CALM1 ist zudem in der Lage TRPV6 zu inaktivieren [69]. Eine Abwesenheit von CALM1 wäre somit prinzipiell mit einer

verstärkten Aktivität von TRPV6 zu vereinen, auch wenn Beweise für verstärkte TRPV6-Aktivität oder Expression fehlen. Das Fehlen von CALU in Jeg3-Zelllinien mit verminderter $[Ca^{2+}]$ erscheint nachvollziehbar, weil CALU bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen die Affinität der SERCA-ATPasen zu Kalzium vermindert und so eine weitere Aufnahme von Kalzium in das ER und SR vermindert [136].

5.2.1.2 Bewo-Zelllinien reagieren auf die Verringerung der Kalzium-Konzentration im Medium mit der Induktion proteolytischer Signalwege

In der Bewo-Zelllinie ist die Serinprotease HTRA4 verstärkt in Gegenwart niedriger $[Ca^{2+}]$ exprimiert. HTRA4 ist eine Serinprotease, die physiologisch in geringen Mengen von der Bewo-Zelllinie exprimiert wird. Geringe Werte sind auch im Verlauf einer physiologischen Schwangerschaft im Serum nachweisbar. In Versuchen mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVECS) konnte gezeigt werden, dass HTRA4 in der Lage ist Zellkontakt-assoziierte Proteine wie Cadherine und Catenine zu degradieren und damit eine endotheliale Dysfunktion zu bewirken [120, 128]. Auch Myoferlin (MYOF), ein Protein aus der Ferlin-Familie ist in der Lage extrazelluläre Matrix-Proteine zu degradieren [28]. In Jeg3-Zelllinien war die Zink-Peptidase Nardilysin (NRDC) unter erniedrigter $[Ca^{2+}]$ erhöht. NRDC induziert die Expression der Metalloproteasen MMP2 und MMP3, die in der Lage sind, extrazelluläre Matrix-Proteine zu degradieren [134]. Hier muss allerdings vervollständigend hinzugefügt werden, dass in der Proteomanalyse Metalloproteasen nicht signifikant unterschiedlich abundanter detektiert wurden.

In murinen Plazenten führt ein Knockout von TRPV6 zu verstärkter Expression von Proteasen, unter anderem der Serinprotease HTRA1, verstärkter Expression von Granzymen und einer verminderten Expression von Fibronectin. HTRA1 degradiert dabei die Proteine der extrazellulären Matrix, allem voran das Fibronectin. Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beteiligt ist [143]. Fibronectin wird in den Bewo- und Jeg3 Zelllinien in nur sehr geringem Maße exprimiert. Eventuell benötigt man Gewebe mit EZM, um eine mögliche degradierende Wirkung von HTRA1 auf EZM Proteine, wie Fibronectin in den gezeigten Zelllinien zu untersuchen. Diese Bedingungen waren in den Zelllinien nicht gegeben.

Zudem werden in den beiden humanen Trophoblasten Zelllinien keine Granzyme detektiert. Eventuell führt erst die Interaktion von Trophoblasten mit Fibronectin, Lymphozyten und Zytokinen zur Expression von Granzymen. Dies sind Limitierungen von Zelllinien, da diese in ihrer Funktion auf Zellmodelle von Trophoblasten beschränkt bleiben. Eine Versuchsanordnung, in welcher humane Trophoblasten(-Zelllinien) mit Fibronectin, Lymphozyten und Zytokinen interagieren können, wäre diesbezüglich interessant [11].

Humanes HTRA1 und humanes HTRA4 stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 50,41% überein (UniProt Alignment). Über HTRA4 ist noch deutlich weniger bekannt als über HTRA1 [20], eventuell weil es in Bezug auf die Entdeckung die Jüngste unter den HTRA-Proteasen ist [78].

Q92743	HTRA1_HUMAN	1	-----MQIPRAALLPLLLLLAAAPASAQLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCHPQPEH	52
P83105	HTRA4_HUMAN	1	MIRPQLRTAGLGR-CLLPGLLLLLVV----LWAGAEKLTQPSCEPAVCOPTRCBALPTC	55
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	53	CEGG-RARDACGCCEVCGAPEGAACGL-DEGPGCEGLQCVVEFGVPASATVRRRAQAAGLC	110
P83105	HTRA4_HUMAN	56	ALGTPVFDLRCRCRVPAAREVCGGAQGQCAPGLQCLQPLRPGFP-----STC	106
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	111	VCA-SSEPVCSSDANTYANLCQDRAASRRSERLHRPPEVIVLQRGACGGG-QEDPNSLRHK	168
P83105	HTRA4_HUMAN	107	GCPTLGGAVCGSDRRITPSCMCALRAENRAARRLGVPAVPVQWNCGDGTGRSAGPLRRN	166
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	169	YNFIADVVEKIAPAVVHIELFRKLPFSKREVPVASSGSGFIVSEDLIVTNAHVVTNKHV	228
P83105	HTRA4_HUMAN	167	YNFIAAVVEKVAPSVVHVQLWGRLLHGSRLLVPVYSGSGFIVSEDLIITNAHVVRNQQWI	226
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	229	KVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHCGKLPVLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSL	288
P83105	HTRA4_HUMAN	227	EVVLQNGARYEAVVKDIDLKLLDLAVIKIESNAELPVLMLGRSSDLRAGEFVVALGSPFSL	286
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	289	QNTVITGIVSTTRQGGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLGDGEVIGINTLRVT	348
P83105	HTRA4_HUMAN	287	QNTATAGIVSTRQGGKELGMKDSMDYVQIDATINYGNSSGGPLVNLGDGVIGVNSLRVT	346
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	349	AGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQAKGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDV	408
P83105	HTRA4_HUMAN	347	DGISFAIPSDRVROPLAEYHEHOMGKAFSNKKYLGLQMLSLTVPLSEELMHVYDFPDV	406
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	409	ISGAYIIEVVPDTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRESTLNMVVRRGNED	468
P83105	HTRA4_HUMAN	407	SSGVVCKVVEGTAQSSGLRDHDVIVNNGKPIITTTDQVVKALDS-DLSMAVLRGKDN	465
			* * * * *	
Q92743	HTRA1_HUMAN	469	IMITVPIPEIDP	480
P83105	HTRA4_HUMAN	466	LLLTVPVETIN-	476
			* * * * *	

Abbildung 21 UniProt Alignment, Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen der humanen Serinprotease HTRA1 und der humanen Serinprotease HTRA4. 248 identische Positionen, Identität von 50,41%, 124 gleiche Positionen, durchgeführt am 12.10.2021.

In der Literatur finden sich diverse Anhaltspunkte, dass HTRA1 und HTRA4 in ähnlichen Prozessen involviert sind. HTRA1 und 4 sind in villösen Geweben von Plazenten von Präeklampsie-Patienten hochreguliert. Beide Serinproteasen werden im Fall einer Präeklampsie in das maternale Serum sekretiert. Beide Serinproteasen werden in Trophoblasten-Zelllinien (HTR-8) nach Hypoxie vermehrt exprimiert [78] und sie sind in der Lage Proteine der extrazellulären Matrix zu degradieren, wobei dabei für HTRA1 als Substrate vor allem Fibronectin, Decortin, Fibromodulin, Vitronectin bekannt sind [20], während für HTRA4 lediglich die Degradation von beta-Catenin und vaskulär-endotheliale Cadherin beschrieben wird. Diese Proteine sind unter anderem an der Bildung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten beteiligt [120,128]. Eine verstärkte Expression von HTRA1 ist mit diversen pathologischen Zuständen in verschiedenen Geweben assoziiert, unter anderem ist es in mit Inflammation assoziierten Pathologien wie Arthritis verstärkt exprimiert, während es in cancerogenen Geweben vermindert exprimiert wird. Eine vermehrte Expression von HTRA1 führt zudem zu verminderter Proliferation. HTRA1 wird daher ein anti-cancerogener Effekt zugeschrieben [20]. Die Expression von HTRA4 scheint auf plazentares Gewebe beschränkt zu sein [120].

Die verstärkte Expression von HTRA1 in Plazenten, in denen ein funktioneller Knockout des TRV6-Proteins (im Mausmodell) vorliegt [143] und HTRA4 in humanen Bewo-Zelllinien, die mit verringerter $[Ca^{2+}]$ kultiviert werden, scheint kausal in einer verringerten intrazellulären Kalzium-Konzentration begründet zu sein. Es bleibt den zugrundeliegenden Mechanismus zu erörtern.

5.2.1.3 Bewo- und Jeg3-Zelllinien reagieren auf Verringerung der $[Ca^{2+}]$ im Medium mit verminderter Expression Zellkontakt-assoziiierter Proteine

In Bewo-Zelllinien sind das desmosomale Protein Desmoglein-2 (DSG2) [24] sowie Catenin beta-1 (CTNB1), Bestandteil der Adhärenzkontakte [135], in Gegenwart niedrigen $[Ca^{2+}]$ weniger abundant. In Jeg3-Zelllinien ist unter niedrigen $[Ca^{2+}]$ Alpha-Parvin (PARVA) vermindert exprimiert. Alpha-Parvin ist ein Aktin-Bindeprotein, welches im Komplex mit anderen Proteinen die Interaktion von Integrinen der extrazellulären Matrix mit dem zellulären Aktin-Cytoskelett ermöglicht. Ein Knockout von Alpha-Parvin in murinen Gefäßen führt zu verminderten Zell-Zell- und Zell-Basalmembran-Kontakten [103]. Es ist zudem Bestandteil an Fokalkontakten und an Prozessen der Lokomotion beteiligt [115].

Die reduzierte Menge Zellkontakt-assoziiierter Proteine in der Bewo-Zelllinie könnte auf die verstärkte Expression der Proteine mit proteolytischer Aktivität zurückzuführen sein, wobei die genannten Proteasen Proteine der extrazellulären Matrix degradieren. Wie oben beschrieben ist die in niedriger $[Ca^{2+}]$ abundante Serinprotease HTRA4 z.B. in der Lage, beta-Catenine und VE-Cadherine zu degradieren [120].

Eine Ursache für die beobachtete Expression von Alpha-Parvin in Jeg3-Zelllinien könnte sein, dass die Expression von Alpha-Parvin kalziumabhängig ist.

5.2.1.4 Bewo-Zelllinien reagieren auf verminderte Kalzium-Konzentrationen mit Veränderung der Zellmorphologie

Wie in 4.2.1 beschrieben reagieren Bewo-Zelllinien auf eine verminderte extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ mit Änderung ihrer Morphologie und bilden längliche filamentartige Strukturen mit scheinbar ungerichteten spitzen Zellausläufern. Die Zellen werden massenspektrometrisch analysiert, wodurch einige Proteine identifiziert werden können von denen bekannt ist, dass sie an der Organisation der Zellmembran beteiligt sind. So wird Myoferlin (MYOF) und das epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptorsubstrat 15 (EPS15) verstärkt exprimiert, wenn die $[Ca^{2+}]$ reduziert wird. Dabei ist vor allem Myoferlin, ein Protein der Ferlin-Familie, welches oben bereits in Bezug auf seine proteolytische Aktivität erläutert wird, an der Organisation der Zellmembran sowie an Prozessen der Migration in Karzinomzellen beteiligt [28]. EPS15 moduliert das

Cytoskelett und ist an Prozessen der Reparatur der Zellmembran beteiligt. Es interagiert unter anderem mit Proteinen der Ferlin-Familie [26].

Denkbar wäre auch, dass der in 5.2.1.3 beschriebene Verlust an Zellkontakt-assoziierten Proteinen einen Einfluss auf die Morphologie der Zelllinie hat. Ein Mangel an Zell-Zell-Kontakten in Trophoblasten, ohne dass diese mit Vorgängen einer Synzytialisierung einhergehen, könnte sowohl die Morphologie als auch die Konfluenz beeinflussen. Daher könnte zum einen die Expression von Myoferlin und EPS15 der Grund für eine morphologische Veränderung der Zellen sein, zum anderen könnte in diesem Zusammenhang eine verstärkte Expression von Myoferlin und EPS15 eine Reaktion auf den Bedarf der Reparatur der Zellmembran sein.

Die Beobachtungen der Bewo-Zellen korrelieren mit früheren Ergebnissen von Maus-Trophoblasten. Die Reduktion der Kalziumkonzentration im Zellkulturmedium führt bei primären Wildtyp Synzytiotrophoblasten ebenfalls zu einer Änderung der Morphologie und hängt vom *Trpv6* Genotyp ab [143,144].

Bei Jeg3-Zellen zeigt sich unter niedrigen $[Ca^{2+}]$ keine Veränderung der Zell-Morphologie (Ergebnis nicht gezeigt) und es wurden auch mittels Proteomanalyse keine Proteine, die am Abbau der Zellmembran beteiligt sind, in signifikant unterschiedlichen Mengen detektiert.

5.2.1.5 Bewo- und Jeg3-Zelllinien reagieren auf verminderte Kalzium-Konzentrationen mit Induktion des Ubiquitin-Proteasome-Pathways

Wie in 4.2.2.1 beschrieben, werden in Bewo-Zelllinien mit verringerter $[Ca^{2+}]$ fünf 26s Proteasomen-Untereinheiten signifikant erhöht detektiert (PSMC2, PSMC3, PSMC5, PSMD2, PSMD11), sowie die Proteasome activator complex subunit 4 (PSME4). In der Jeg3-Zelllinie wird eine Proteasom-Untereinheit, PDMD8, signifikant vermehrt exprimiert.

Zudem werden verschiedene Proteine des Ubiquitin-Signalweges detektiert. Ubiquitinierung hat vielfältige Funktionen. Die wohl bekannteste Funktion der Ubiquitinierung besteht in der Markierung von Proteinen zur weiteren Degradation in Proteasomen. Dies erfordert eine mehrmalige (Poly-)Ubiquitinierung von Proteinen. Der Ubiquitin-Signalweg erfolgt in drei Schritten. Als Erstes benötigt Ubiquitin ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1). Im Anschluss wird ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) benötigt, bis das Ubiquitin schließlich an eine Ubiquitin Ligase (E3) weitergegeben wird [38]. In den Zelllinien mit erniedrigter $[Ca^{2+}]$ werden in Bewo-Zellen das E1-Enzym Ubiquitin like modifier activating enzyme 1 (UBA1), das E2-Enzym Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 (UFC1) sowie das E3-Enzym E3 ubiquitin-Protein ligase listerin (LTN1) detektiert. LTN1 ist Bestandteil des Ribosomen-Qualitätskontrollkomplexes (RQC), ein Ribosomen-assoziiertes Komplex, der die Ubiquitinierung unvollständig synthetisierter Proteinketten für den proteasomalen Abbau vermittelt. Ein Knockout von LTN1

führt zur Akkumulation von intrazellulären fehlgefalteten Proteinen [25]. In Jeg3-Zelllinien wird das E1-Enzym Ubiquitin like modifier activating enzym 6 (UBA6) detektiert. UBA1 und UBA6 sind die einzigen E1-Enzyme, die in der Lage sind Ubiquitin zu aktivieren [112].

Ubiquitinierung kann diverse Zellsignalprozesse induzieren, die bekanntesten sind neben der Markierung für die Degradation im Proteasom die Regulation von Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktion oder intrazellulärer Lokalisation. [38]. Die verstärkte Expression von E1, E2 und E3 und der 21s-Proteasome könnte ein Hinweis auf eine Aktivierung der Protein-Degradation in Bewo-Zellen sein.

Der zugrundeliegende Mechanismus zur Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges der Bewo-Zellen ist ungewiss. Denkbar wäre, dass die Reduktion der $[Ca^{2+}]$, wie in 5.2.1.1 beschrieben, zu ER-Stress führen könnte. In diversen Arbeiten wird beschrieben, dass eine niedrige $[Ca^{2+}]$ in Zellkulturen zu ER-Stress führen kann [71]. ER-Stress sorgt für Ineffizienz der ER-abhängigen Proteinsynthese, die in einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER resultiert. Diese werden in das Zytosol transportiert und dort im Sinne der ER-Associated Degradation (ERAD) wie oben beschrieben ubiquitiniert und im 26s-Proteasom abgebaut. Das ERAD-System arbeitet dabei mit der *unfolded protein-response* (UPR), manchmal wird ERAD auch als Teil der UPR definiert. Sowohl das ERAD als auch der UPR arbeitet mit verschiedenen Signalmolekülen, welche die Effizienz, Auslastung und Menge der fehlgefalteten Proteine im ER anzeigen und über verschiedene Signalkaskaden anpassen können, bis bei einer Überlastung eine ER-assoziierte Apoptose eingeleitet wird. Die verschiedenen Proteine der UPR- und ERAD-assoziierten Signalkaskaden wie z.B. protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase (PERK), inositol requiring enzyme 1 (IRE-alpha), activating transcription factor 6 ATF6, und activating transcription factor 4 (ATF4) werden in der massenspektrometrischen Analyse nicht detektiert [45,71].

In Jeg3-Zelllinien ist der Prozess vermutlich weniger stark ausgeprägt, weil in dieser Zelllinie in erniedrigter $[Ca^{2+}]$ lediglich ein Proteasom und ein E1 assoziiertes Protein signifikant hochreguliert wird.

Auch TRPV6 kann durch die E3-Ubiquitin Ligase Nedd4-2 ubiquitinyliert und dadurch im Proteasom degradiert werden [154]. Nedd4-2 war nicht signifikant unterschiedlich in Bewo- und Jeg3-Zelllinien exprimiert.

5.2.1.6 Bewo-Zelllinien reagieren auf verminderte extrazelluläre Kalzium-Konzentrationen mit vermehrter Expression von Proteinen der Cholesterinbiosynthese

In der Bewo-Zelllinie werden unter niedriger $[Ca^{2+}]$ zwei Proteine der Cholesterinbiosynthese detektiert. Die Phosphomevalonat-kinase (PMVK) sowie die Isopentenyl-diphosphat delta-

isomerase 1 (IDI1) sind Bestandteil der Mevalonatsynthese, dem ersten Teil der Cholesterinbiosynthese [6, 102]. PMVK phosphoryliert das zuvor von der Mevalonatkinase phosphorylierte Mevalonat zu Mevalonatdiphosphat [102]. IDI1 katalysiert die Umlagerung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat und könnte geschwindigkeitsbestimmend in der Synthese von Cholesterin sein [6]. Den größten Einfluss auf die Regulation der Cholesterinbiosynthese hat die HMG CoA-Reduktase (siehe Abbildung 22), deren Aktivität u. a. von Choles-

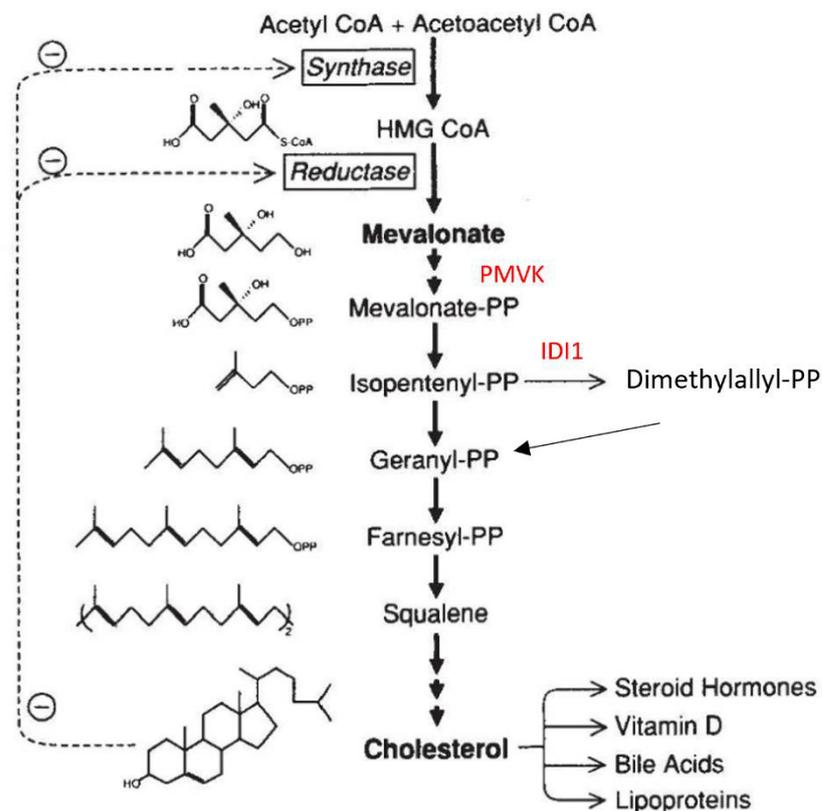


Abbildung 22 Mevalonat-Weg. Die Phosphomevalonat-Kinase (PMVK, rot) phosphoryliert Mevalonat-Phosphat zu Mevalonatdiphosphat. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IDI1, rot) katalysiert die Umlagerung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat. Die rot markierten Proteine sind abundanter, wenn Bewo-Zellen unter geringer $[Ca^{2+}]$ kultiviert werden. Schemazeichnung modifiziert nach Goldstein et al. (1990).

terin auf Ebene der Transkription im Sinne eines negativen Feedback Mechanismus reguliert wird. Sie ist in Bewo-Zellen unter niedriger $[Ca^{2+}]$ nicht signifikant erhöht. Cholesterin ist ein Ausgangsmolekül für diverse Produkte, die in vielen Stoffwechselvorgängen mitwirken. Neben der Funktion als Strukturmolekül in Zellmembranen und als Bestandteil von Lipoproteinpartikeln im Blut ist es auch als Substrat in der Bildung von Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren beteiligt [37]. Auf die weitere Nutzung des Cholesterols findet sich kein enzymatischer Hinweis. Für die Synthese von Gallensäuren wird Cholesterin mit verschiedenen Hydroxylasen in Leber, Gehirn oder Makrophagen modifiziert [19]. Es sind keine Enzyme, welche für die Synthese von Gallensäuren bekannt sind, in niedrigen $[Ca^{2+}]$ abundant, es wäre auch ungewöhnlich, wenn Bewo-Zellen Gallensäuren bilden können. Eine Verwendung des

Cholesterols hin zu Steroidhormonen würde durch verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme oder Hydroxysteroid-Dehydrogenasen erfolgen [109]. Keines der Enzyme der Steroidsynthese ist in verminderter $[Ca^{2+}]$ signifikant abundant. Eine Verwendung des Cholesterols für die Synthese von Vitamin D3 würde verschiedene Vitamin-D Hydroxylasen benötigen. Verschiedene Quellen widersprechen sich inwiefern 7-Dehydroxycholesterin aus Lannosterol, Cholesterin oder anderen Sterolen entsteht, jedoch waren keine Enzyme aus niedrigen $[Ca^{2+}]$ von 7-Dehydrocholesterin bis hin zu 1-25-Dihydroxycholecalciferol oder 1-25-Dihydroxyegocalciferol signifikant abundant exprimiert [93].

Eine erhöhte Abundanz von IDI1 und PMVK könnte auf eine verstärkte Synthese von Cholesterin hinweisen, die durch verringerter $[Ca^{2+}]$ im Medium ausgelöst wurde.

Die weitere Nutzung von Cholesterin bleibt ungewiss. Eine Funktion als Substrat für Vitamin D wäre aus zellphysiologischer Betrachtungsweise wohl am wahrscheinlichsten, weil die Plazenta so die Serum-Kalziumkonzentration erhöhen würde, was sich wiederum positiv auf die Kalziumkonzentration der Trophoblasten auswirken würde. Allerdings findet sich im Proteom kein Beweis, der diese Hypothese stützt. Eine weitere Hypothese wäre die Einbettung des Cholesterins in die Zellmembran neu gebildeter Zellorganellen, welche (wie in 5.2.1.5 beschrieben) durch ER-Stress beschädigt und in Ubiquitin-Proteasom-Signalweg degradiert werden.

In der in niedriger $[Ca^{2+}]$ inkubierten Jeg3-Zelllinie waren keines der Enzyme, die im Zusammenhang mit der Cholesterinsynthese, Steroidhormonsynthese und der Vitamin D Synthese stehen, unterschiedlich exprimiert.

5.2.1.7 Bewo-Zelllinien reagieren auf eine verminderte Kalzium-Konzentration im Medium mit vermehrter Expression Apoptose-assoziiierter Proteine

Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein (Diablo, DBLOH), Caspase 3 (CASP3) und Cation Independent Mannose-6-phosphate Receptor (Insulin-like growth factor 2 receptor, IGF2R, MPRI,) sind in niedriger $[Ca^{2+}]$ abundant. Diablo interagiert mit den Inhibitor of Apoptosis-Proteinen (IAPs) und inhibiert diese, welche wiederum die Aktivität von Caspasen inhibieren. Diablo kann somit die Aktivität der CASP3 verstärken [138]. Es gibt auch Berichte über die Aktivierung der CASP3 durch ER-Stress [90]. CASP3 ist wiederum in der Lage eine Vielzahl an Proteinen zu spalten und sorgt so für die Überführung der Zelle in Apoptose [82]. Unter anderem ist CASP3 in der Lage den IP3-Rezeptor zu inaktivieren. Der IP3-Rezeptor wird normalerweise durch IP3 im Zuge des Phospholipase-C-Weges aktiviert und entlässt bei Aktivierung Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol [47]. Des Weiteren inaktiviert CASP3 die membranständige Kalzium-ATPase PMCA (Plasma Membrane Kalzium Pumpe),

die normalerweise Kalziumionen von intra- nach extra-zellulär transportiert. Der dadurch steigende intrazelluläre Kalzium-Spiegel löst weitere Apoptose-assoziierte Zellsignalwege aus. [113]. Die Aktivierung der Caspasen hat neben der Induktion von Apoptose noch viele andere Funktionen. Speziell Caspase-3 ist an der Differenzierung verschiedener Zelltypen beteiligt [34]. Im Mausmodell wird gezeigt, dass ein Knockout von Caspase-3 mit verlangsamer Ossifikation, verringerter Knochendichte und einem kleinerem Skelett 14,5 Tag *post-conceptionem* einhergeht. Es scheint somit Funktionen in der Knochenbildung und deren Aufrechterhaltung zu übernehmen [88]. In Melanoma-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 an der Migration und Invasion der Zellen beteiligt ist und Metalloproteinasen aktivieren kann, die ihrerseits extrazelluläre-Matrixproteine degradieren können [79]. [42] Cation-independent mannose-6-phosphat receptor (MPRI, IGF2R) ist Rezeptor für insulin-like growth factor 2 (IGF2) und geht in Kontakt mit Proteinen, die mit Mannose-6-Phosphat markiert werden und bringt diese in die Lysosomen. In Bewo-Zellen hat IGF2R verschiedene Funktionen, unter anderem scheint die verstärkte Expression von IGFR2 zum einen mit der Induktion von Apoptose-Signalwegen, zum anderen mit Induktion der Zellmigration und verstärktem Nährstofftransport über die Plazenta assoziiert zu sein [42].

In Jeg3-Zelllinien waren oben genannte Proteine nicht signifikant unterschiedlich. Es werden im Proteom keine Hinweise auf eine Aktivierung von Apoptose-assoziierten Zellsignalwegen gefunden.

Die signifikant erhöhte Expression von DBLOH, CASP3 und IGF2R in der Bewo-Zelllinie in niedriger $[Ca^{2+}]$ kann als Anzeichen einer Induktion bestimmter Apoptose-assoziiierter Signalwege interpretiert werden. Dies zeigt, dass die für die Beantwortung der Fragestellung erforderliche Reduktion der $[Ca^{2+}]$ in einem für die Zellen tolerablen Bereich gewählt wird. Bei noch stärker verringerter $[Ca^{2+}]$ würde eine zu weit ausgeprägte Apoptose oder eventuelle Nekrose eine Beobachtung der oben beschriebenen Zellprozesse nicht zulassen, da die Zellen schnell absterben.

5.2.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Effektes einer verringerten Kalziumkonzentration auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien

Eine Verringerung der $[Ca^{2+}]$ in der Bewo-Zelllinie geht einher mit verstärkter Expression von Kalzium-Bindeproteinen, verminderter Expression Zellkontakt assoziierter Proteine, Veränderungen der Zellmorphologie auf mikroskopischer Ebene, Induktion von Ubiquitin-Proteasom Signalwegen, Expression von Enzymen der Cholesterin-synthese sowie verstärkter Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen.

Eine Verringerung der $[Ca^{2+}]$ in der Jeg3-Zelllinie geht einher mit verminderter Expression von Kalzium-Bindeproteinen, verminderter Expression von Zellkontakt-assoziierten Proteinen sowie der Induktion von Ubiquitin-Proteasom-Signalwegen. Es werden keine Hinweise auf eine Induktion der Cholesterin-Synthese oder Apoptose-assoziierten Zellsignalwegen gefunden.

Wie in 2.2.3 erläutert handelt es sich bei Bewo und Jeg3 um unterschiedliche Zelllinien mit unterschiedlichen Proteomen und Eigenschaften, sodass ein direkter Vergleich zwischen den beiden Zelllinien nicht möglich ist. Trotzdem scheinen sich über mehrere Zellsignalwege hinweg unterschiedliche Effekte der beiden Zelllinien in Bezug auf eine Inkubation in Zellkulturmedium mit reduzierter $[Ca^{2+}]$ zu zeigen. Dies könnte sich in einer unterschiedlichen Intensität der Verringerung der Kalzium-Konzentration begründen. Die Bewo-Zelllinie wird standardmäßig in 0,62mM Ca^{2+} kultiviert, es erfolgte eine Reduktion der $[Ca^{2+}]$ auf 0,32 mM Ca^{2+} , was etwa 52% des Ausgangswertes entspricht. Die Jeg3-Zelllinie wird standardmäßig in 1,97mM Ca^{2+} kultiviert, es erfolgte eine Reduktion der $[Ca^{2+}]$ auf 1,37mM Ca^{2+} , was etwa 70% des Ausgangswertes entspricht. Vermutlich war die Reduktion der $[Ca^{2+}]$ in Jeg3 Zellen nicht stark genug, um die in der Bewo-Zelllinie beobachteten Signalwege zu induzieren. Um diese Theorie zu überprüfen könnte man z.B. einen Western-Blot oder eine massenspektrometrische Analyse von Bewo- und Jeg3-Zelllinien unter unterschiedlichen $[Ca^{2+}]$ durchführen und dabei die Detektion der oben beschriebenen Proteine Diablo, Caspase 3 und IGF2R vergleichen.

5.2.3 Einordnung der aufgeführten Effekte durch Reduktion der Kalzium-Konzentration

Die 50%-ige Verringerung der $[Ca^{2+}]$ über 48 Stunden bringt den Kalzium-Haushalt der Bewo Zellen in Dysbalance. Die erhöhte Expression der Kalziumbindeproteine EFHD1, SORCN, SERCA2 und CHERP können als Adaptationsprozesse der Zellorganellen auf die verringerte extrazelluläre Kalziumkonzentration interpretiert werden. Eventuell können SORCN, SERCA2 und CHERP zudem als Hinweis auf ER-Stress interpretiert werden. Die verringerte $[Ca^{2+}]$ geht in der Bewo-Zelllinie mit einer verstärkten Expression der Serinprotease HTRA4 einher. HTRA4 scheint in Struktur und Funktion Überschneidungen mit HTRA1 zu haben und ist in der Lage, beta-Catenine und VE-Cadherine zu degradieren. Die in verringerter $[Ca^{2+}]$ signifikant-verringerten Zellkontakt-assoziierten Proteine DSG2 und CTNB1 könnten Resultat der proteolytischen Aktivität von HTRA4 sein. Ein Hinweis über Degradation von DSG2 durch HTRA4 findet sich in der Literatur nicht, jedoch wäre dies in Anbetracht der strukturellen und funktionellen Überschneidung zu HTRA1 denkbar. Mikroskopisch zeigt sich bei der Bewo-Zelllinie eine Veränderung der Zellmorphologie und Konfluenz in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]$. Die Veränderung der Zellmorphologie könnte in der Verminderung der Zellkontakt-assoziierten Proteine DSG2 und CTNB1 begründet sein. Das signifikant abundante Membranprotein MYOF

könnte an der Veränderung der Zellmorphologie mitwirken. Eine in verminderter $[Ca^{2+}]$ signifikant erhöhte Abundanz der 26s Proteasom PSMC2, PSMC3, PSMC5, PSMD2, PSMD11, der Proteasom-Aktivator-Untereinheit PSME2 sowie des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) UBA1, des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) UFC1 sowie der Ubiquitin-Ligase (E3) LTN1 kann als eine Induktion des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges interpretiert werden. Auf eine ER-Stress-assoziierte Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges über UPR/ ERAD-Kaskaden findet sich kein Hinweis, weil entsprechende Enzyme massenspektrometrisch nicht detektiert wurden. Die signifikante Abundanz der Cholesterinsynthese-assoziierten Enzyme PMVK und IDI1 könnten als Induktion der Cholesterinsynthese interpretiert werden. Für eine weitere Verwendung des Cholesterins z.B. für Vitamin-D, Gallensäure- oder Steroidhormonsynthese findet sich kein Hinweis, weil entsprechende Proteine dieser Signalwege in verringerter $[Ca^{2+}]$ nicht signifikant erhöht sind.

Die Apoptose-assoziierten Proteine Diablo (DBLOH), Caspase 3 (CASP3) und Cation-Independent mannose-6-phosphate receptor (Insulin-like growth factor 2 receptor, IGF2R, MPRI) sind in verringerter $[Ca^{2+}]$ signifikant erhöht. Dies lässt vermuten, dass bei verringerter $[Ca^{2+}]$ Apoptosesignalwege induziert werden. Zudem zeigt dies die erfolgreiche Stimulierung der Zelllinie durch ausreichende Verringerung der extrazellulären $[Ca^{2+}]$ an. Es muss allerdings erwähnt werden, dass die beobachteten Änderungen der Proteinmengen lediglich massenspektrometrisch detektiert werden und einer weiteren Validierung, wie z.B. Western Blot Analysen bedürfen.

5.3 Untersuchung des Effektes von TRPV6 und BlockV6 in Bewo-Zelllinien

5.3.1 Bewo-Zelllinien lassen sich mit TRPV6 transfizieren

Die endogene Expression von TRPV6 ist sehr gering in der Bewo-Zelle (4.1). Um die TRPV6 Expression zu steigern, werden Bewo-Zellen transient mit einem TRPV6-Plasmid transfiziert. Anschließend werden funktionelle Tests durchgeführt.

5.3.2 Die Substanz BlockV6 hat einen hemmenden Effekt auf die TRPV6-Funktion

Die FURA-Messwerte zeigen, dass BlockV6 einen Effekt auf TRPV6 hat. In Bewo-Zellen, in denen TRPV6 transfiziert wird, kann eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]$ um 100% gemessen werden (siehe 4.3). Dies stimmt mit Beschreibungen in der Literatur überein [9,101]. Sobald man BlockV6 (50 μ M) in die Badkammer hinzugibt, verändert sich die $[Ca^{2+}]$ so, dass die Zellen ohne BlockV6 eine höhere $[Ca^{2+}]$ erreichen als Zellen in Gegenwart von BlockV6. Dieser Unterschied ist signifikant. Zudem ist die Steigerung nach Kalzium Depletion und anschließender

Zugabe von Kalzium, als Delta ($f(\max)-f(\min)$) bezeichnet, bei mit BlockV6 inkubierten Zellen deutlich geringer. Somit scheint BlockV6 einen blockierenden Effekt auf TRPV6 zu haben. In Vorexperimenten von PD Dr. Wissenbach wird gezeigt, dass die hier verwendete Konzentration des Antagonisten ($50\mu\text{M}$) bei einer anderen Zelllinie zu einer halb maximalen Hemmung der Kanalaktivität führt. Eine Konzentration von $100\mu\text{M}$ scheint sich toxisch auszuwirken. Abbildung 10 zeigt, dass die Blockierung von TRPV6 bei weitem nicht alle TRPV6-Kanäle zu blockieren scheint. Eine höhere Konzentration von $100\mu\text{M}$ führt in Vorversuchen zum Absterben der Bewo-Zellen.

5.3.3 Es ist keine spezifische Blockierung von endogenem TRPV6-Ionenkanälen in der Bewo-Zelllinie durch BlockV6 feststellbar

Da Bewo-Zelllinien TRPV6 endogen exprimieren wurde versucht den Effekt von endogenem TRPV6 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Zuhilfenahme von BlockV6 zu demonstrieren. Direkt nach Zugabe von BlockV6 zeigt sich im Zeitraum von 120s-360s ein signifikanter Effekt. Die Readdition (der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Chelatierung des Kalziums durch EDTA, ($f(\max)-f(\min)$)) ist allerdings nicht signifikant unterschiedlich. BlockV6 hat somit keinen Effekt auf endogenes TRPV6, schließlich müsste sich ein Effekt von endogenem TRPV6 vor allem im Zeitraum der Readdition zeigen.

Es bleibt zu erörtern, worauf sich der Effekt in der Bewo-Zelllinie nach Zugabe von BlockV6 im Zeitraum 120s-360s zurückführen lässt. Zum einen könnte sich der beobachtete Effekt auf die Blockierung eines anderen (Kationen-) Kanals zurückführen lassen. Somit wäre BlockV6 nicht spezifisch für TRPV6. Zum anderen könnte der Effekt auf einen Scherkraft-abhängigen Kalziumeinstrom bei Bewo-Zellen zurückzuführen sein, welcher durch das Pipettieren entstanden ist. Dass Bewo-Zellen für Flüssigkeits-Scherkräfte sensitiv sind und eine Aktivierung der Mechanosensoren zu Kalziumeinstrom in die Zelle führt, ist bekannt. Sollte TRPV6 an diesem Signalweg beteiligt sein, wie in der Literatur gezeigt, wäre hier eine Blockierung von TRPV6 mit Beendigung des Flüssigkeits-Scherkraft-assoziierten Signalweges denkbar [89].

Offensichtlich lässt sich überexprimiertes TRPV6 Protein durch BlockV6 inaktivieren. BlockV6 zeigt hier die typische Eigenschaft, auch die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu verändern [9,101]. Eine spezifische Blockierung von endogenem TRPV6 in der Zellmembran lässt sich in der Bewo-Zelllinie unter gegebenen Bedingungen nicht zeigen. Dies legt nahe, dass sich zum Zeitpunkt der Messung kein TRPV6-Ionenkanal in der Plasmamembran der Bewo-Zellen befunden hat. Neuere Untersuchungen bekräftigen diese Hypothese und zeigen die Fähigkeit einer schnellen Internalisierung von TRPV6 in Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration [67].

5.4 Untersuchung des Effektes von Forskolin auf Bewo- und Jeg3-Zelllinien

5.4.1 Bewo-Zellen zeigen eine Synzytialisierung

Die Bewo-Zelllinie zeigen im lichtmikroskopischen Bild (4.4.2) eine Vergrößerung der Zellnuclei und Zellsomata nach Forskolin-Stimulation. Die Zellen verschmelzen zu einem Synzytium. Die Jeg3-Zelllinie zeigt diesen Effekt nicht. Deutlicher wird der Unterschied im Immunfluoreszenz-ZO-1-Staining (Abbildung 15 und Abbildung 16). Bewo-Zellen bilden hier Synzytien, mehrere Zellen schließen sich zu einem Zellverband zusammen und die Zellmembranen, die durch das ZO-1 Signal gekennzeichnet sind, verändern ihre Struktur. Bei Jeg3-Zelllinien kann man auch diesen Effekt nicht beobachten, es bleibt bei der ZO-1 Antikörperfärbung das typische kopfsteinpflasterartige Zellmosaik erhalten. In der Proteomanalyse findet sich in beiden Zelllinien kein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen den ZO-1 und ZO-2 Proteinen (siehe 4.4). Eventuell scheint das Verschwinden der Zellgrenzen, die in der Immunfluoreszenz-Analyse beobachtet werden konnte, in einer Umverteilung von ZO-1 begründet zu sein. Spezifische Marker für Synzytialisierung, wie z.B. Syncytin 1 und Syncytin 2 und humanes Choriongonadotropin, können in Bewo-Zellen detektiert werden. In der Analyse von Proteinen, bei denen mindestens ein unabhängiges Peptid pro Protein nachgewiesen wird, ist humanes Choriongonadotropin signifikant erhöht. Syncytin 1 und Syncytin 2 sind bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin exklusiv nachweisbar, aber nicht signifikant erhöht. Eventuell ist hier die Sensitivität zur Detektion der Proteine bei gewähltem Verfahren zu gering [97].

5.4.2 Analyse des Proteoms zeigt verschiedene Zellsignalwege in Bewo- und Jeg3-Zelllinien auf

In den gezeigten Bewo- und Jeg3-Zellversuchen werden die Kulturbedingungen durch Zugabe von Forskolin variiert. Dabei werden auf Basis der Proteomanalyse unterschiedliche Effekte auf verschiedene zelluläre Prozesse beobachtet.

5.4.2.1 *Forskolin induziert die Expression spezifischer plazentarer Proteine*

In Bewo-Zellen werden in Zellen nach Inkubation mit Forskolin plazentare alkalische Phosphatase (PPB1, nicht signifikant) sowie die plazentaassoziierte alkalische Phosphatase (PPBN, nicht signifikant) exklusiv detektiert. Alkalische Phosphatasen werden in vier verschiedene Isoformen eingeteilt, wobei man neben PPB1 und PPBN noch die intestinale alkalische Phosphatase und die Gewebeunspezifische alkalische Phosphatase unterscheidet. PPB1 wird spezifisch in Synzytiotrophoblasten exprimiert [48], während PPBN trotz struktureller

Ähnlichkeiten weniger spezifisch für Synzytiotrophoblasten ist, weil es auch in Keimzellen, Thymus, Hoden und neoplastischen Gewebe detektiert werden kann [116]. In [97] wird zudem über den Effekt von Forskolin auf Bewo-Zelllinien erläutert, dass Forskolin über Protein Kinase A (nicht detektiert) GCM1 (nicht detektiert) aktiviert, was wiederum über die Aktivierung von Syncytin 1 eine Zellfusion herbeiführt, welche einhergeht mit u. a. der deutlich verstärkten Expression von hCG und ALPP (PPB1). Syncytin 1 wird detektiert, ist aber nicht signifikant unterschiedlich. Beta hCG Isoformen (CGB2, 3, 7) sind in der Proteom Analyse der Zellen nach Inkubation mit Forskolin abundant. Neuere Publikationen legen nahe, das auch Syncytin 2 (SYC2 nicht signifikant) an der Fusionierung der Trophoblasten beteiligt sein könnte [137].

Des Weiteren ist der Zinc-Transporter 1 (ZNT1) in Zellen nach Inkubation mit Forskolin abundant. Die vermehrte Expression von ZNT1 durch die Forskolin abhängige cAMP Erhöhung wurde bereits in Bewo-Zellen beschrieben [2]. Zudem wird Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase Isozyme 2 (DHI2, HSD11B2, nicht signifikant) in Zellen nach Inkubation mit Forskolin exklusiv detektiert, welches hauptsächlich in Synzytiotrophoblasten gebildet wird. Es inaktiviert Cortisol zu Cortison und schützt den Embryo so vor erhöhten Cortisolspiegeln. Der Cortisolspiegel ist physiologisch während der Schwangerschaft um das ca. fünffache erhöht, unter anderem um das erhöhte Herzzeitvolumen der Mutter zu gewährleisten. Eine Dysbalance dieses Enzyms sorgt für eine erhöhte Exposition des Embryos von Cortisol, was die Anfälligkeit für verschiedene metabolische und psychologische Krankheiten erhöht [127]. Die DHI2-Expression kann durch unter anderem hCG, Estrogen und Glucocorticoide erhöht werden, während Prostaglandine und Progesteron den gegenteiligen Effekt bewirken. Dies geschieht cAMP-abhängig. Es gib Hinweise, dass cAMP in Trophoblasten den p38 mitogen-activated Protein Kinase Pathway (MAPKP) aktiviert und die Expression der DHI2 demzufolge über cAMP-MAPKP reguliert wird [117].

Bei Jeg3-Zelllinien werden nach Zugabe von Forskolin weniger für die Plazenta spezifische Proteine gefunden. Das oben genannte DHI2 ist bei Jeg3-Zellen signifikant abundant, das beta-hCG (CGB3, nicht signifikant) wird exklusiv detektiert. Jedoch wird kein PPBN, PPB1, Syntaxin oder Syncytin detektiert. Auch ZNT1 wird nicht detektiert.

Sowohl Bewo- als auch Jeg3-Zelllinien zeigen im Schwangerschaftstest einen deutlichen Anstieg der beta-hCG Konzentration im Medium (4.4.1). Dies findet sich in Bewo-Zellen auch in der Proteom-Analyse wieder, in Jeg3-Zellen wird hCG exklusiv, nicht jedoch signifikant erhöht detektiert. Des Weiteren findet sich in Jeg3-Zellen eine Erhöhung der DHI2. In Bewo-Zellen ist DHI2 lediglich exklusiv, nicht jedoch signifikant erhöht. Unterschiede zwischen den Zelllinien bestehen in der fehlenden Expression von Synzytien und Keimzellen assoziierten- oder placentaren alkalischen Phosphatasen in Jeg3-Zellen. Auch wenn der Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Zelllinien auf alleiniger Basis der Proteomanalyse grundsätzlich kritisch zu

betrachten ist, so entspricht es doch den Erwartungen, dass in Jeg3-Zellen keine Synzytine und plazentare alkalische Phosphatasen gefunden werden. Schließlich sind Synzytine an Zell-signalwegen der Synzytialisierung beteiligt [97]. Jedoch bleibt zu erörtern, welcher Pathway in Jeg3-Zellen zur Bildung von hCG und DHI2 verantwortlich ist, wenn nicht die Synzytine dafür verantwortlich gemacht werden können. Eine Aktivierung durch den MAPK-Signalweg wäre hier eine mögliche Hypothese.

5.4.2.2 *Forskolin induziert die Steroidhormonsynthese*

In beiden Zellen werden die Zytochrom P450-Enzyme CP11A und CP19 detektiert. Die Proteine sind in Jeg3 Zellen signifikant unterschiedlich (minimale Anforderung für Proteinidentifikation: zwei individuelle Peptide/Protein). Bei Bewo-Zelllinien ist CP11A in normaler und CP19 in optimierter Auswertung (minimale Anforderung für Proteinidentifikation: ein individuelles Peptid/Protein) signifikant.

CP11A ist auch unter dem Namen Cholesterin-Monooxygenase (*Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme*) bekannt, es induziert die Ablösung der Seitenkette des Cholesterols und katalysiert so den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidhormonsynthese von Cholesterin zu Pregnenolon [131]. Wie zu erwarten wird die *Steroid-17-Hydroxylase* (CP17), welche die Hydroxylierung von Progestagenen zu Dehydroepiandrosteron (DHEAS) und Androstendion katalysiert, nicht in den Zelllinien detektiert. CP17 wird in der Plazenta in nur sehr geringen Mengen exprimiert. Die Plazenta bezieht daher den Großteil der für die Estrogen-Synthese benötigten Substrate DHEAS und Androstendion aus dem Blutkreislauf des Embryos [15]. CP11A kann überdies Vitamin D3 zu 20-Hydroxyvitamin hydroxylieren und ist somit in der Lage in den Vitamin D-Signalweg einzugreifen [131].

CP19 ist auch unter dem Namen Aromatase bekannt. Es ist in der Lage aus C19-Steroiden, gemeinhin Androgene, C18 Steroide, gemeinhin Estrogene, zu bilden. Damit ist die Aromatase in der Lage die Konzentration von Estrogenen im jeweils vorliegenden Gewebe um ein Vielfaches zu erhöhen, ohne dabei die Konzentration von Estrogen im Blutkreislauf ansteigen zu lassen [118]. Eine verstärkte Expression der Aromatase durch Forskolin ist bereits in Jeg3-Zelllinien beschrieben. Die Aromatase wird ubiquitär in vielen Geweben exprimiert. Allerdings scheint verstärkte Expression der Aromatase über den cAMP-Signalweg spezifisch für die Plazenta zu sein (selbiges gilt übrigens für oben angesprochenes beta hCG) [41]. Dies ist auf spezifische in der DNA eingebettete Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (sogenannte cis-acting-elements) in Genom plazentarer Zellen zurückzuführen, welche die Geschwindigkeit der RNA-Polymerase beeinflussen und im vorliegenden Fall im Sinne eines Enhancers verstärken [33]. Auch die Zytochrom p450 Oxidoreduktase (NCPR, POR) war in beiden Zelllinien abundant. Dieses mikrosomale Flavoprotein ist an verschiedenen Reaktionen, unter

anderem der Aromatase, beteiligt. NCPR überträgt Elektronen von NADPH auf die Häm-Gruppe des jeweiligen CYP450 [152]. Ein Defizit an NCPR führt unter anderem zu verminderter Aktivität der Aromatase in der Plazenta, was einhergeht mit der Virilisierung des Embryos und der Mutter. Die Ergebnisse zeigen, dass Forskolin die verstärkte Estrogenbildung und beta-hCG Bildung in Chorionkarzinomzellen über cAMP induzieren könnte. Der Einfluss von Forskolin auf den Vitamin D-Signalweg bleibt unklar.

5.4.2.3 Forskolin induziert den verstärkten Transport von Vesikeln zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi

Vesicle mediated Transport bezeichnet einen intrazellulären Transportvorgang, bei welchem neu synthetisierte Proteine verschiedene Organellen wie z.B. das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in Form von Vesikeln passieren müssen, bis sie intrazellulär mit der Zielmembran oder nach extrazellulär sekretiert werden. Dies geschieht zum einen durch Coat-Proteine, welche die in Vesikeln-befindlichen Proteine von der Membran der Zellorganelle abschnüren, sowie durch Snare-Proteine, welche die Fusion mit Membranen ermöglichen [10]. Erstaunlicherweise wurde nach Forskolin-Inkubation in beiden Zelllinien eine erhöhte Expression von Coat- und Snare-Proteinen gefunden.

Unter den Coat-Proteinen wurden vor allem Proteine aus dem Coat-Protein-Komplex 2 (COP2) detektiert. Dieser Komplex aus verschiedenen Coat-Proteinen sorgt für den Transport von Proteinen vom rauhen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat [10]. Die Proteine SEC23A, SEC23B, SEC16A sowie SAR1B sind in Bewo-Zellen und SEC31, SEC24A, SEC24C sind in Jeg3-Zellen erhöht. Sie zählen zu den COP2-Proteinen. Der Coat-Protein Komplex 1 (COP1) bezeichnet demgegenüber den retrograden Transport von Vesikeln von Golgi zu ER. Coatomer subunit delta (COPD) [121] und ER lumen protein-retaining receptor 1 (ERD21, KDELR1) sind COP1 Proteine [83] und werden in Bewo-Zellen vermehrt exprimiert. SEC21 ist auch Bestandteil des COP1 Komplexes und wird in beiden Zelllinien bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin verstärkt exprimiert [106].

Bezüglich der SNARE-Proteine und SNARE-interacting Proteine sind RAB8A, RAB8B, NSF, STX18 und SCFD1 in Bewo-Zellen erhöht. In Jeg3-Zellen wurden SCFD1 und das GTP-Binding-Protein SAR1B erhöht aufgefunden, welches wie RAB8A und RAB8B unbestimmte Funktionen im Vesicle Budding und Tethering übernehmen. Die Vesicle Fusing ATPase (NSF), ein SNARE-interacting Protein, übernimmt das Recycling von SNARE-Proteinen nach Exozytose der Vesikel [10]. STX18, ein Syntaxin, ist Bestandteil des t-SNARE-Komplexes. In beiden Zelllinien wird das Sec1-domain containing Protein (SCFD1) erhöht detektiert. Dieses Protein aus der Familie der Sec1/Munc18-Familie ist in ER-to-Golgi-Transport involviert und bindet dabei an Syntaxine, unter anderem Syntaxin 18. Zum Beispiel konnte in Zebrafischen gezeigt

werden, das SCFD1 und STX18 an Transport von Prokollagen von ER zu Golgi benötigt werden [50]. Warum VAMP8, ein SNARE-Protein, in Bewo-Zellen bei Zellen nach Inkubation ohne Forskolin abundant war, lässt sich nicht eindeutig nachvollziehen [61].

Der Transport von ER-zu-Golgi scheint sich durch Forskolin in beiden Zelllinien zu erhöhen. Immunzytochemische Lokalisationsstudien könnten hier Aufschluss über die Proteine geben, die sich in den Vesikeln befinden. Denkbar wäre, dass die verstärkte Hormonproduktion eine erhöhtes Transportaufkommen zwischen ER und Golgi notwendig macht. Da Steroidhormone aufgrund ihrer Lipophilie eher passiv durch die Zellmembran diffundieren, wäre hier eventuell der Transport von Peptidhormonen wie z.B. hCG denkbar.

5.4.2.4 Forskolin beeinflusst die Expression Mikrovilli-assoziiierter Proteine

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse werden einige Mikrovilli assoziierte Proteine verstärkt in den mit Forskolin behandelten Zellen nachgewiesen. Mikrovilli determinieren Transportprozesse durch die Vergrößerung der Zelloberfläche. Das in Jeg3 bei Zellen nach Inkubation mit Forskolin hochregulierte Protein Ezrin (EZRI) ist ein typisches Markerprotein für Mikrovilli und ist an dem Prozess der Mikrovillibildung, vor allem in der Plazenta, beteiligt. Die molekulare Funktion von Ezrin besteht in der Verbindung von F-Aktin und der Plasmamembran in Mikrovilli [140]. Auch in Bewo-Zellen findet sich das Protein Pacsin 2 (PACN2), das neben der Endozytose an der apikalen Membran auch Funktionen der Mikrovilliregulierung übernimmt und die Bindung von Dynamin an die Plasmamembran reguliert [104]. Eine Bildung von Mikrovilli, die über eine cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt ist, ist für Synzytiotrophoblasten bekannt [52]. Zudem ist die Neubildung von Mikrovilli in der Bewo-Zelllinie auch nach Reizung mit Flüssigkeits-Scherstress nachgewiesen [89]. Die vermehrte Expression der mikrovilliassoziierten Proteine Ezrin und Pacsin 2 in Zellen nach Inkubation mit Forskolin kann als verstärkte Bildung von Mikrovilli an der apikalen Zellmembran interpretiert werden. Die massenspektrometrischen Ergebnisse korrelieren demnach mit den bereits bekannten Mechanismen der Bildung von Mikrovilli [52,89] bei humanen Synzytiotrophoblasten.

5.4.2.5 Die Bedeutung von HTRA4 für die Forskolin-induzierte Synzytialisierung

Die Serinprotease HTRA4 wird in der mit Forskolin inkubierten Bewo-Zelllinie vermehrt exprimiert. HTRA4 scheint dabei für die Synzytialisierung essentiell zu sein, ein HTRA4-Knockout in Bewo-Zellen zeigt keine Synzytialisierung nach Zugabe von Forskolin [84]. HTRA4 ist in der Lage verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine zu degradieren [120,128]. Es könnte an der Degradation von Cell-Junction-assoziierten Proteinen, während der Synzytialisierung beteiligt sein, schließlich geht eine Synzytialisierung, mit der Verminderung von Cell-Junctions einher.

Die Bewo-Zelllinie ist auf die Zellkultur beschränkt, eine physiologische extrazelluläre Matrix fehlt. Jedoch wäre es, auch in Bezug auf die in 5.2.1.2 beschriebene Ähnlichkeit von HTRA4 zu HTRA1, durchaus möglich, dass HTRA4 auch in physiologischen Trophoblasten an der Degradation von extrazelluläre Matrix-Proteinen in der Plazenta beteiligt ist. Eine physiologische Degradation der EZM könnte somit essenziell für die Synzytialisierung sein. Eine verstärkte Expression von HTRA4, wie sie z.B. in Präeklampsie beschrieben ist, könnte in eine überschießende Degradation der EZM resultieren, was zu Einschränkungen der plazentaren Eigenschaften führen könnte. Es bleibt zu klären, wodurch die Expression von HTRA4 reguliert wird. In 5.2.3 wird in Bezug auf verminderte Kalzium-Konzentrationen eine ER-Stress-assoziierte Induktion diskutiert. In vorliegendem Experiment wirkt Forskolin über die Erhöhung von cAMP. Sowohl für Myoferlin als auch für Endoglin ist eine Induktion der Bildung von Proteasen mit einhergehender Degradation der extrazelluläre Matrix beschrieben, allerdings sind hier vor allem die vermehrte Expression von Metalloproteasen beschrieben [28,98]. Vergleicht man in der Bewo-Zelllinie Zellen nach Inkubation mit Forskolin mit Zellen nach Inkubation ohne Forskolin zeigen sich die Proteasom Untereinheiten PSMD2, PSMD3, PSMD11, PSMC2, PSMC5 sowie das Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 (ATG7) vermehrt exprimiert. Wie in 5.2.1.5 dargelegt, gehören die Proteine dem Ubiquitin-Proteasome-Signalweg an und sind an der ERAD beteiligt. Die Korrelation zwischen der signifikanten Zunahme von HTRA4 und den Proteinen des Ubiquitin-Proteasome-Pathways könnten daher in kausalem Zusammenhang stehen.

5.5 Limitationen

Besonders in Bezug auf massenspektrometrische Untersuchungen müssen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und deren Diskussion zur Einordnung in einen Kontext gesetzt werden. Eine verstärkte Expression einzelner Proteine oder Gruppen von Proteinen aus bestimmten Signalwegen werden in dieser Arbeit oftmals als Hinweis auf eine verstärkte Aktivität ebenjener Proteine oder Signalprozesse gewertet. Grundsätzlich ist dies in der Wissenschaft und Medizin üblich. So wird z.B. ein erhöhtes C-reaktives Protein im Blutbild eines Patienten als ein Hinweis auf Entzündungsprozesse im Körper interpretiert, eine verminderte Konzentration von Hämoglobin im Blutbild zeigt eine verminderte Transportfähigkeit von Sauerstoff im Blut des Patienten an [7,8]. Jedoch ist es auch möglich, dass Proteine in ihrer Quantität stabil bleiben, sich aber in ihrer Aktivität ändern. Eine Limitation der Verwendung der massenspektrometrischen Untersuchung ist, dass Zellprozesse, die einhergehen mit alleiniger Aktivitätsänderung eines Proteins oder eines Zellsignalweges ohne Änderung der Quantität des Proteins, maskiert bleiben. Die massenspektrometrischen Ergebnisse müssten an diesen Stellen durch funktionelle Essays ergänzt werden.

Eine weitere Limitation der Arbeit ergibt sich im Rahmen der Nutzung der SwissProt-Datenbank. Um ein Protein zu detektieren, muss es in der reviewten SwissProt-Datenbank enthalten sein, damit die für die Auswertung verwendeten Programme (Mascot) die massenspektrometrischen Spektren aus den Proben mit denen der Datenbank abgleichen können und schließlich auf die in der Probe enthaltenen Proteine schließen können. Folglich können neue Proteine oder Varianten eines Proteins, die nicht in der Database gelistet sind, auch nicht identifiziert werden. Ebenso können nicht alle möglichen posttranslationalen Modifikationen an Proteinen bei der Datenanalyse umfassend identifiziert werden.

6. Ausblick

Die Erkenntnisse der Arbeit könnten in Beziehung zu verschiedenen Erkrankungen, die während Schwangerschaften auftreten, stehen. Präeklampsie ist eine Schwangerschaftskomplikation, die mit neu aufgetretenem Bluthochdruck und mindestens einer Organmanifestation sowie meistens einer Proteinurie und Ödemen einhergeht. Oftmals geht die Präeklampsie mit intrauteriner Wachstumsverzögerung einher. Die Early-Onset-Präeklampsie, welche als ein Auftreten der Präeklampsie vor der 34. Schwangerschaftswoche definiert ist, ist mit einer Inzidenz von 1% in Westeuropa häufig. Die einzige Therapie in der Behandlung der Präeklampsie ist die Beendigung der Schwangerschaft, meistens mit einem Notkaiserschnitt. Eine gefürchtete Komplikation der Präeklampsie ist das Auftreten eines Krampfanfalls (Eklampsie). Als pathophysiologischer Grund für eine Präeklampsie wird eine Störung der Synzytiotrophoblastenfunktion vermutet. Dabei können Synzytiotrophoblasten auf Grund bestimmter Stimuli Apoptose-assoziierte Stoffe freisetzen, die das Endothel der Mutter stören und so zu besagter Klinik führen [52]. Die Störung des Kalziumhaushaltes des Synzytiotrophoblasten könnte einen starken Einfluss auf die Pathogenese haben, die Kalziumhämostase scheint gestört [40]. ER-Stress-induzierte Apoptosesignalwege könnten an der Pathogenese der Präeklampsie beteiligt sein [3]. Es finden sich auf Ebene des Proteoms Ähnlichkeiten zwischen Synzytiotrophoblasten nach Präeklampsie und Synzytiotrophoblasten nach Inkubation in Medium mit verminderter Kalziumkonzentration. In beiden Gruppen ist zum Beispiel die sarkoplasmatische ATPase 2 (SERCA2) vermindert exprimiert [40]. Zudem wird die Serinprotease HTRA4 in Early-Onset-Präeklampsien vermehrt von Synzytiotrophoblasten exprimiert und findet sich in deutlich erhöhter Konzentration im maternalen Serum. HTRA4 ist in der Lage verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix und des Endothels zu degradieren, allem voran vaskulär-endotheliales-Cadherin und beta-Catenin [55,78,120,128,141]. Eine Hypothese in der Pathogenese der Präeklampsie wäre daher, dass eine erniedrigte Kalzium-Konzentration der Synzytiotrophoblasten mit einer verstärkten Expression der Serinprotease HTRA4 einhergeht, welche dann Catenine und Cadherine der plazentaren extrazelluläre Matrix, an den Zellkontakten

zwischen den Synzytiotrophoblasten sowie dem maternalen Endothel degradiert. Dies würde zur weiteren Schädigung und Funktionsstörung der Synzytiotrophoblasten führen, welche, im Sinne eines Teufelskreises, vermehrt HTRA4 exprimieren. Zudem könnte eine erhöhte HTRA4-Bildung in der Plazenta an der systemischen Endothelstörung, mit den typischen Organmanifestationen der Präeklampsie, beteiligt sein. Dieser theoretische Ansatz würde vor allem die fehlende Therapie und die rapide Aggravation der Präeklampsie erklären. Nicht erklärt werden kann damit jedoch die Expression von HTRA4 während der Forskolin-induzierten Synzytialisierung, welche zwar Assoziationen zum Ubiquitin-Proteasom-Signalweg zeigt, aber mit deutlich weniger Apoptose-assoziierten Proteinen wie Caspase-3 und Diablo vonstattengeht.

HTRA1, wie in 4.2 gezeigt und eng verwandt mit HTRA4, wird vermehrt in der Plazenta eines Kindes das auf beiden TRPV6 Allelen Mutationen-deletiert ist und an neonatalem transienten Hyperparathyreoidismus erkrankt ist gebildet. Bei dieser Erkrankung wird das Skelett aufgrund des zu geringen plazentaren Kalziumtransportes während der Schwangerschaft nur unzureichend mineralisiert [1,85]. Es sollte weitergehend untersucht werden, inwieweit die verminderte Transportkapazität von Kalzium auf eine eingeschränkte Transportfunktion von TRPV6 oder aber auf eine HTRA1 induzierte globale Plazentastörung zurückzuführen ist.

Die Inkubation der Bewo-Zelllinie in Medium mit erniedrigter Kalziumkonzentration eignet sich als Modell zur Untersuchung der Funktion des Synzytiotrophoblasten in Hinblick auf die Regulation des Kalziumhaushaltes, Expression der Protease HTRA4, des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges und Apoptose und Apoptose-assoziiierter Zellsignalwege. Ein TRPV6-Knockout der Bewo-Zelllinie könnte weitere Hinweise über den Mechanismus der Proteasen geben, die extrazelluläre Matrix zu degradieren. Mit Hilfe eines Migrations-Assays könnte die Migrationsaktivität von Bewo-Zellen in Abhängigkeit von TRPV6 untersucht werden.

Die Inkubation der Bewo-Zelllinie mit Forskolin stellt ein Modell für die Untersuchung der Hormonsynthese dar. Die Hormonsynthese der Synzytiotrophoblasten ähnelt der Hormonsynthese des physiologischen Trophoblasten in vielerlei Hinsicht, so dass es sich sehr gut als Modell für die Beobachtung und Untersuchung der plazentaren hormonellen Regulation eignet. Ein Knockout der Bewo-Zelllinie könnte zeigen, ob TRPV6 am Prozess der Synzytialisierung beteiligt ist. Des Weiteren könnte die Inkubation mit Forskolin synzytialisierten Bewo Zellen auf durchlässigen Membranen Aufschluss über weitere Feto-Maternale Transportvorgänge in Abhängigkeit von z.B. verschiedener Ionenkonzentrationen, Fließgeschwindigkeiten oder Drücken geben.

Zudem wäre eine weitere Untersuchung von HTRA4 sinnvoll. Eine systematische Suche nach Substraten, besonders in Endothelien verschiedener Organe, könnte weiteren Aufschluss über

die Funktion von HTRA4 und die Zusammenhänge der daraus resultierenden Pathologien geben.

7. Literaturverzeichnis

1. Almidani E, Elsidawi W, Almohamedi A, Bin Ahmed I, Alfadhel A Case Report of Transient Neonatal Hyperparathyroidism: Medically Free Mother. *Cureus* 12:
2. Asano N, Kondoh M, Ebihara C, Fujii M, Nakanishi T, Utoguchi N, Enomoto S, Tanaka K, Watanabe Y (2006) Induction of zinc transporters by forskolin in human trophoblast BeWo cells. *Reprod Toxicol Elmsford N* 21:285–291
3. Banerjee S, Huang Z, Wang Z, Nakashima A, Saito S, Sharma S, Cheng S (2021) Etiological Value of Sterile Inflammation in Preeclampsia: Is It a Non-Infectious Pregnancy Complication? *Front Cell Infect Microbiol* 11:694298
4. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A (2018) Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem* 87:697–724
5. Belkacemi L, Bédard I, Simoneau L, Lafond J (2005) Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium* 37:1–8
6. Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, Peruch F (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie* 94:1621–1634
7. Billett HH (1990) Hemoglobin and Hematocrit. Butterworths, Boston. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK259/>
8. Black S, Kushner I, Samols D (2004) C-reactive Protein *. *J Biol Chem* 279:48487–48490
9. Bödding M, Flockerzi V (2004) Ca²⁺ Dependence of the Ca²⁺-selective TRPV6 Channel *. *J Biol Chem* 279:36546–36552
10. Bonifacino JS, Glick BS (2004) The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 116:153–166
11. Bots M, Medema JP (2006) Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 119:5011–5014
12. Burren CP, Caswell R, Castle B, Welch CR, Hilliard TN, Smithson SF, 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
13. Cai B, Giridharan SSP, Zhang J, Saxena S, Bahl K, Schmidt JA, Sorgen PL, Guo W, Naslavsky N, Caplan S (2013) Differential Roles of C-terminal Eps15 Homology Domain Proteins as Vesiculators and Tubulators of Recycling Endosomes. *J Biol Chem* 288:30172–30180
14. Campbell ID, Humphries MJ (2011) Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004994

15. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I (2018) Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Front Pharmacol* 9:1027
16. Chemaly ER, Troncone L, Lebeche D (2018) SERCA Control of Cell Death and Survival. *Cell Calcium* 69:46–61
17. Chen X-W, Wang H, Bajaj K, Zhang P, Meng Z-X, Ma D, Bai Y, Liu H-H, Adams E, Baines A, Yu G, Sartor MA, Zhang B, Yi Z, Lin J, Young SG, Schekman R, Ginsburg D (2013) SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. *eLife* 2:e00444
18. Chen Y, Stagg C, Schlessinger D, Nagaraja R (2021) PLAC1 affects cell to cell communication by interacting with the desmosome complex. *Placenta* 110:39–45
19. Chiang JYL (2013) Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol* 3:1191–1212
20. Clausen T, Kaiser M, Huber R, Ehrmann M (2011) HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:152–162
21. Collier JJ, Guissart C, Oláhová M, Sasorith S, Piron-Prunier F, Suomi F, Zhang D, Martinez-Lopez N, Leboucq N, Bahr A, Azzarello-Burri S, Reich S, Schöls L, Polvikoski TM, Meyer P, Larrieu L, Schaefer AM, Alsaif HS, Alyamani S, Zuchner S, Barbosa IA, Deshpande C, Pyle A, Rauch A, Synofzik M, Alkuraya FS, Rivier F, Ryten M, McFarland R, Delahodde A, McWilliams TG, Koenig M, Taylor RW (2021) Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans. *N Engl J Med* 384:2406–2417
22. Collins GA, Goldberg AL (2017) The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169:792–806
23. Colotti G, Poser E, Fiorillo A, Genovese I, Chiarini V, Ilari A (2014) Sorcin, a calcium binding protein involved in the multidrug resistance mechanisms in cancer cells. *Mol Basel Switz* 19:13976–13989
24. Costa S, Cerrone M, Saguner AM, Brunckhorst C, Delmar M, Duru F (2020) Arrhythmogenic cardiomyopathy: An in-depth look at molecular mechanisms and clinical correlates. *Trends Cardiovasc Med*
25. Davis ZH, Mediani L, Antoniani F, Vinet J, Li S, Alberti S, Lu B, Holehouse AS, Carra S, Brandman O (2021) Protein products of nonstop mRNA disrupt nucleolar homeostasis. *Cell Stress Chaperones* 26:549–561
26. Demonbreun AR, McNally EM (2016) Plasma Membrane Repair in Health and Disease. *Curr Top Membr* 77:67–96
27. Dobkin-Bekman M, Naidich M, Rahamim L, Przeddecki F, Almog T, Lim S, Melamed P, Liu P, Wohland T, Yao Z, Seger R, Naor Z (2009) A Preformed Signaling Complex Mediates GnRH-Activated ERK Phosphorylation of Paxillin and FAK at Focal Adhesions in L β T2 Gonadotrope Cells. *Mol Endocrinol* 23:1850–1864
28. Dong Y, Kang H, Liu H, Wang J, Guo Q, Song C, Sun Y, Zhang Y, Zhang H, Zhang Z, Guan H, Fang Z, Li F (2019) Myoferlin, a Membrane Protein with Emerging Oncogenic Roles. *BioMed Res Int* 2019:7365913
29. 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,

- 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
30. Fecher-Trost C, Weissgerber P, Wissenbach U (2014) TRPV6 channels. *Handb Exp Pharmacol* 222:359–384
 31. Fecher-Trost C, Wissenbach U, Weissgerber P (2017) TRPV6: From identification to function. *Cell Calcium* 67:116–122
 32. Fecher-Trost C, Lux F, Busch K-M, Raza A, Winter M, Hielscher F, Belkacemi T, Eerden B van der, Boehm U, Freichel M, Weissgerber P (2019) Maternal Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (Trpv6) Is Involved In Offspring Bone Development. *J Bone Miner Res* 34:e3646
 33. Fenstermaker RA, Milsted A, Virgin JB, Miller WL, Nilson JH (1989) The Transcriptional Response of the Human Chorionic Gonadotropin β -Subunit Gene to cAMP is Cycloheximide Sensitive and is Mediated by cis-Acting Sequences Different from that Found in the α -Subunit Gene. *Mol Endocrinol* 3:1070–1076
 34. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri M, Hengartner M, Abrams J, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G (2008) No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 15:1113–1123
 35. GHARESI-FARD B, ZOLGHADRI J, KAMALI-SARVESTANI E (2014) Alteration in the Expression of Proteins in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss Compared with in the Normal Placenta. *J Reprod Dev* 60:261–267
 36. Goldman S (2007) Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci* 12:634
 37. Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430
 38. Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, Hofmann K (2008) Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33:230–237
 39. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 114:397–407
 40. Haché S, Takser L, LeBellego F, Weiler H, Leduc L, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Barbeau B, Lafond J (2011) Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta. *J Cell Mol Med* 15:654–667
 41. Harada N, Yoshimura N, Honda S (2003) Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:327–334
 42. Harris LK, Crocker IP, Baker PN, Aplin JD, Westwood M (2011) IGF2 Actions on Trophoblast in Human Placenta Are Regulated by the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor, Which Can Function as Both a Signaling and Clearance Receptor. *Biol Reprod* 84:440–446
 43. Hebeda CB, Machado ID, Reif-Silva I, Moreli JB, Oliani SM, Nadkarni S, Perretti M, Bevilacqua E, Farsky SHP (2018) Endogenous annexin A1 (AnxA1) modulates early-phase gestation and offspring sex-ratio skewing. *J Cell Physiol* 233:6591–6603

44. Hemberger M, Hanna CW, Dean W (2020) Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nat Rev Genet* 21:27–43
45. Hetz C, Papa FR (2018) The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69:169–181
46. Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bödding M, Nastainczyk W, Wissenbach U, Flockerzi V, Freichel M (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* 33:509–518
47. Hirota J, Furuichi T, Mikoshiba K (1999) Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 Is a Substrate for Caspase-3 and Is Cleaved during Apoptosis in a Caspase-3-dependent Manner *. *J Biol Chem* 274:34433–34437
48. Hirschmugl B, Crozier S, Matthews N, Kitzinger E, Klymiuk I, Inskip HM, Harvey NC, Cooper C, Sibley CP, Glazier J, Wadsack C, Godfrey KM, Desoye G, Lewis RM (2018) Relation of placental alkaline phosphatase expression in human term placenta to maternal and offspring fat mass. *Int J Obes* 2018 42:1202–1210
49. Hosobuchi M, Kreis T, Schekman R (1992) SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature* 360:603–605
50. Hou N, Yang Y, Scott IC, Lou X (2017) The Sec domain protein Scfd1 facilitates trafficking of ECM components during chondrogenesis. *Dev Biol* 421:8–15
51. Hou T, Jian C, Xu J, Huang AY, Xi J, Hu K, Wei L, Cheng H, Wang X (2016) Identification of EFHD1 as a novel Ca²⁺ sensor for mitoflash activation. *Cell Calcium* 59:262–270
52. Huppertz B, Schleußner E, Herausgeber (2018) *Die Plazenta*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
53. Huxham J, Tabariès S, Siegel PM (2021) Afadin (AF6) in cancer progression: A multidomain scaffold protein with complex and contradictory roles. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 43:e2000221
54. Illsley NP, Baumann MU (2020) Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866:165359
55. Inagaki A, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inuzuka H, Miyamura H, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y (2012) Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta* 33:919–926
56. Jansson T (2001) Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr Res* 49:141–147
57. Jia L, Shi Y, Wen Y, Li W, Feng J, Chen C (2018) The roles of TNFAIP2 in cancers and infectious diseases. *J Cell Mol Med* 22:5188–5195
58. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:557–568
59. Jing J, Wang B, Liu P (2019) The Functional Role of SEC23 in Vesicle Transportation, Autophagy and Cancer. *Int J Biol Sci* 15:2419–2426

60. Joazeiro CAP (2019) Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:368–383
61. Jones LC, Moussa L, Fulcher ML, Zhu Y, Hudson EJ, O'Neal WK, Randell SH, Lazarowski ER, Boucher RC, Kreda SM (2012) VAMP8 is a vesicle SNARE that regulates mucin secretion in airway goblet cells. *J Physiol* 590:545–562
62. Kanayama HO, Tamura T, Ugai S, Kagawa S, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms. *Eur J Biochem* 206:567–578
63. Katoh K, Shibata H, Suzuki H, Nara A, Ishidoh K, Kominami E, Yoshimori T, Maki M (2003) The ALG-2-interacting Protein Alix Associates with CHMP4b, a Human Homologue of Yeast Snf7 That Is Involved in Multivesicular Body Sorting *. *J Biol Chem* 278:39104–39113
64. Kawamura E, Hamilton GB, Miskiewicz EI, MacPhee DJ (2018) Fermitin family homolog-2 (FERMT2) is highly expressed in human placental villi and modulates trophoblast invasion. *BMC Dev Biol* 18:19
65. Kimata Y, Higashio H, Kohno K (2000) Impaired Proteasome Function Rescues Thermosensitivity of Yeast Cells Lacking the Coatamer Subunit ϵ -COP *. *J Biol Chem* 275:10655–10660
66. Kirsten ML, Baron RA, Seabra MC, Ces O (2013) Rab1a and Rab5a preferentially bind to binary lipid compositions with higher stored curvature elastic energy. *Mol Membr Biol* 30:303–314
67. Kogel A, Fecher-Trost C, Wissenbach U, Flockerzi V, Schaefer M (2022) Ca²⁺ transport via TRPV6 is regulated by rapid internalization of the channel. *Cell Calcium* 106:102634
68. KOHLER PO, BRIDSON WE (1971) Isolation of Hormone-Producing Clonal Lines of Human Choriocarcinoma1. *J Clin Endocrinol Metab* 32:683–687
69. Lambers TT, Weidema AF, Nilius B, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2004) Regulation of the Mouse Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor Calmodulin *. *J Biol Chem* 279:28855–28861
70. Lau ASN, Mruk DD (2003) Rab8B GTPase and junction dynamics in the testis. *Endocrinology* 144:1549–1563
71. Lebeau PF, Platko K, Byun JH, Austin RC (2021) Calcium as a reliable marker for the quantitative assessment of endoplasmic reticulum stress in live cells. *J Biol Chem* 296:100779
72. Lee J, Moon S, Cha Y, Chung YD (2010) Drosophila TRPN(=NOMPC) Channel Localizes to the Distal End of Mechanosensory Cilia. *PLoS ONE* 5:e11012
73. Li J, Belogortseva N, Porter D, Park M (2008) Chmp1A functions as a novel tumor suppressor gene in human embryonic kidney and ductal pancreatic tumor cells. *Cell Cycle* 7:2886–2893
74. Li Z, Meng Z, Lu J, Chen FM, Wong W-T, Tse G, Zheng C, Keung W, Tse K, Li RA, Jiang L, Yao X (2018) TRPV6 protects ER stress-induced apoptosis via ATF6 α -TRPV6-

- JNK pathway in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 120:1–11
75. LiCalsi C, Christophe S, Steger DJ, Buescher M, Fischer W, Mellon PL (2000) AP-2 family members regulate basal and cAMP-induced expression of human chorionic gonadotropin. *Nucleic Acids Res* 28:1036–1043
 76. Lin-Moshier Y, Sebastian PJ, Higgins L, Sampson ND, Hewitt JE, Marchant JS (2013) Re-evaluation of the Role of Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein (CHERP) in Cellular Calcium Signaling. *J Biol Chem* 288:355–367
 77. Lin-Moshier Y, Sebastian PJ, Higgins L, Sampson ND, Hewitt JE, Marchant JS (2013) Re-evaluation of the Role of Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein (CHERP) in Cellular Calcium Signaling. *J Biol Chem* 288:355–367
 78. Liu C, Xing F, He Y, Zong S, Luo C, Li C, Duan T, Wang K, Zhou Q (2018) Elevated HTRA1 and HTRA4 in severe preeclampsia and their roles in trophoblast functions. *Mol Med Rep* 18:2937–2944
 79. Liu Y, Sun B, Zhao X, Gu Q, Liu Z-Y, Dong X-Y, Che N, Mo J (2013) Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res* 23:243–253
 80. López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, López E (2017) Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* 10:50
 81. Lowe SL, Wong SH, Hong W (1996) The mammalian ARF-like protein 1 (Arl1) is associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* 109:209–220
 82. Lüthi AU, Martin SJ (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14:641–650
 83. Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Soeling H-D (2001) KDEL-Cargo Regulates Interactions between Proteins Involved in COPI Vesicle Traffic: Measurements in Living Cells Using FRET. *Dev Cell* 1:139–153
 84. Mansilla M, Wang Y, Lim R, Palmer K, Nie G (2021) HtrA4 is up-regulated during trophoblast syncytialization and BeWo cells fail to syncytialize without HtrA4. *Sci Rep* 11:14363
 85. Mason AE, Grier D, Smithson SF, Burren CP, Gradhand E (2020) Post-mortem histology in transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6) under-mineralising skeletal dysplasia suggests postnatal skeletal recovery: a case report. *BMC Med Genet* 21:
 86. Mazzorana M, Sørensen TL-M (2019) Calcium-Induced Protein Folding in Calumenin and Calmodulin. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1929:517–537
 87. Mi H, Ebert D, Muruganujan A, Mills C, Albou L-P, Mushayamaha T, Thomas PD (2021) PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res* 49:D394–D403
 88. Miura M, Chen X-D, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo B-M, Lakhani S, Flavell RA, Feng X-H, Robey PG, Young M, Shi S (2004) A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 114:1704–1713

89. Miura S, Sato K, Kato-Negishi M, Teshima T, Takeuchi S (2015) Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6. *Nat Commun* 6:
90. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis: CYTOCHROME c-INDEPENDENT ACTIVATION OF CASPASE-9 BY CASPASE-12 *. *J Biol Chem* 277:34287–34294
91. Msheik H, El Hayek S, Bari MF, Azar J, Abou-Kheir W, Kobeissy F, Vatish M, Daoud G (2019) Transcriptomic profiling of trophoblast fusion using BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol Hum Reprod* 25:811–824
92. Mun SA, Park J, Park KR, Lee Y, Kang JY, Park T, Jin M, Yang J, Jun C-D, Eom SH (2020) Structural and Biochemical Characterization of EFhd1/Swiprosin-2, an Actin-Binding Protein in Mitochondria. *Front Cell Dev Biol* 8:628222
93. Nair R, Maseeh A (2012) Vitamin D: The “sunshine” vitamin. *J Pharmacol Pharmacother* 3:118–126
94. Nett V, Erhardt N, Wyatt A, Wissenbach U (2021) Human TRPV6-pathies caused by gene mutations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865:129873
95. Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V, Trost C (2001) Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3600–3605
96. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001) Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400–1408
97. Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B (2010) The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 140:759–766
98. Oxmann D, Held-Feindt J, Stark AM, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R (2008) Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene* 27:3567–3575
99. Pattillo RA, Gey GO (1968) The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro. *Cancer Res* 28:1231–1236
100. Pattillo RA, Gey GO (1968) The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro. *Cancer Res* 28:1231–1236
101. Peters AA, Simpson PT, Bassett JJ, Lee JM, Silva LD, Reid LE, Song S, Parat M-O, Lakhani SR, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2012) Calcium Channel TRPV6 as a Potential Therapeutic Target in Estrogen Receptor–Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 11:2158–2168
102. Pilloff D, Dabovic K, Romanowski MJ, Bonanno JB, Doherty M, Burley SK, Leyh TS (2003) The Kinetic Mechanism of Phosphomevalonate Kinase*. *J Biol Chem* 278:4510–4515
103. Pitter B, Werner A-C, Montanez E (2018) Parvins Are Required for Endothelial Cell-Cell Junctions and Cell Polarity During Embryonic Blood Vessel Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38:1147–1158

104. Postema MM, Grega-Larson NE, Meenderink LM, Tyska MJ (2019) PACSIN2-dependent apical endocytosis regulates the morphology of epithelial microvilli. *Mol Biol Cell* 30:2515–2526
105. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647
106. Sandmann T, Herrmann JM, Dengjel J, Schwarz H, Spang A (2003) Suppression of Coatamer Mutants by a New Protein Family with COPI and COPII Binding Motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14:3097–3113
107. Sané A, Seidman E, Spahis S, Lamantia V, Garofalo C, Montoudis A, Marcil V, Levy E (2015) New Insights In Intestinal Sar1B GTPase Regulation and Role in Cholesterol Homeostasis. *J Cell Biochem* 116:2270–2282
108. Schanton M, Maymó JL, Pérez-Pérez A, Sánchez-Margalet V, Varone CL (2018) Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. *Reproduction* 155:R1–R12
109. Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck K-H (2019) Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 194:105439
110. Schneider H, Luckhardt* M (1989) Entwicklung der Plazenta und des utero-plazentaren Kreislaufes aus morphologischer und funktioneller Sicht. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 49:843–851
111. Schoonderwoerd MJA, Goumans M-JTH, Hawinkels LJAC (2020) Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* 10:289
112. Schulman BA, Harper JW (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:319–331
113. Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 9:818–831
114. Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauß B, Philipp SE, Flockerzi V, Hoth M (2006) TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* 39:163–173
115. Sepulveda JL, Wu C (2006) The parvins. *Cell Mol Life Sci* 63:25–35
116. Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J Clin Biochem* 29:269–278
117. Shu Q, Li W, Li J, Wang W, Liu C, Sun K (2014) Cross-Talk between cAMP and MAPK Pathways in HSD11B2 Induction by hCG in Placental Trophoblasts. *PLoS ONE* 9:e107938
118. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2002) Aromatase—A Brief Overview. *Annu Rev Physiol* 64:93–127

119. Singh AK, McGoldrick LL, Twomey EC, Sobolevsky AI (2018) Mechanism of calmodulin inactivation of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *Sci Adv* 4:eaau6088
120. Singh H, Zhao M, Chen Q, Wang Y, Li Y, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S, Nie G (2015) Human HtrA4 Expression Is Restricted to the Placenta, Is Significantly Up-Regulated in Early-Onset Preeclampsia, and High Levels of HtrA4 Cause Endothelial Dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E936–E945
121. Stenbeck G, Harter C, Brecht A, Herrmann D, Lottspeich F, Orci L, Wieland FT (1993) beta'-COP, a novel subunit of coatamer. *EMBO J* 12:2841–2845
122. Sullivan MHF (2004) Endocrine cell lines from the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 228:103–119
123. Sun L, Ye Y, Sun H, Yu J, Zhang L, Sun Y, Zhang D, Ma L, Shen B, Zhu C (2013) Identification of Proteasome Subunit Beta Type 6 (PSMB6) Associated with Deltamethrin Resistance in Mosquitoes by Proteomic and Bioassay Analyses. *PLoS ONE* 8:e65859
124. 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, Nishimura G (2018) TRPV6 Variants Interfere with Maternal-Fetal Calcium Transport through the Placenta and Cause Transient Neonatal Hypoparathyroidism. *Am J Hum Genet* 102:1104–1114
125. Tang BL, Zhang T, Low DYH, Wong ET, Horstmann H, Hong W (2000) Mammalian Homologues of Yeast Sec31p: AN UBIQUITOUSLY EXPRESSED FORM IS LOCALIZED TO ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) EXIT SITES AND IS ESSENTIAL FOR ER-GOLGI TRANSPORT *. *J Biol Chem* 275:13597–13604
126. Terakawa Y, Agnihotri S, Golbourn B, Nadi M, Sabha N, Smith CA, Croul SE, Rutka JT (2013) The role of drebrin in glioma migration and invasion. *Exp Cell Res* 319:517–528
127. Togher KL, Togher KL, O'Keeffe MM, O'Keeffe MM, Khashan AS, Khashan AS, Gutierrez H, Gutierrez H, Kenny LC, Kenny LC, O'Keeffe GW, O'Keeffe GW (2014) Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development. *Epigenetics* 9:816–822
128. Tseng E, Yee Teoh SS, Wang Y, Nie G (2019) Elevated protease HtrA4 in the maternal circulation of preeclampsia may contribute to endothelial barrier disruption by cleaving key junctional protein VE-cadherin. *Placenta* 76:51–53
129. Tsuchida N, Kunishita Y, Uchiyama Y, Kirino Y, Enaka M, Yamaguchi Y, Taguri M, Yamanaka S, Takase-Minegishi K, Yoshimi R, Fujii S, Nakajima H, Matsumoto N (2021) Pathogenic UBA1 variants associated with VEXAS syndrome in Japanese patients with relapsing polyarthritidis. *Ann Rheum Dis* annrheumdis-2021-220089
130. Tuckey RC (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26:273–281
131. Tuckey RC, Li W, Zjawiony JK, Zmijewski MA, Nguyen MN, Sweatman T, Miller D, Slominski A (2008) Pathways and products for the metabolism of vitamin D3 by cytochrome P450scc. *FEBS J* 275:2585–2596
132. Turco MY, Moffett A (2019) Development of the human placenta. *Development* 146:
133. Ulfing N (2019) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5. Auflage edition. Thieme, Stuttgart

134. Uraoka N, Oue N, Sakamoto N, Sentani K, Oo HZ, Naito Y, Noguchi T, Yasui W (2014) NRD1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. *Cancer Sci* 105:134–140
135. van der Wal T, van Amerongen R (2020) Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for β -catenin. *Open Biol* 10:200267
136. Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J (2011) The Ca²⁺ Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004184
137. Vargas A, Moreau J, Landry S, LeBellego F, Toufaily C, Rassart É, Lafond J, Barbeau B (2009) Syncytin-2 Plays an Important Role in the Fusion of Human Trophoblast Cells. *J Mol Biol* 392:301–318
138. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 102:43–53
139. Vincent S, Settleman J (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol* 17:2247–2256
140. Viswanatha R, Bretscher A, Garbett D (2014) Dynamics of ezrin and EBP50 in regulating microvilli on the apical aspect of epithelial cells. *Biochem Soc Trans* 42:189–194
141. Wang Y, Lim R, Nie G (2019) HtrA4 may play a major role in inhibiting endothelial repair in pregnancy complication preeclampsia. *Sci Rep* 9:2728
142. Winter L, Wiche G (2013) The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol (Berl)* 125:77–93
143. Winter M, Weissgerber P, Klein K, Lux F, Yildiz D, Wissenbach U, Philipp SE, Meyer MR, Flockerzi V, Fecher-Trost C (2020) Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) Proteins Control the Extracellular Matrix Structure of the Placental Labyrinth. *Int J Mol Sci* 21:E9674
144. Winter M (2021) Über die physiologische Funktion von TRPV6-Ionenkanälen in Plazenta, Eihülle und Uterus. Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)
145. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, 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
146. Witte K, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, Yates JR, Eimer S, Audhya A (2011) Mechanisms by which TFG functions in protein secretion and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 13:550–558
147. Wolske K, Fecher-Trost C, Wesely C, Löhr H, Philipp S, Belkacemi A, Pacheco G, Wissenbach U (2020) Why endogenous TRPV6 currents are not detectable-what can we learn from bats? *Cell Calcium* 92:102302
148. Wong LH, Flibotte S, Sinha S, Chiang J, Giaever G, Nislow C (2017) Genome-Wide Screen Reveals sec21 Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Are Methotrexate-Resistant. *G3 GenesGenomesGenetics* 7:1251–1257

149. Yazgili AS, Ebstein F, Meiners S (2022) The Proteasome Activator PA200/PSME4: An Emerging New Player in Health and Disease. *Biomolecules* 12:1150
150. Yelshanskaya MV, Nadezhdin KD, Kurnikova MG, Sobolevsky AI (2021) Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *J Physiol* 599:2673–2697
151. Yuen T, Choi SG, Pincas H, Waring DW, Sealfon SC, Turgeon JL (2012) Optimized amplification and single-cell analysis identify GnRH-mediated activation of Rap1b in primary rat gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 350:10–19
152. Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138:103–141
153. Zeng Z-Z, Yao H, Staszewski ED, Rockwood KF, Markwart SM, Fay KS, Spalding AC, Livant DL (2009) $\alpha 5\beta 1$ Integrin Ligand PHSRN Induces Invasion and $\alpha 5$ mRNA in Endothelial Cells to Stimulate Angiogenesis. *Transl Oncol* 2:8–20
154. Zhang W, Na T, Wu G, Jing H, Peng J-B (2010) Down-regulation of Intestinal Apical Calcium Entry Channel TRPV6 by Ubiquitin E3 Ligase Nedd4-2. *J Biol Chem* 285:36586–36596
155. Zhao X-Y, Wang X-Y, Wei Q-Y, Xu Y-M, Lau ATY (2020) Potency and Selectivity of SMAC/DIABLO Mimetics in Solid Tumor Therapy. *Cells* 9:1012
156. Zhao Y-Y, Lin Y-Q, Xu Y-O (2018) Functional Identification of Allograft Inflammatory Factor 1-Like Gene in Luning Chicken. *Anim Biotechnol* 29:234–240
157. (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 123:1365–1371
158. (2021) Draw Venn Diagram. URL: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

8. Publikation

Fecher-Trost C, Wolske K, Wesely C, Löhr H, Klawitter DS, Weissgerber P, Gradhand E, Burren CP, Mason AE, Winter M, 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* 22:12694

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

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

Tag der Promotion: 24.07.2024

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D Menger

Berichterstatter: PD Dr. Ulrich Wissenbach

Prof. Dr. Dieter Bruns