

Einfluss der TRPV6-Expression auf endokrine Funktionen und den Calciumhaushalt in einer humanen Trophoblastenzelllinie

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

Anna-Lena Gehl

Saarbrücken

2025

Tag des Kolloquiums: 13.11.2025

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus R. Meyer

Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer

Akad. Mitglied: Priv.-Doz. Dr. Martin Frotscher

Vorsitz: Prof. Dr. Andriy Luzhetskyy

Vorwort

Die nachfolgende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Markus R. Meyer und Frau Dr. Claudia Fecher-Trost in der Abteilung für Experimentelle und Klinische Toxikologie der Fachrichtung Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes in Homburg von Januar 2022 bis Juli 2025.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab publiziert:

- The proteomic landscape of trophoblasts unravels calcium-dependent syncytialization processes and beta-chorionic gonadotropin (β -hCG) production, Gehl, AL., Klawitter, D., Wissenbach, U. et al., Reprod Biol Endocrinol, 2025. (DOI: 10.1186/s12958-025-01362-7)

Ergebnisse angrenzender Studien, die über den hier dargestellten Umfang hinausgehen, befinden sich derzeit im Peer-Review-Prozess:

- Endometrial epithelial cell Ca^{2+} signaling and female mouse fecundity depend on TRPV6, Sota, A., Beck, A., Wartenberg, A., Gehl, A-L. et al., eingereicht bei Cell Mol Life Sci, 2025

*Diese Arbeit ist meiner Mutter gewidmet – für ihre Geduld, Liebe und
Unterstützung*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Markus R. Meyer, der die Betreuung meiner Dissertation übernommen und mir damit die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Für das entgegengebrachte Vertrauen, die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie die engagierte und stets verlässliche fachliche Begleitung bin ich ihm sehr dankbar. Besonders zu schätzen lernte ich die stets offene und kollegiale Arbeitsatmosphäre und konstruktive Unterstützung, die maßgeblich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben. Zudem danke ich Frau Univ.-Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer für die Übernahme des Koreferats.

Ein ebenso großer Dank gilt Frau Dr. Claudia Fecher-Trost, die mir das Thema dieser Arbeit anvertraut und mich während der gesamten Promotionszeit mit großem Engagement und Fachkenntnis betreut hat. Für ihre jederzeit offene Haltung gegenüber Fragen, Diskussionen und konstruktivem Austausch bin ich ihr besonders dankbar. Unsere enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit sowie das ausgezeichnete persönliche Miteinander haben die gemeinsame Arbeit nicht nur inhaltlich bereichert, sondern auch menschlich sehr wertvoll gemacht. Durch ihre Unterstützung und ihr stetiges Engagement wurde diese Dissertation in ihrer jetzigen Form überhaupt erst möglich.

Zudem gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Ulrich Wissenbach für die fachliche Begleitung meiner Arbeit und seine stets offene Diskussionsbereitschaft. Besonders wertvoll war für mich der gemeinsame fachliche Austausch, auch über das eigentliche Thema hinaus, der neue Perspektiven eröffnete und das Verständnis vieler Zusammenhänge vertieft hat. Darüber hinaus möchte ich Herrn Professor Dr. Veit Flockerzi für die Möglichkeit danken, meine experimentellen Arbeiten in den Laboren der Pharmakologie durchführen zu dürfen, sowie für seinen konstruktiven fachlichen Input im Verlauf der Arbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Pharmakologie und Toxikologie danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, den offenen wissenschaftlichen Austausch sowie die stets angenehme und kollegiale Zusammenarbeit, auch in herausfordernden Phasen. Ihre Unterstützung, ihr Teamgeist und ihre fachliche Expertise haben wesentlich zu einer produktiven und motivierenden Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Marnie Cole, mit der ich die meiste Zeit im Labor verbracht habe. Gemeinsam haben wir uns durch den Laboralltag gekämpft, mit ihrer Vielseitigkeit, Hilfsbereitschaft und ihrem Humor war sie nicht nur eine verlässliche Kollegin, sondern ist mir auch eine gute Freundin geworden. Ihr unermüdlicher Einsatz und ihre positive Art haben viele herausfordernde Tage deutlich leichter gemacht. Auch Christine Wesely danke ich herzlich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Ihre Geduld, ihr Können, insbesondere am

Western Blot, sowie die zahlreichen schönen Momente haben die Arbeitstage stets bereichert. Heidi Löhr hat mich mit viel Geduld und Fachwissen in die Kunst der Zellkultur eingeführt. Die Zeit mit ihr war nicht nur lehrreich, sondern auch menschlich sehr angenehm. PD Dr. Andreas Beck danke ich für seine Anleitung im Bereich des Calciumimaging sowie für seine verlässliche Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und strukturierten Auswertungen. Mein Dank gilt außerdem PD Dr. Stephan Philipp für seine konstruktiven Beiträge in den Arbeitsseminaren sowie Frau Prof. Dr. Daniela Yildiz und ihrem Team für ihren hilfreichen Input im Rahmen wissenschaftlicher Diskussionen. Stefanie Buchholz danke ich für ihre Unterstützung und Expertise bei der Durchführung der PCR-Experimente.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der Abteilung für Toxikologie, die meine eher fachfremden Beiträge im Rahmen der Arbeitsseminare mit Offenheit und Interesse begleitet haben. Ihr Input, insbesondere im Bereich der massenspektrometrischen Analytik, hat die Arbeit inhaltlich bereichert. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Lea Wagmann und Herrn Sascha Manier für ihre wissenschaftliche Expertise und ihre Bereitschaft zu konstruktivem Austausch. Frau Aline Vollmer danke ich herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, sie stand mir bei Fragen jederzeit zuverlässig zur Seite.

Herrn Armin A. Weber, Herrn Carsten Schröder, Herrn Martin Simon-Thomas und Frau Kathrin Schetting danke ich für die ständige Einsatzbereitschaft und die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Meinen Freundinnen und Freunden danke ich für ihre Geduld und ihre beständige Unterstützung. Ihre Offenheit, ihr Humor und ihr Mitfiebern haben mir oft neuen Mut gegeben. Meinem Partner Florian danke ich für seine Geduld, seine Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit und dafür, dass er mir stets mit Ruhe und Verständnis zur Seite stand.

Die letzten Zeilen dieser Danksagung gehören meiner Familie. Liebe Mama, lieber Papa, liebe Aline und liebe Leonie, ihr wart in jeder Phase dieser Arbeit meine Konstante. Mit eurem Vertrauen, eurer Geduld und eurer unermüdlichen Unterstützung habt ihr mir stets den Rücken freigehalten und mich ermutigt, meinen eigenen Weg zu gehen, selbst in schwierigen Zeiten. Dafür danke ich euch von Herzen.

„In nature, nothing exists alone.“

Rachel Carson, Silent Spring (1962)

Zusammenfassung

Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) ist ein hochselektiver Calciumkanal, der in epithelartigen Geweben und in Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird, wo er zur Calciumhomöostase zwischen Mutter und Fetus beiträgt. Da TRPV6-Knockouts mit Schwangerschaftspathologien wie dem transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus assoziiert sind, war es Ziel dieser Arbeit, die funktionelle Bedeutung von TRPV6 in Trophoblasten näher zu untersuchen. Hierzu wurden genetisch modifizierte BeWo-Zelllinien erzeugt: ein Knockoutklon (D10) ohne TRPV6-Expression sowie ein Überexpressionsklon (E10) mit verkürztem TRPV6-Protein. In TRPV6-defizienten Zellen zeigten sich eine reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration, Veränderungen der Zellmorphologie sowie eine stark eingeschränkte Hormonsekretion, bei erhaltener Synzytialisierungsfähigkeit. Proteomische Analysen bestätigten diese Befunde durch eine kompensatorische Hochregulation calciumsensitiver Proteine und eine verminderte Expression steroidogener Schlüsselenzyme (CYP19A1, HSD11B2). Die durch Forskolin aktivierte Signaltransduktion konnte hormonelle Defizite größtenteils ausgleichen. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von TRPV6 kaum funktionelle Effekte. Insgesamt deutet dies auf eine modulierende Rolle von TRPV6 in der hormonellen Regulation hin, die über seine Bedeutung im Calciumtransport hinausgeht und möglicherweise zur Pathogenese schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen beiträgt.

Summary

Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) is a highly selective calcium channel expressed in epithelial-like tissues, including placental trophoblasts, where it contributes to calcium homeostasis between mother and fetus. Since TRPV6 knockouts have been linked to pregnancy-related pathologies such as transient neonatal hyperparathyroidism, this study aimed to investigate the functional role of TRPV6 in trophoblasts. For this purpose, genetically modified BeWo cell lines were generated: a knockout clone (D10) lacking TRPV6 expression and an overexpression clone (E10) expressing a truncated TRPV6 protein. TRPV6-deficient cells showed reduced intracellular calcium levels, altered morphology, and markedly decreased hormone secretion, while their ability to form syncytia remained intact, suggesting compensatory mechanisms via alternative calcium pathways. Proteomic profiling confirmed these findings, revealing upregulation of calcium-associated proteins and reduced expression of key steroidogenic enzymes (CYP19A1, HSD11B2). Signal transduction triggered by forskolin was largely able to compensate for hormonal deficiencies. In contrast, TRPV6 overexpression had minimal functional effects. These results suggest that TRPV6 not only regulates calcium dynamics but also modulates placental endocrine function, and its loss may contribute to pregnancy-related disorders.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Frühe Embryonalentwicklung beim Menschen.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plazenta mit typischen Entwicklungsstadien ..	3
Abbildung 3: Hormonspiegel von hCG, Progesteron und Estradiol während der Schwangerschaft	7
Abbildung 4: Dendrogramm der sieben Subfamilien der TRP-Kanäle	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der differenziellen Translationsinitiation in der Fledermaus und im Menschen	12
Abbildung 6: Verschiedene Perspektiven der TRPV6-Kanalstruktur: Kristallstruktur und schematische Domänenorganisation.....	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Permeabilitätsmessung	27
Abbildung 8: Experimenteller Aufbau der siRNA Transfektion zur Suppression der TRPV6 mRNA in BeWo Wildtyp-Zellen.....	30
Abbildung 9: Zona occludens-1 (ZO-1) Immunfärbung und Hormonsekretion Zyto (DMSO)- und Synzytiotrophoblast (FSK)-artiger BeWo Wildtypzellen kultiviert mit 0,35mM (L) oder 0,94mM (N) calciumhaltigen Medium	43
Abbildung 10: Analyse FSK induzierter Proteinexpression und der Calciumabhängigkeit.	45
Abbildung 11: Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der <i>TRPV6</i> BeWo- Zellmutanten die durch CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung generiert wurden	48
Abbildung 12: Quantifizierung des TRPV6 Proteins nach Immunpräzipitation (IP) in BeWo-Zellwildtyp und BeWo CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10.....	51
Abbildung 13: Quantifizierung des TRPV6 Proteins nach IP in BeWo-Zellwildtyp und BeWo CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10 nach FSK vermittelter Bildung von Synzytiotrophoblast-artigen Zellen	53
Abbildung 14: Pappenheim-Färbung der BeWo-Zellklone nach 24h-Inkubation von 120.000 BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zellen.....	54
Abbildung 15: Visualisierung der Synzytialisierung mittels ZO-1 Immunfärbung. Inkubation der BeWo-Zellklone +DMSO/FSK für 48h	55
Abbildung 16: Vergleichende Analyse der Zellkerngrößen der BeWo-Zelllinien WT (schwarz), D10 (rot) und E10 (blau) nach DAPI-Färbung.....	56

Abbildung 17: Zytosolische Calcium-Konzentrationsunterschiede zwischen BeWo-Zelllinien	57
Abbildung 18: Überprüfung der Substratpermeabilität von Albumin und Dextran durch Monoschicht von BeWo-Zellklonen	59
Abbildung 19: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β -hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h mit 30 μ M FSK in 0,45% DMSO oder nur mit 0,45% DMSO	60
Abbildung 20: Durchführung eines kommerziellen Schwangerschaftstests zum Nachweis von humanem Choriongonadotropin (hCG) im Zellkulturüberstand DMSO-stimulierter BeWo-Zellklone (48h)	61
Abbildung 21: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β -hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h in 0,45% DMSO, repräsentativ für plazentare Zytotrophoblasten	62
Abbildung 22: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β -hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h mit 30 μ M FSK in 0,45% DMSO, repräsentativ für plazentare Synzytiotrophoblasten	64
Abbildung 23: Hormonsekretionsfähigkeit von BeWo-Wildtypzellen und siRNA-vermittelten TRPV6-Knockdownzellen	66
Abbildung 24: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Proteomanalyse von DMSO behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo-TRPV6-Knockoutzellen D10	68
Abbildung 25: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus DMSO behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-Knockoutzellen D10 (links)	69
Abbildung 26: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von FSK behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo TRPV6 Knockoutzellen D10	73
Abbildung 27: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus FSK- behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-Knockoutzellen D10 (links)	75
Abbildung 28: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von DMSO behandelten BeWo-Wildtyp- und BeWo TRPV6-überexprimierenden-Zellen E10	79
Abbildung 29: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus DMSO-behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-überexprimierenden E10 Zellen (links) ..	80
Abbildung 30: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von FSK-behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo TRPV6-überexprimierenden E10 Zellen	82

Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus FSK-behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-überexprimierenden Zellen E10 (links)	83
Abbildung 32: Modell möglicher Signalwege, die teilweise durch hCG stimuliert werden und die Synthese von Proteinen mit zellfusionsaktivierenden Eigenschaften induzieren	96
Abbildung 33: Modell der an der Synthese von Cholesterol und Steroidhormonen beteiligten Proteine	105
Abbildung 34: Schematische Darstellung der feto-maternalen Glukokortikoidhomöostase	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper für Immunpräzipitation (IP), Immunzytochemie und Western Blot (WB).....	24
Tabelle 2: Sekundärantikörper für Immunzytochemie und Western Blot.....	24
Tabelle 3: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen der Calciumhomöostase und des Transfers. Tabellarische Darstellung der signifikant differenziell (Zweistichproben-t-Test mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$) exprimierten Proteine. Angabe des Klons in dem das Protein in der jeweiligen Vergleichsanalyse abundanter war, BeWo-Zellwildtyp in schwarz (WT), BeWo CRISPR/Cas9 TRPV6-Knockoutmutante D10 in rot (D10) und BeWo CRISPR/Cas9 TRPV6-überexprimierende Mutante E10 in blau. Kein signifikanter Unterschied in der jeweiligen Vergleichsanalyse: =, nicht in Vergleichsanalyse detektiert: n.d	85
Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen der Steroidhormonsynthese und Sekretion.....	88
Tabelle 5: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen die im Zusammenhang mit der Schwangerschaft erwähnt werden	89

Abkürzungsverzeichnis

Arg Arginin

Asn Asparagin

Asp Asparaginsäure

Ba²⁺ Barium

BSA Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)

Ca²⁺ Calcium

Cys Cystein

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol (fluoreszierender DNA-Farbstoff)

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

FSK Forskolin

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Gln Glutamin

Glu Glutaminsäure

Gly Glycin

h Stunden

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (Puffer)

IP Immunpräzipitation

Ile Isoleucin

K⁺ Kalium

Leu Leucin

Min Minute

Na⁺ Natrium

OPG Osteoprotegerin

RANKL Receptor Activator of NF-κB Ligand

RT Raumtemperatur (ggf. Reverse Transkription, je nach Kontext)

SDS Natriumdodecylsulfat

Sek Sekunde

Sr²⁺ Strontium

Thr Threonin

Trp Tryptophan

WT Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	I
Danksagung	III
Zusammenfassung.....	VI
Summary	VII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die humane Plazenta	1
1.1.1 Die Entwicklung der Plazenta	1
1.1.1.1 Embryoimplantation.....	1
1.1.1.2 Synzytialisierung.....	2
1.1.1.3 Zottenstadien und terminale Plazenta	3
1.1.2 Plazentafunktionen.....	4
1.1.2.1 Funktionen plazentarer Trophoblasten: Transport	5
1.1.2.2 Endokrine Funktion plazentarer Trophoblasten	6
1.1.3 Modelzelllinien plazentarer Trophoblasten.....	9
1.2 Die TRP-Familie	10
1.2.1 TRPV6.....	11
1.2.1.1 Genetische Varianten und atypische Translation des humanen TRPV6-Kanals	11
1.2.1.2 Charakteristische TRP-Kanaltopologie mit strukturellem Fokus auf TRPV6...	12
1.2.1.3 TRPV6-Expression und Funktion	14
1.2.1.4 TRPV6- assoziierte Erkrankungen	15
1.3 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien	18

2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Zellkultur.....	18
2.1.3 Permeabilitätsversuch.....	19
2.1.4 Immunzytochemie	19
2.1.5 Calciumimaging.....	20
2.1.6 Proteinbiochemie	20
2.1.7 Massenspektrometrie	22
2.1.8 Antikörper.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Zellkultur.....	25
2.2.1.1 BeWo-Zellkultivierung.....	25
2.2.1.2 Experimentelle Variation der extrazellulären Calciumkonzentration in BeWo-Zellen.....	25
2.2.1.3 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Glasplatten	25
2.2.1.4 Schnelfärbung der BeWo-Zellen.....	26
2.2.1.5 Induktion von Synzytialisierung und Hormonsynthese in BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9-Mutanten.....	26
2.2.1.6 Untersuchung von Transporteigenschaften der BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9 Mutanten.....	27
2.2.1.7 SiRNA-Transfektion zur Reduktion der TRPV6-mRNA in BeWo-Zellen	30
2.2.2 Genexpressionsanalyse.....	31
2.2.2.1 qPCR zur Quantifizierung der TRPV6-RNA-Expression	31
2.2.3 Immunzytochemie	32
2.2.3.1 ZO-1 Immunfärbung	32
2.2.3.2 Zellkerngrößenbestimmung.....	33
2.2.4 Calcium Imaging mittels Fura-2	33
2.2.5 Untersuchung der Schwangerschaftshormonproduktion von BeWo-Wildtypzellen und CRISPR/Cas9 Mutanten	34
2.2.6 Proteinbiochemie	34

2.2.6.1 RIPA-Lysat von BeWo-Wildtypzellen und CRISPR/Cas9 Mutanten	34
2.2.6.2 BCA Assay zur Proteinbestimmung	34
2.2.6.3 Proteinfällung.....	35
2.2.6.4 Immunpräzipitation von BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9 Mutanten.....	35
2.2.6.5 Gelelektrophorese	35
2.2.6.6 Western Blot.....	36
2.2.7 Massenspektrometrie.....	36
2.2.7.1 Vorbereitung der Proben	36
2.2.7.2 Massenspektrometrie Nano-LC-HR-MS/MS	37
2.2.7.3 Auswertung der massenspektrometrischen Rohdaten.....	38
2.2.8 Datenverarbeitung, Visualisierung und statistische Analyse	39
3. Ergebnisse	41
3.1 Einfluss verschiedener extrazellulärer Calciumkonzentrationen auf Funktion und Proteom von BeWo-Wildtypzellen	41
3.1.1 Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Synzytialisierung und Hormonsekretion von BeWo-Wildtypzellen.....	41
3.1.2 Untersuchung der Expression und Calciumabhängigkeit fusionsinduzierter Proteine in BeWo-Wildtypzellen	44
3.2 Analyse der genomischen <i>Trpv6</i> -Sequenz in den CRISPR/Cas9-modifizierten BeWo-Klonen D10 und E10.....	47
3.3 Semiquantitative Untersuchung der TRPV6 Expression in BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien.....	50
3.4 Semiquantitative Untersuchung der TRPV6 Expression in Forskolin-behandelten BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien	52
3.5 Charakterisierung der Proliferationsrate von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien	54
3.6 Nachweis des Tight junction Proteins Zona-occludens-1 in BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien.....	54
3.7 Vergleich der Zellkerngröße von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien.....	56

3.8 Untersuchung der freien Calciumkonzentration im Zytosol von BeWo- Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien.....	57
3.9 Untersuchung der trans- und parazellulären Transporteigenschaften in BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien.....	58
3.10 Vergleich der Hormonsekretionsfähigkeit von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinie	59
3.11 Vergleich der hormonellen Sekretionsaktivität von BeWo-Wildtypzellen und siRNA-induzierten TRPV6-Knockdownzellen	65
3.12 Proteomanalyse der BeWo-Zellklone	67
3.12.1 Proteomanalyse TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen.....	67
3.12.1.1 Proteomanalyse Zytotrophoblast-artiger TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen	67
3.12.1.2 Proteomanalyse Synzytiotrophoblast-artiger TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen	72
3.12.2 Proteomanalyse von TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen	78
3.12.2.1 Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen	78
3.12.2.2 Proteomanalyse von Synzytiotrophoblast -artigen TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen	82
3.12.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der vier Proteomanalysen von Zyto- und Synzytiotrophoblast-artigen Wildtypzellen und CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10 ..	85
4. Diskussion	92
4.1 Etablierung klonaler Chorionkarzinom-Zelllinien mit variierender TRPV6-Expression ..	92
4.2 Einfluss differenzieller TRPV6 Expression auf die Morphologie und das Wachstum von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen	92
4.3 Die TRPV6-Defizienz reduziert die intrazelluläre Calciumkonzentration in BeWo-Zellen	93
4.4 TRPV6 hat keinen Einfluss auf die Synzytialisierungsfähigkeit von BeWo-Zellen	94
4.5 Beurteilung des Einflusses einer TRPV6-Überexpression auf die parazelluläre Permeabilität von BeWo-Zellen	97

4.6 Der TRPV6-Knockout und Knockdown reduziert die Sekretion von hCG, Progesteron und Estradiol von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen	98
4.7 Einfluss des TRPV6-Knockouts auf die Expression von Proteinen der Calciumhomöostase in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen	101
4.8 Einfluss des TRPV6-Knockouts auf die Expression von Proteinen der Steroidhormonsynthese in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen.....	103
4.9 Schlussfolgerung und Ausblick.....	109
5. Literatur	111

1. Einleitung

1.1 Die humane Plazenta

1.1.1 Die Entwicklung der Plazenta

1.1.1.1 Embryoimplantation

Die Entwicklung der Plazenta wird bereits mit der Nidation der Blastozyste, einem embryonalen Entwicklungsstadium, das etwa fünf bis sechs Tage nach der Befruchtung der Oozyte im Eileiter erreicht wird, initiiert [1]. Zuvor erfolgt die Bildung der Zygote durch die Verschmelzung der beiden Keimzellen im Rahmen der Fertilisation. Während der Wanderung der Zygote durch den Eileiter durchläuft sie die Spaltungsphase, in der sie sich mehrfach teilt. Dieser Teilungsprozess manifestiert sich zunächst in Stadien mit zwei, vier und acht Zellen. Im Verlauf einer Verdichtungsphase wird ab dem 16-Zellstadium von der kompakten Morula gesprochen. Nach fortschreitender Differenzierung, sobald etwa 20 Zellen vorhanden sind, wird Flüssigkeit in den interzellulären Raum gepumpt, was zur Bildung einer Blastozysten-Höhle führt und das frühe Blastozysten-Stadium einleitet [2].

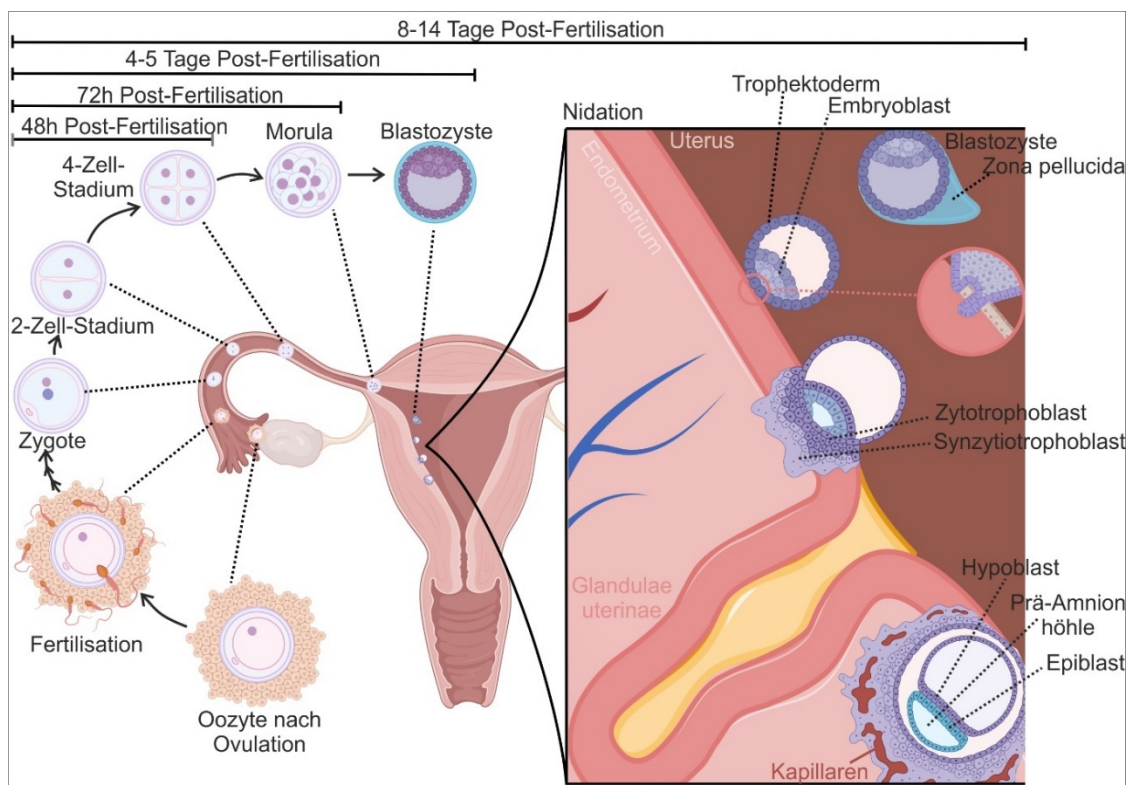


Abbildung 1: Frühe Embryonalentwicklung beim Menschen. Darstellung der Stadien von der Befruchtung bis zur Einnistung (Nidation) in das Endometrium, einschließlich Zygote, Morula, Blastozyste und beginnender Ausbildung von Trophoblast und Embryoblast. Erstellt mit BioRender

Nach dem Durchlauf mehrerer Schrumpfungs- und Expansions-Zyklen besteht die späte Blastozyste aus ungefähr 200 Zellen [3-5], darunter der innere Embryoblast, aus dem der Embryo hervorgeht, und das äußere Trophektoderm, das aus Trophoblasten-Zellen besteht und später wesentliche Teile der Plazenta bildet. Vor der Implantation tritt die Blastozyste aus der Zona pellucida, einer glykoproteinreichen extrazellulären Matrix, aus woraufhin die Adhäsion der Trophektoderm-Zellen an das rezeptive Luminalepithel der Gebärmutter erfolgt. Dieser initiale Kontakt zwischen dem embryonalen und mütterlichen Gewebe initiiert die Bildung der Plazenta circa 5-6 Tage nach der Befruchtung, da als Reaktion auf die Adhäsion die Genexpression und damit einhergehend die Differenzierung der Trophektoderm-Zellen eingeleitet wird: Die Zellen des Trophektoderms, die in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Endometrium stehen, proliferieren und bilden zunächst einkernige Trophoblasten. Diese Zellen fusionieren im Verlauf zu einem primitiven invasiven Synzytiotrophoblasten, der in der Lage ist, das Gebärmutterepithel zu durchdringen, damit die Umwandlung des Epithels in die Dezidua induziert [6] und die Einbettung der Blastozyste im Gebärmutterstroma ermöglicht [1, 7, 8]. Die verbleibenden einkernigen Trophoblasten, die als primitive Zytotrophoblasten klassifiziert werden, befinden sich in einer nachgeordneten Position und stehen nicht in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Gewebe. Diese primitiven Zytotrophoblasten durchlaufen einen fortlaufenden Proliferationsprozess und fusionieren anschließend mit dem primären Synzytiotrophoblast. Dieser dynamische Prozess führt zu einer kontinuierlichen Expansion des Synzytiotrophoblasten [9] und zur Bildung eines primitiven Synzytiums.

2.1.1.2 Synzytialisierung

Der Synzytiotrophoblast bildet im Graviditätsverlauf ein großes mikrovillöses Epithel und stellt die Kontaktschicht zum maternalen Blut dar, weshalb zahlreiche plazentare Funktionen auf diesen Zelltyp zurückzuführen sind. Da sich die Synzytiotrophoblasten nicht selbst regenerieren können, sondern auf eine kontinuierliche Fusion mit den darunter lokalisierten Zytotrophoblasten angewiesen sind, untersteht dieser Prozess, der Synzytialisierung genannt wird, regulatorischen Signalkaskaden, die die fusionsfördernde Genexpression induzieren. Die Fusion wird eingeleitet, indem die Zytotrophoblasten zunächst ihre Morphologie ändern und ihre proliferative Aktivität verlieren. Diese morphologischen Änderungen werden vermutlich durch die Aktivierung apoptotischer Kaskaden durch Initiator-Caspasen in Zytotrophoblasten und damit einhergehender Spaltung von Fodrin und Externalisierung von negativ geladenem Phosphatidylserin induziert [10-13]. Daraufhin kommt es zu einer veränderten Expression von Zelladhäsionsproteinen wie Cadherinen und Zona-occludens 1, was Zelladhäsions- und Kommunikationsprozesse auslöst, die die Zellfusion fördern [14, 15]. Zudem ermöglichen Connexine als Bausteine von interzellulären Kanälen (Gap Junctions) eine direkte

Kommunikation zwischen benachbarten Zellen [16]. Hierbei werden die zuvor aktivierten apoptotischen Signalkaskaden durch die Expression von Apoptose-Suppressoren gehemmt [17]. Im Anschluss kommt es durch die vermehrte Bildung fusogener Proteine wie Syncytin-1 und -2 zur Verschmelzung der Plasmamembranen, wodurch die intrazellulären Inhalte miteinander vermischt werden [18]. Die Bildung fusogener Proteine erfolgt primär über die cAMP/PKA vermittelte Expressionsinduktion des Transkriptionsfaktors GCM1 (glial cell missing 1) [19, 20].

1.1.1.3 Zottenstadien und terminale Plazenta

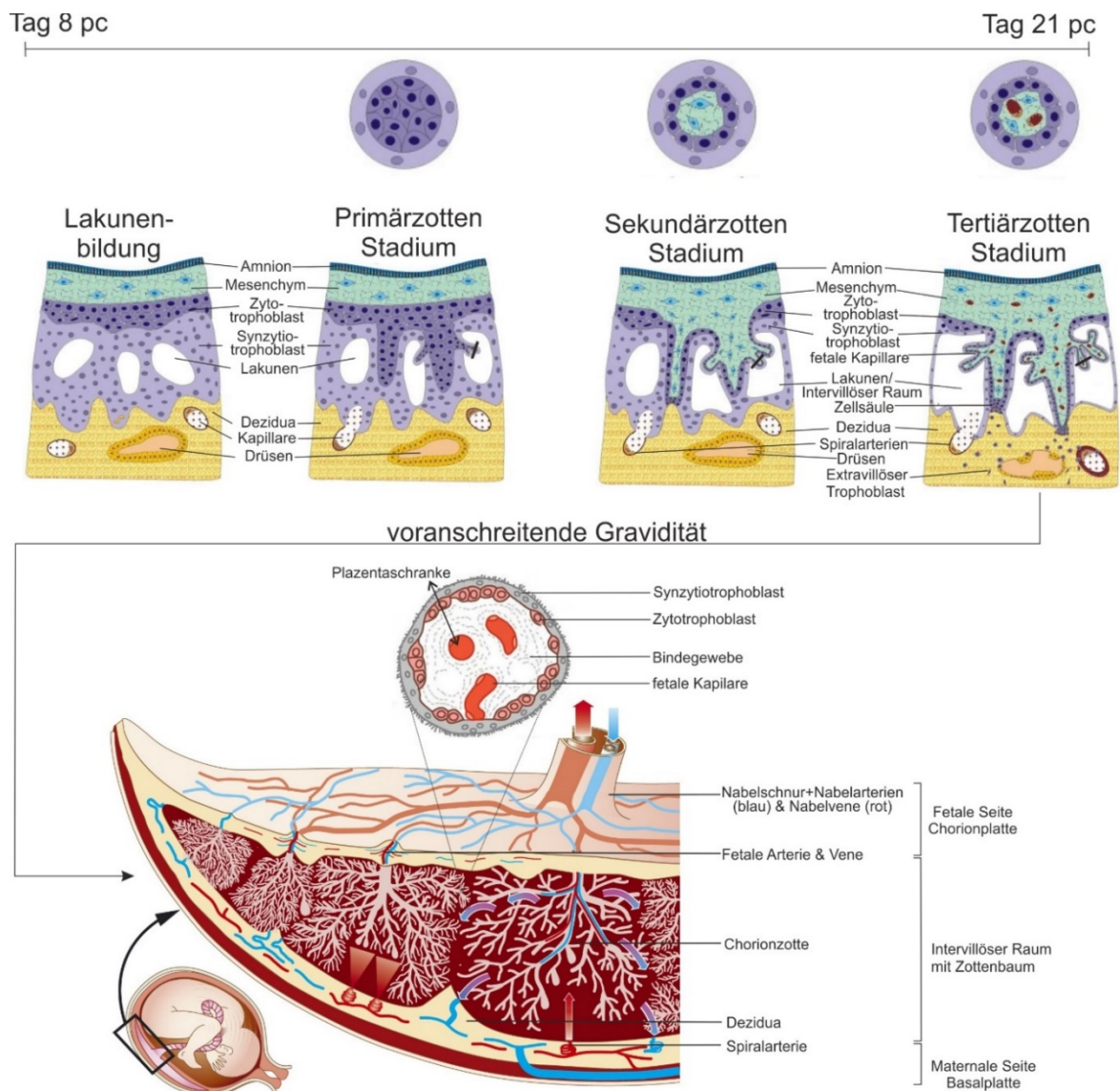


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plazenta mit typischen Entwicklungsstadien. Oben: Fetales Gewebe in grün-violett, maternales Gewebe in gelb-braun. Darüber Querschnitt durch jeweiliges Stadium der Zotte. Querschnittsstelle in Schema des jeweiligen Zottenstadiums angedeutet. Unten Querschnitt durch die Plazenta und eine Plazentazotte dargestellt. Abbildung modifiziert nach Huppertz 2013, Barthe et al 2015 und Stangl et al 2021 [21-23]

Um den achten Tag nach der Befruchtung (post-conceptionem, pc) entwickeln sich innerhalb des primitiven Synzytiotrophoblasten flüssigkeitsgefüllte Räume, die im Verlauf ein Lakunen-Netzwerk bilden. In dieses Netzwerk strömt mütterliches Blut, nachdem endometriale Blutgefäße eröffnet wurden, und es entsteht im späteren Entwicklungsstadium der intravillöse Raum [24]. Die verbleibenden synzytiotrophoblastischen Massen zwischen den Lakunen werden als Trabekel bezeichnet. Ab diesem Zeitpunkt lassen sich drei grundlegende plazentare Zonen definieren: die dem Embryo zugewandte Chorionplatte, das Lakunensystem einschließlich der Trabekel sowie die primitive Basalplatte, die in Kontakt mit dem mütterlichen Endometrium steht [25]. Ab dem neunten Tag pc dringen die Zytotrophoblasten in die Trabekel ein, wodurch die Primärzotten ab Tag 11 pc entstehen. Diese differenzieren sich ab dem 16. Tag pc durch das Eindringen embryonalen Mesenchyms zu Sekundärzotten. Die Kombination aus extraembryonalem Mesoderm, Zyto- und Synzytiotrophoblast wird als Chorion bezeichnet. Ab dem 20. Tag pc entwickeln sich in den Sekundärzotten hämatopoetische Vorläuferzellen, was zur Bildung fetaler Blutgefäße führt und das Stadium der Tertiärzotten einleitet. Die Bildung dieser Tertiärzotten, insbesondere des Kapillarendothels, erfolgt bedarfsorientiert bis zum Ende der Schwangerschaft. Aus den Tertiärzotten entstehen Zellsäulen, die als Haftzotten zur Verankerung in der Dezidua dienen. Im weiteren Verlauf wandern extravillöse Trophoblasten in das mütterliche Uterusgewebe ein. Zudem erfolgt durch eine fortlaufende sprossenförmige Expansion des Synzytiotrophoblasten, gefolgt von der Einwanderung mesenchymalen Gewebes des Embryoblasten, eine Verzweigung zur Ausbildung eines Zottenbaumes [24, 26]. Diese beschriebenen Schichten aus fetalem Kapillarendothel der Zotten, Bindegewebe, Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten, die mit dem maternalen Blut in Kontakt stehen, bilden schließlich die Plazentaschranke, die den Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten ermöglicht. Etwa vier Wochen nach der Befruchtung ist der Embryo vollständig von Zotten umgeben. Ab der achten Woche beginnt jedoch eine partielle Reduktion der Zotten, die bis zur zwölften Woche fortschreitet. Dieser Prozess führt zur Differenzierung in die definitive Plazenta, die aus einem zottenreichen Bereich, dem *Chorion frondosum*, und einem glatten Bereich, dem *Chorion laeve*, besteht.

1.1.2 Plazentafunktionen

Die Plazenta erfüllt eine Vielzahl von Funktionen, wobei die Zottenoberfläche einen großen Teil der plazentaren funktionellen Einheit darstellt. Die Zotten-Trophoblasten differenzieren sich in spezialisierte Subpopulationen, die entweder epitheliale Funktionen erfüllen oder invasiv in die mütterliche Gebärmutterwand eindringen. Im Kontext der epithelialen Aufgaben sind die Synzytiotrophoblasten für den Transfer von Nährstoffen und Gasen zwischen Mutter

und Fötus sowie die Produktion von Hormonen zuständig, die für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft entscheidend sind.

1.1.2.1 Funktionen plazentarer Trophoblasten: Transport

Der Transportmechanismus über die Plazentaschranke hängt von der zu transportierenden Substanz ab. Der Gasaustausch von Kohlendioxid und Sauerstoff sowie die fetale Ausscheidung von Harnstoff [27] und Bilirubin [28] erfolgt über passive Diffusion. Der Glukoseaustausch findet über spezielle Carrier-Systeme wie insulinunabhängige GLUT-Transporter statt [29], ebenso wie die maternale Bereitstellung wasserlöslicher Vitamine und Aminosäuren über Transporter erfolgt, die meist durch einen Natriumgradienten angetrieben werden [30, 31]. Nach Spaltung von maternalen Triglyceriden und Phospholipiden durch endotheliale- und Lipoprotein-Lipasen zu freien Fettsäuren passieren diese die placentaren Synzytiotrophoblasten über verschiedene Lipoproteinkomplexe die Fettsäure-Transportproteine/Translokasen, Plasmamembran-Fettsäure-Bindungsproteine und Fettsäure-Bindungsproteine enthalten [32, 33]. Cholesterol wird neben der endogenen Synthese [34] auch durch Lipoproteine wie LDL, HDL und VLDL transportiert [35], die mit spezifischen Lipoproteinrezeptoren wie dem LDL-Rezeptor (LDLR), dem Scavenger-Rezeptor Class B Typ I (SR-BI) und dem VLDL-Rezeptor (VLDLR) interagieren [36-38]. Zusätzlich sind Transportproteine wie ABCA1 und ABCG1 am feto-maternalen Cholesteroltransfer beteiligt [39]. Spezifische maternale Immunglobuline werden zur Übertragung der humoralen Immunität der Mutter auf den Fetus über Transzytose aufgenommen [40, 41]. Der Mineralstofftransport erfolgt ebenfalls über diverse stoffspezifische Transportsysteme. Frühe Studien legen nahe, dass der Chloridaustausch über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch [42] und der Transport über den Maxi-Chloridkanal stattfindet [43]. Eisen gelangt über den Transferrinrezeptor 1 (TFR1) in die fetale Zirkulation [44, 45], während die Phosphathomöostase vermutlich durch natriumabhängige Phosphattransporter vom Typ III (SLC20A1, SLC20A2) vermittelt wird [46]. Auch einige Ionenkanäle der Transient Receptor Potential (TRP)- Familie spielen beim aktiven Mineralstofftransport eine Rolle. So sind der Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M 6 und 7 (TRPM6/7) am Magnesiumtransport beteiligt [47-49]. Mehrere Studien haben zudem gezeigt, dass ein Mangel an Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) in placentaren Trophoblasten mit calciummangelbedingten fetalen Pathologien in Verbindung steht, sodass für diesen TRP-Kanal eine zentrale Rolle in der feto-maternalen Calciumhomöostase angenommen wird [50-55]. Darüber hinaus sind intrazelluläre Store-operated Ca^{2+} Entry Channels (SOCE) [56], die mit Hilfe von Calciumsensoren auf die Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration hin aktiviert werden, basolaterale

Plasmamembran-Calcium-ATPasen (PMCA) [57] sowie Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) [58] an der placentaren Calciumhomöostase beteiligt.

1.1.2.2 Endokrine Funktion plazentarer Trophoblasten

Für die Entwicklung des Fetus ist eine wachstumsfördernde Modulation des weiblichen Fortpflanzungstrakt notwendig. Um diesen Prozess dynamisch zu regulieren, übernehmen die Zyto- und insbesondere die Synzytiotrophoblasten der Plazenta aufgrund ihrer hämochorialen Eigenschaft neben ihrer Transportfunktion auch endokrine Aufgaben [59]. Hierfür fungieren sie wie eine Art hypothalamisch-hypophysäres System indem stimulierende und hemmende Rückkopplungsmechanismen das fetale Wachstum beeinflussen [60], wobei die zugrunde liegenden Mechanismen der hormonellen Sekretionsregulation in der Plazenta Gegenstand aktueller Forschung sind.

Im Graviditätsverlauf ändern sich die maternalen Hormonspiegel von wichtigen schwangerschaftsrelevanten Hormonen wie dem humanen Choriongonadotropin (hCG), Progesteron und Estradiol. Bereits nach der Einnistung der Blastozyste in das Endometrium wird das humane Choriongonadotropin, das aus einer alpha-Untereinheit die in verschiedenen Glykoprotein-Hormonen wie TSH, LH und FSH ebenfalls vorkommt und einer plazentaspezifischen beta-Untereinheit besteht, von primitiven Trophoblasten gebildet und ist daher ab der ersten Schwangerschaftswoche im maternalen Blut nachweisbar. Die plazentaspezifische beta- Untereinheit des hCGs erreicht hierbei ihr Maximum in der 10-12 Schwangerschaftswoche und sinkt daraufhin progredient [61, 62] (Abb. 3).

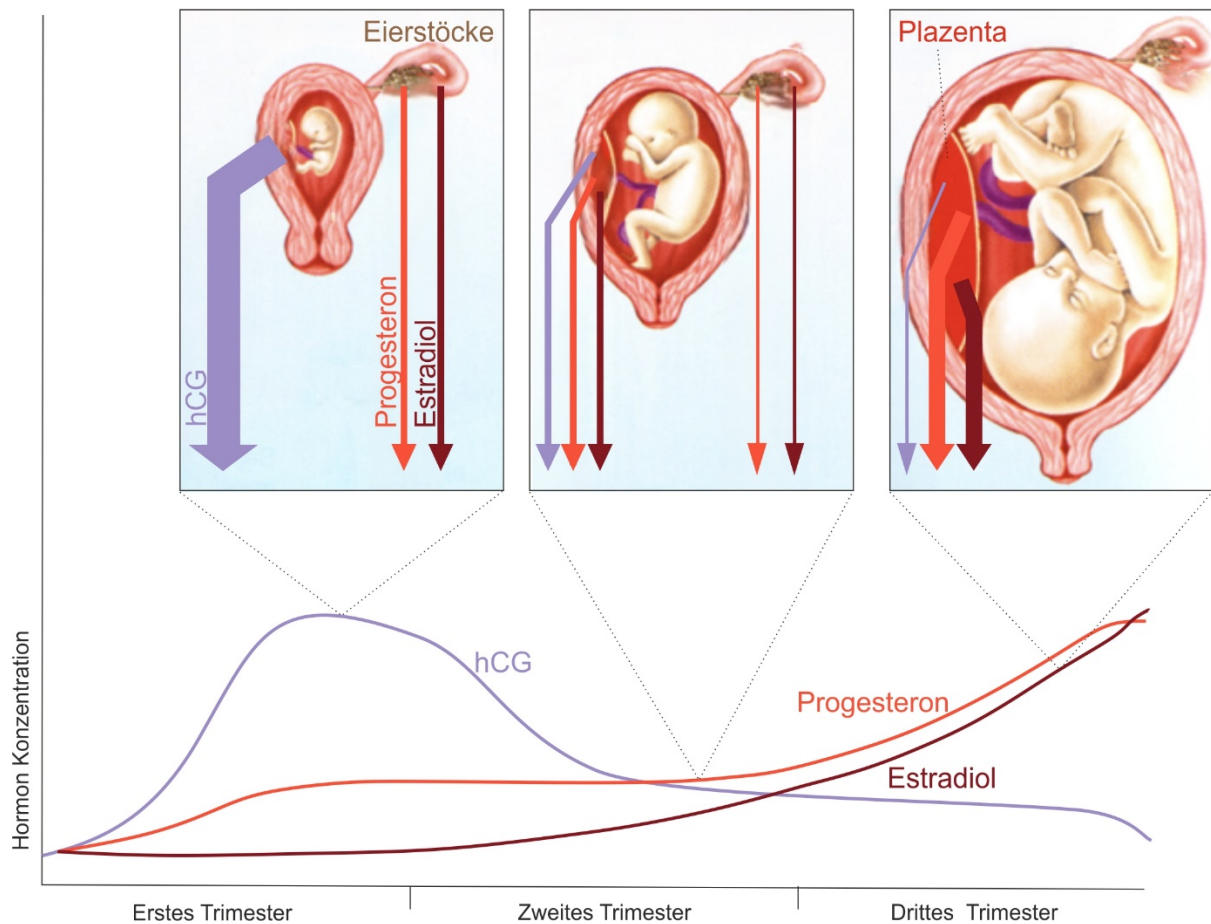


Abbildung 3: Hormonspiegel von hCG, Progesteron und Estradiol während der Schwangerschaft. Abbildung modifiziert nach White et al. 2020 [63]

Trotz der sinkenden Spiegel nach dem ersten Trimester stimuliert hCG die Sekretion der Steroidhormone Progesteron und Estradiol während der gesamten Schwangerschaft [64-66], indem es an den Luteinisierendes Hormon/Choriongonadotropin-Rezeptor (LHCGR) bindet. Die darauffolgende Konformationsänderung des G_s -Protein-gekoppelten Rezeptors aktiviert primär die Adenylatzyklase und erhöht dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel, was die Steroidbiogenese induziert [67-69]. Im ersten Trimester der Schwangerschaft findet die Rezeptorstimulation durch hCG primär auf dem Gelbkörper statt, sodass dieser zunächst die primäre Quelle der Steroidhormone darstellt. Im Verlauf der Plazentaentwicklung werden jedoch zunehmend LHCGR-Rezeptoren in der Plazenta selbst exprimiert, was dazu führt, dass auch die reduzierten hCG-Spiegel ab dem zweiten Trimester den progressiven Anstieg der Steroidhormonsynthese induzieren [63, 70] und die Steroidhormonsynthese daher von der Plazenta übernommen wird [71, 72]. Neben der LHCGR vermittelten autokrinen Förderung der Synzytiotrophoblasten-Bildung [19, 73, 74] und der Stimulation der Bildung von Steroidhormonsynthese-Enzymen [75, 76] übernimmt hCG weitere Aufgaben die essenziell für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft sind. Es fördert die Angiogenese im

Uterusendothel [77, 78], hemmt die Immunreaktion und die Phagozytose der Makrophagen an der utero-plazentaren Grenzfläche [79-81], verhindert die Kontraktion der Uterusmuskulatur [82-85] und fördert zudem das uterine Wachstum [82, 83].

Wie bereits erwähnt steigt der maternale Progesteronspiegel bis zur Entbindung im mütterlichen Serum kontinuierlich und erreicht vor der Geburt Werte um 224nmol/L [71, 72, 86]. Für die Synthese dient Cholesterol als Vorstufe. Es kann zu geringen Teilen de-novo synthetisiert werden, wird größtenteils jedoch über Lipoproteine durch die Plasmamembran in die endokrine Zelle transportiert [87-89]. In der inneren Mitochondrienmembran wird Cholesterol unter Einfluss mehrerer Enzyme zu Progesteron umgewandelt: die mit der inneren mitochondrialen Membran verbundene Adrenodoxin-Reduktase (AdxR) nimmt Elektronen von NADPH auf und überträgt sie auf das Elektronentransferprotein Adrenodoxin das wiederum die Elektronen für das Cytochrom-P450 Enzym (CYP) 11A1 zur Spaltung der Cholesterol-Seitenkette und Katalyse zu Pregnenolon bereitstellt. Pregnenolon wird durch die 3 Beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Delta 5->4-Isomerase Typ 1 (HSD3B1) und NAD⁺ in Progesteron umgewandelt [90, 91]. Progesteron fungiert als wichtiges Vorläufermolekül in der Steroidhormonsynthese und kann beispielsweise für die Produktion von Cortisol, Aldosteron [92] sowie Estradiol [93, 94] verwendet werden. Die Umwandlung zu Estradiol erfolgt jedoch durch CYP17A1, einem Enzym das bisher kaum in plazentaren Trophoblasten detektiert werden konnte [95]. Darüber hinaus unterstützt Progesteron durch die Interaktion mit seinem nukleären Rezeptor die Dezidualisierung [96], reduziert wie auch hCG die Kontraktilität der Uterusmuskulatur [97, 98] und fördert die mütterliche Immuntoleranz [99-101].

Auch die maternalen Serumkonzentrationen von Estrogenen wie Estriol, Estron und Estradiol steigen im Verlauf der Gravidität progressiv. Im letzten Trimenon liegen die Werte des potentesten Estrogens Estradiol um 22.680 pmol/L [86]. In der Estradiolbiosynthese nehmen CYP17A1 und CYP19A1 (Aromatase) eine entscheidende Rolle ein. Zwar wurde in früheren Studien die CYP17A1 Expression auf Transkriptomebene detektiert und eine Enzymaktivität beschrieben [102-105], jedoch scheint die plazentare Aktivität des Enzyms gering zu sein und die entsprechende katalytische Reaktion primär in der fetalen Nebenniere stattzufinden [106]. Hierfür wird ein Teil des plazentar gebildeten Pregnenolons durch fetale adrenale Sulfatasen zu Pregnenolonsulfat und anschließend durch CYP17A1 zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) metabolisiert. DHEA wird wieder zur Plazenta transferiert und dort durch 3- und 17-beta Hydroxylasen zu Androstendion und Testosteron umgewandelt, aus denen mit Hilfe der Aromatase und den 17-beta Hydroxysteroiddehydrogenasen 1 und 3 Estron bzw. Estradiol gebildet wird [106, 107]. Estrogene stimulieren die plazentare Angiogenese [108-110], wirken

über die Induktion der NO-Synthase vasodilatierend, stimulieren so den uteroplazentaren Fluss [111] und beeinflussen darüber hinaus den feto-maternalen Glukokortikoidmetabolismus [112-115]. Sie regulieren auch die Aktivität uteriner Calciumkanäle [116, 117]. Zudem erhöhen Estrogene vor der Entbindung die Konzentration von Oxytocin [118], stimulieren die Expression von Prostaglandin E2 und F2 Rezeptoren im Uterus [119] und sind daher an der Weheneinleitung beteiligt.

1.1.3 Modelzelllinien plazentarer Trophoblasten

Da es sich bei der Plazenta um ein terminal differenziertes Organ handelt, sind direkte funktionelle Untersuchungen am humanen Gewebe nur eingeschränkt möglich. Zwar kann man aus der Plazenta primäre Trophoblasten isolieren, jedoch sind diese kurzlebig und daher für viele funktionelle Untersuchungen ungeeignet. Daher werden hierfür verschiedene etablierte *in-vitro*-Zellkulturmodelle für menschliche Trophoblasten wie BeWo-, JEG3-, und JAR-Zellen verwendet, die aus humanen Chorionkarzinomen stammen und dadurch hohe Proliferationseigenschaften aufweisen. Durch Pattillo et al. wurde 1968 mittels Transplantation einer zerebralen Metastase eines Chorionkarzinoms der fötalen Plazenta eines männlichen Fötus in die Wangentasche eines Hamsters die BeWo-Zelllinie gewonnen [120]. Die Generierung verschiedener Klone aus malignen Trophoblasten etablierte 1971 die JEG3-Zelllinie [121], die sich funktionell von der BeWo-Zelllinie unterscheidet. Die JAR-Zelllinie wurde ebenfalls von Pattillo et al. direkt aus einem trophoblastischen Tumor gewonnen [122]. Da im Rahmen dieser Arbeit das Augenmerk auf essenzielle schwangerschaftsrelevante Funktionen der Trophoblasten wie Calciumhomöostase, Permeabilität, Synzytialisierung und Hormonsynthese gelegt werden sollte, fiel die Wahl des *in-vitro* Zellmodells auf die BeWo-Zelllinie. Sie wachsen adhärent, sind epithelartig und die Synzytialisierung ist durch Adenylatzklase-Aktivierung mittels Forskolin (FSK) induzierbar, während die Zellfusion von JEG3 Zellen auf diese Weise nicht stimuliert werden kann [123]. Wie primäre humane Trophoblasten produzieren und sezernieren sie Hormone, darunter die Peptidhormone humanes Choriongonadotropin und Chorion-Somatomammotropin (Plazenta-Laktogen) sowie verschiedene Steroidhormone wie Progesteron und Estradiol. Die Expression dieser Hormone sowie fusionsassoziiierter Proteine dient im Zellmodell als Marker des Synzytialisierungsprozesses. Aufgrund der genannten Eigenschaften wurden alle funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit mit BeWo-Zellen durchgeführt.

1.2 Die TRP-Familie

Die Transient Receptor Potential (TRP)-Familie repräsentiert eine heterogene Gruppe von Ionenkanälen, die in verschiedenen Geweben verbreitet sind und die unter anderem an der sensorischen Wahrnehmung chemischer und physikalischer Stimuli beteiligt sind. Diese Kanäle sind permeabel für mono- und divalente Kationen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ und K^+ . In Säugetieren umfasst die TRP-Familie 28 Kanalproteine, die anhand der Homologie ihrer Aminosäuresequenz in sechs Subfamilien klassifiziert werden: TRPA (Ankyrin), TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin), TRPV (Vanilloid). TRPN1, ein weiteres Mitglied der TRP-Familie, wurde bisher in bestimmten, nicht zu den Säugetieren zählende Spezies identifiziert.

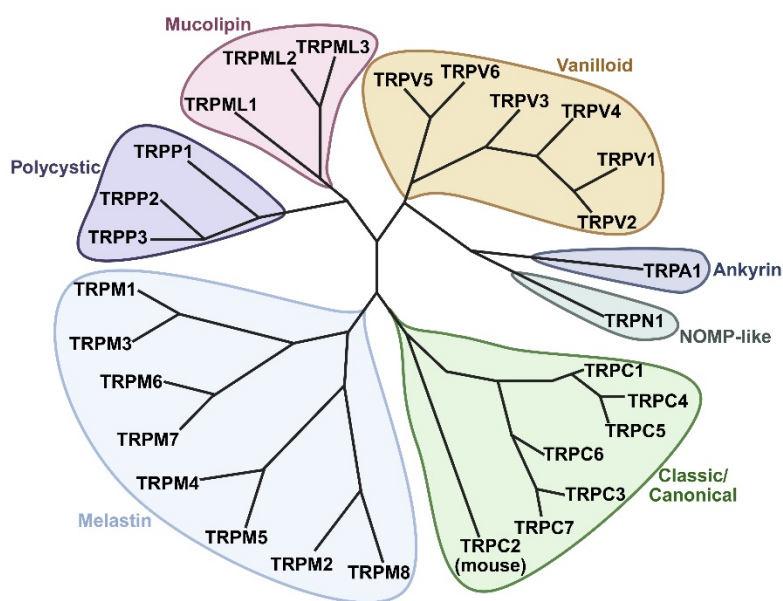


Abbildung 4: Dendrogramm der sieben Subfamilien der TRP-Kanäle. Abbildung modifiziert nach Spekker et al 2023 [124]

1969 identifizierte Cosens et al. erstmalig einen elektrophysiologisch diversen Phänotyp in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [125, 126]. Dieser zeigte nach visueller Stimulation anstelle eines anhaltenden Elektretinogramms nur ein transientes Signal, weshalb das mutierte Gen als „transient receptor potential“ bezeichnet wurde. Das *trp*-Gen wurde 1989 kloniert und sequenziert [127, 128] und 1992 als Calcium-permeabler Kanal charakterisiert [129]. Im Jahr 1995 wurde TRPC1 als erstes humanes Homolog identifiziert, wobei das C in TRPC für "canonical" oder "classic" steht [130]. Daraufhin wurden fortlaufend mehrere TRP-Klassen in verschiedenen Spezies entschlüsselt [131-137]. Auf Grundlage der Sequenzhomologie lassen sich die sieben Mitglieder der TRPC-Familie in drei strukturell verwandte Subgruppen gliedern: TRPC1, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Im Gegensatz dazu

existiert TRPC2 im humanen Genom lediglich als nicht-funktionelles Pseudogen. Das “M” der TRPM-Subfamilie leitet sich von “Melastatin” ab, dem ursprünglichen Namen des ersten identifizierten Mitglieds, das heute als TRPM1 bezeichnet wird [138]. TRPM-Kanäle lassen sich in vier Paare homologer Proteine unterteilen: TRPM1/3, TRPM6/7, TRPM4/5 sowie TRPM2/8. Die TRPP-Familie ist nach Polycystin-2 (TRPP2) benannt, das mit der Entstehung polyzystischer Nierenerkrankungen assoziiert ist [139], während für die drei Mitglieder der TRPML-Kanalfamilie, aufgrund des pathogenetischen kausalen Zusammenhangs von TRPML1 mit Mucopolysaccharidose Typ IV, “Mucopolysaccharidin” namensgebend ist [140, 141]. Die Klasse der TRPA-Proteine umfasst in Säugern ausschließlich TRPA1, wobei das “A” die charakteristischen zahlreichen N-terminalen Ankyrin-Repeats aufgreifen soll [142]. Auch TRPN1 wurde erstmals in der Fruchtfliege identifiziert. Das “N” steht hier für “No mechanoreceptor potential C” und bezieht sich auf die ausbleibenden mechanorezeptiven Potenziale, die im Kontext einer Mutation des TRPN-Gens beschrieben wurden [143]. Die TRPV-Kanäle lassen sich auf Grundlage ihrer Kationenselektivität in zwei funktionelle Subgruppen einteilen: die thermosensiblen TRPV-Kanäle 1–4, die unspezifisch kationenselektiv sind, sowie TRPV5 und TRPV6, die eine hohe Calciumselektivität aufweisen. Die Bezeichnung ‘TRPV’ leitet sich von ‘Vanilloid’ ab, da der erste identifizierte Vertreter, TRPV1, durch Vanilloide wie Capsaicin aktiviert werden kann [144, 145].

1.2.1 TRPV6

1.2.1.1 Genetische Varianten und atypische Translation des humanen TRPV6-Kanals

Der Calcium-selektive Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) Kanal gehört zur Vanilloid-Unterfamilie der TRP-Kanäle. Das entsprechende Transkript wurde 1999 erstmalig aus dem Rattendarm kloniert [146], während die humane Variante drei Jahre später aus einer cDNA-Bibliothek der Plazenta isoliert wurde [135]. Genomisch ist das *TRPV6*-Gen auf dem humanen Chromosomabschnitt 7q33–34 lokalisiert [147] und weist eine hohe Sequenzhomologie zu TRPV5 auf. Darüber hinaus zeigt das humane *TRPV6*-Gen einen populationsabhängigen Polymorphismus, der durch nicht synonyme Einzelbasenvarianten innerhalb der kodierenden Sequenz entsteht und zu Aminosäureaustauschen im Protein führt. Das Resultat sind zwei Allelvarianten, TRPV6a und TRPV6b, deren Verteilung geographisch variiert [135, 148, 149]. Darüber hinaus weist die Biosynthese des TRPV6-Proteins in Plazentatieren eine Besonderheit auf: Anders als bei den meisten eukaryotischen mRNAs erfolgt die Initiation der Translation nicht durch ein kanonisches AUG-Startcodon (Abb.5, *M. brandtii*), sondern an einem stromaufwärts gelegenen ACG-Codon, das regulär für Threonin codiert, in diesem Fall jedoch als funktionales Startsignal fungiert und in ein Methionin

übersetzt wird [150]. Die Translation des TRPV6-Proteins beginnt somit früher als bis zum Jahr 2013 angenommen und führt zur Bildung eines TRPV6-Proteins mit 765 statt 725 Aminosäuren und einer verlängerten N-terminalen Domäne [150].

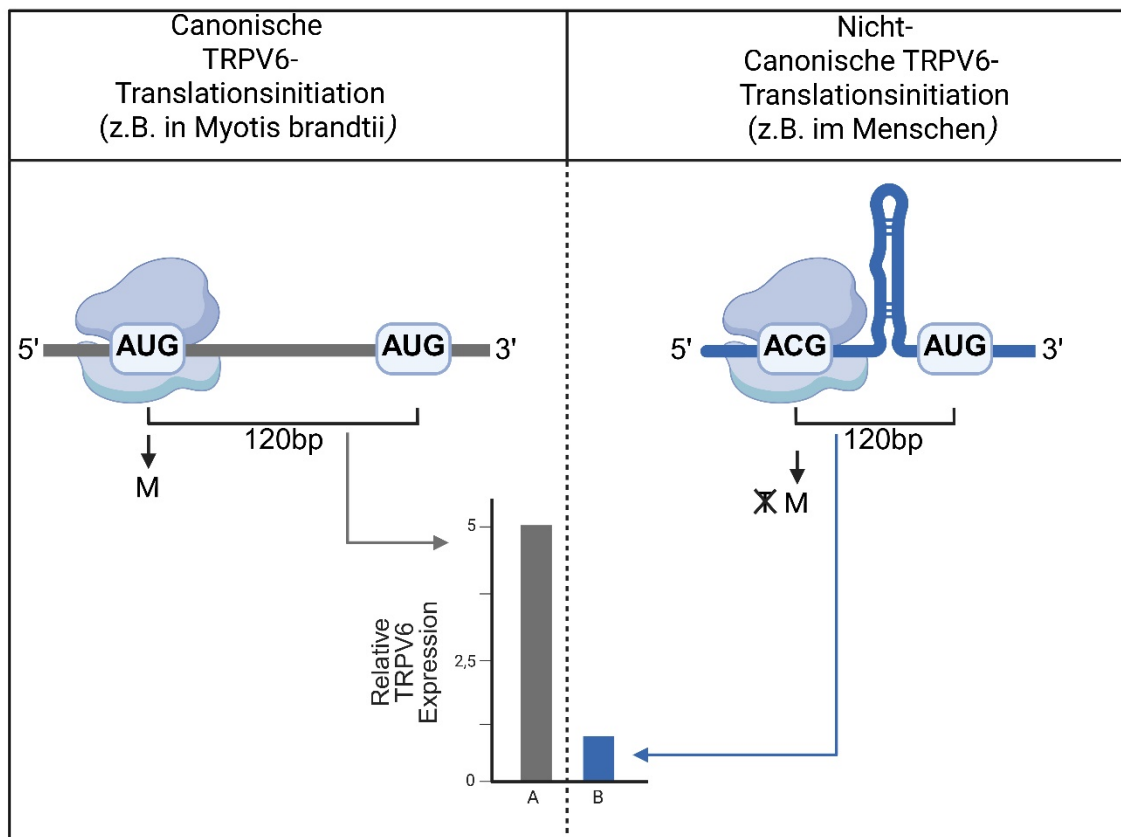


Abbildung 5: Schematische Darstellung der differenziellen Translationsinitiation in der Fledermaus und im Menschen. Erstellt mit BioRender

Diese atypische Initiation wird durch eine stabile Stamm-Schleifen-Struktur (Stem Loop) innerhalb des initial als 5' UTR annotierten Bereichs der mRNA unterstützt. Obwohl diese Region bei Nutzung des upstream gelegenen ACG-Codons formal zur kodierenden Sequenz gehört, verlangsamt die sekundärstrukturelle Ausbildung (RNA-folding) das ribosomale Scanning in 3'-Richtung und reguliert so die Translationseffizienz. Diese Erkenntnisse ergaben quantitative Vergleichsanalysen der TRPV6-Expression in HEK293 Zellen die entweder mit dem humanen, einem humanisierten chiropteren oder dem chiropteren TRPV6-Plasmid, das den 5' UTR von *Myotis brandtii* enthielt, transfiziert wurden. Letzteres wies anstelle des ACG ein konservatives AUG-Startcodon auf. Die Verwendung eines kanonischen AUG-Startcodons steigerte die TRPV6-Expression um das Fünffache [151].

1.2.1.2 Charakteristische TRP-Kanaltopologie mit strukturellem Fokus auf TRPV6

Trotz funktioneller Diversität weisen alle TRP-Kanäle eine einheitliche Grundstruktur auf. Die Kanäle besitzen eine sechs Transmembrandomänen-Topologie (S1-S6), wobei S5 und S6

zusammen mit der Porenhelix zu Homo- und Hetero-Tetrameren assemblieren, von S1-S4 flankiert werden und so eine zentrale Kanalpore bilden. Anhand der Sequenzhomologie und funktioneller Charakterisierungen der TRP-Subfamilien wurde bereits in frühen Studien eine Tetramerisierung einzelner TRP-Monomere angenommen [152-155], die ab 2013 für verschiedene Subtypen nach und nach mittels Kryo-Elektronenmikroskopie bestätigt werden konnte [156-161]. Zudem wurden gemeinsame Strukturmerkmale einiger Subgruppen identifiziert. Hierzu zählen beispielsweise Ankyrin-Repeat-Domänen im N-terminalen Bereich von TRPV-, TRPC-, TRPA- und TRPN-Kanälen, die sich subgruppenspezifisch in ihrer Anzahl unterscheiden [130, 142, 143, 162]. Ein weiteres Beispiel ist die sogenannte TRP-Box, ein konservierter hydrophober Sequenzabschnitt C-terminal der sechsten Transmembrandomäne, die in TRPC-, TRPV-, und TRPM-Kanälen vorliegen [163]. Analog zur allgemeinen TRP-Kanalarchitektur weist auch TRPV6 eine tetramere Struktur mit sechs Transmembrandomänen pro Untereinheit auf (Abb. 6). Über die sechs Ankyrin-Repeats am N-Terminus erfolgt die intrazelluläre Tetramerisierung des Kanals. Davor befinden sich zwei kurze β -Faltblattstrukturen ($\beta 1$, $\beta 2$), die Linkerhelix LH1 sowie LH2 und die prä-TM-Helix, welche funktionell und strukturell an der Stabilisierung des N-terminalen Bereichs beteiligt sind. An die Transmembrandomäne (S1–S6) schließt sich, analog zu anderen TRPV-Kanälen, am C-Terminus eine kurze TRP-Helix an, die parallel zur Membran verläuft und die konservierte TRP-Box enthält. Weiter distal befindet sich eine weitere β -Faltblattstruktur ($\beta 3$) und zwei weitere Helices (CIH1 und CIH2) [164-166].

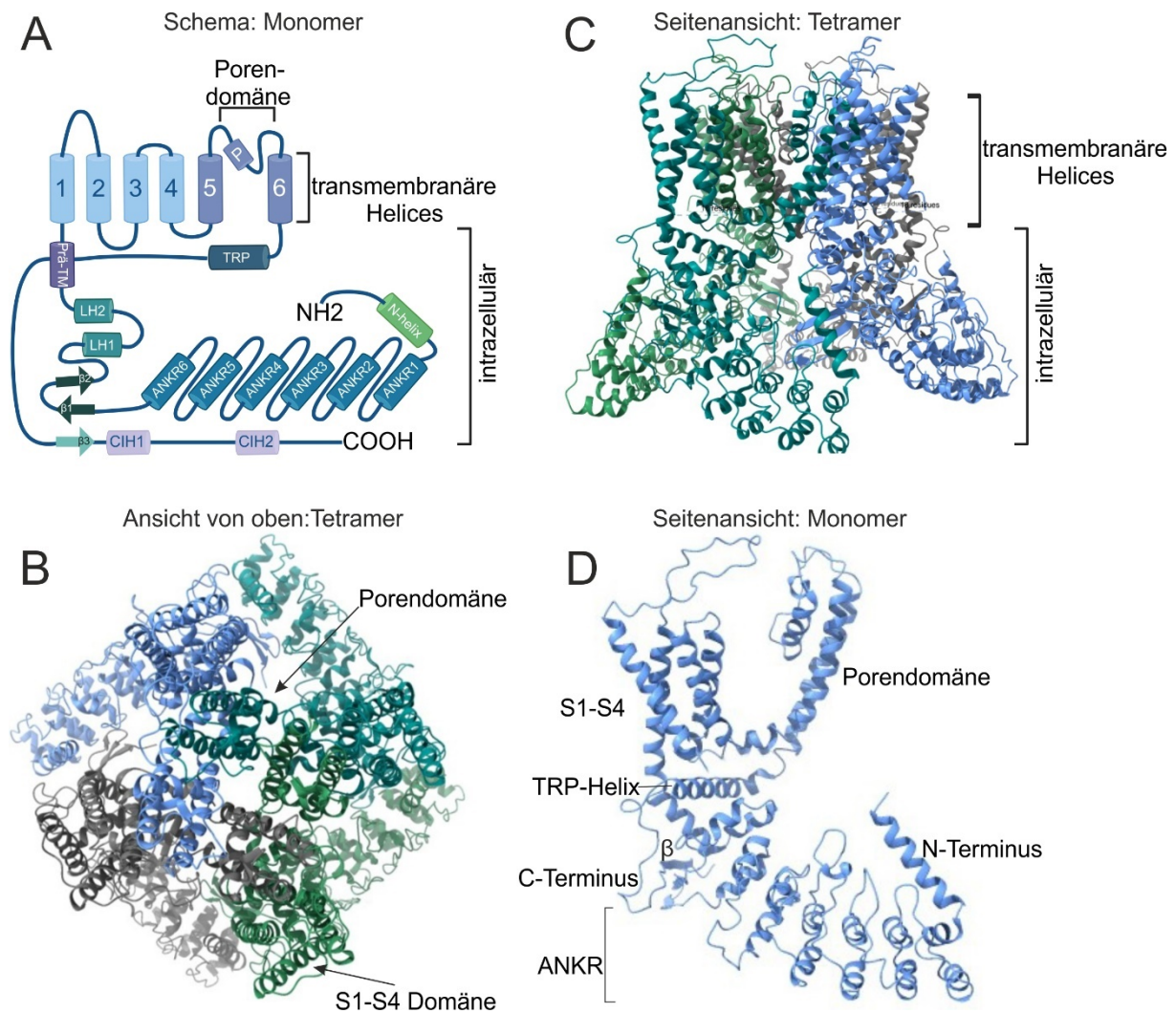


Abbildung 6: Verschiedene Perspektiven der TRPV6-Kanalstruktur: Kristallstruktur und schematische Domänenorganisation. (A) Schematische Illustration der modularen Domänenstruktur einer einzelnen TRPV6-Untereinheit, erstellt mit BioRender (B) Axiale Ansicht, die den zentralen Ionenleitweg und die tetramere Organisation der Untereinheiten verdeutlicht (C) Laterale Darstellung des tetrameren Kanalkomplexes. Farblich differenzierte Darstellung der vier identischen Untereinheiten des Tetramers (D) Illustration eines TRPV6-Monomers. 1-6= Transmembrandomänen, P= Porenloop, TRP= amphipathische TRP-Helix, CIH1 und 2= C-terminal interagierende Helices 1 und 2, Prä-TM= Prä-S1-Helix, LH1 und 2= Linker Helix 1 und 2, $\beta_{1,2}$ und 3= β -Faltblatt 1,2 und 3, ANKR= Ankyrin-Repeat Domänen. Strukturmodell von TRPV6 (PDB-ID: 6BO8), dargestellt mit ChimeraX. Anpassung der Farbgebung der Untereinheiten, der Beschriftung sowie der räumlichen Orientierung. Struktur basierend auf den Daten von Saitome et al. 2016 [164]

1.2.1.3 TRPV6-Expression und Funktion

TRPV6 wird beim Menschen in einer Reihe von exokrinen Drüsen wie in Azinuszellen des Pankreas, Tränen- und Speicheldrüsen, sowie in der Plazenta [135, 167] exprimiert, wobei der Kanal hauptsächlich in der Synzytiotrophoblastenschicht nachgewiesen wird und eine wesentliche Funktion in der feto-maternalen Barriere erfüllt. Eine verstärkte Expression von

TRPV6 ist zudem in verschiedenen epithelialen Tumoren nachweisbar, darunter Ovarial-, Endometrium-, Mamma- und Prostatakarzinome. Besonders für die beiden Letzteren wird dabei ein Zusammenhang zwischen erhöhter TRPV6-Transkription und dem Fortschreiten der Erkrankung beschrieben [135, 168-171], wobei bisher nicht charakterisiert werden konnte ob es sich hierbei um eine Begleiterscheinung der Karzinogenese oder um einen progressionsfördernden Aspekt handelt. Funktionell vermittelt TRPV6 einen hochgradig selektiven Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und gehört damit, ebenso wie der strukturell verwandte TRPV5-Kanal, zu den wenigen TRP-Kanälen mit hoher Calciumselektivität. Unter Zusatz von Calciumchelatoren weist der Kanal auch eine begrenzte Permeabilität für andere divalente Kationen wie Ba^{2+} , Sr^{2+} und monovalente Kationen wie Na^+ auf [135, 146, 172, 173]. Die Aktivität von TRPV6 unterliegt einer calciumabhängigen Rückkopplungsregulation. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Inaktivierung des Kanals, wobei Calmodulin als zentraler Vermittler dieses Prozesses fungiert [174-176]. Obwohl TRPV6-Transkripte in verschiedenen Geweben nachgewiesen wurden, konnten native Ströme bislang nur in überexprimierenden Zellsystemen charakterisiert werden. Untersuchungen an TRPV6-defizienten Mausmodellen sowie genetische Analysen in humanem Gewebe weisen jedoch darauf hin, dass TRPV6 eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der epithelialen Calciumhomöostase spielt. Dabei konnten Störungen der Kanalaktivität mit klinisch relevanten Dysbalancen im Calciumstoffwechsel in Verbindung gebracht werden, die sich unter anderem in Geweben mit hoher transzellulärer Calciumtransportaktivität, wie etwa der Plazenta und dem exokrinen Pankreas, manifestieren [50, 52, 54, 177].

1.2.1.4 TRPV6- assoziierte Erkrankungen

Neben der vielfach beschriebenen Überexpression von TRPV6 in epithelialen Neoplasien konnten auch krankheitsrelevante Mutationen in verschiedenen nicht-malignen Erkrankungen identifiziert werden. Eine genetische Assoziation wurde unter anderem für Fälle früh einsetzender chronischer Pankreatitis beobachtet [177]. Während einzelne Aminosäuresubstitutionen wie Ile223Thr, Leu299Gln oder Asp324Asn in elektrophysiologischen Analysen im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Veränderungen des Calcium-Einstroms zeigen, führen andere Varianten wie Leu576Arg zu einer deutlich reduzierten Kanalaktivität [178]. Darüber hinaus berichten mehrere Studien von einer klinischen Relevanz von TRPV6 im Kontext der fetalen Mineralstoffversorgung. In mehreren voneinander unabhängigen Studien wurden biallelische Mutationen im TRPV6-Gen mit einem transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus (TNHP) in Verbindung gebracht. Klinisch manifestiert sich das Bild typischerweise in Form einer Hypocalcämie mit sekundärem kompensatorischem Hyperparathyreoidismus und variabel ausgeprägten dysplastischen

Veränderungen des Skeletts, die sich postnatal unter Calciumsupplementierung zurückbilden können. Charakteristisch ist eine gestörte Mineralisierung des fetal-ossären Systems, die bereits intrauterin in Form von Wachstumsverzögerung erkennbar sein kann. Die Pathogenese wird auf eine unzureichende transzelluläre Calciumtransportrate im Trophoblastenepithel der feto-maternalen Barriere zurückgeführt.

Die molekularen Mechanismen der reduzierten Calciumtransportrate lassen sich exemplarisch anhand einer compound-heterozygoten Mutation veranschaulichen, bei der ein Allel ein vorzeitiges Stopcodon (Arg510stop) und das andere eine Aminosäuresubstitution von Glycin zu Arginin an Position 660 (Gly660Arg) aufweist [54]. Diese Kombination scheint zu einer fehlerhaften Tetramerisierung der TRPV6-Untereinheiten und infolgedessen zu einer verminderten Oberflächenexpression des Kanals zu führen, wie in vitro Studien durch elektrophysiologische Messungen bestätigen. Zusätzlich wird in der Plazenta eines betroffenen Neugeborenen eine Hochregulation von Serinproteasen beobachtet, weshalb sekundäre molekulare Anpassungsprozesse infolge des gestörten Ionenhaushalts angenommen werden [179]. Weitere Fälle von TNHP sind bei Säuglingen mit homozygoten Asp529Asn [53] oder Arg179Cys-Varianten [50] sowie compound-heterozygoten TRPV6 Mutationen wie Gly451Glu in Kombination mit Arg483Trp [50] beschrieben, die zu einem vergleichbaren klinischen Bild führen. Dementsprechend lassen sich in unterschiedlichen Individuen diverse Mutationen im TRPV6-Gen identifizieren, die trotz struktureller und funktioneller Heterogenität mit einem vergleichbaren neonatalen Phänotyp und Störungen der feto-maternalen Calciumhomöostase assoziiert sind.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionelle Bedeutung des selektiven Calciumkanals TRPV6 im Kontext trophoblastischer Zellfunktionen an der feto-maternalen Schnittstelle näher zu untersuchen. Aufbauend auf der bekannten Expression von TRPV6 in Plazentatrophoblasten und seiner vermuteten Rolle im Calciumtransfer zwischen Mutter und Fetus soll in einem humanen Trophoblasten-Zellmodell ermittelt werden, inwiefern die Expression dieses Kanals grundlegende Eigenschaften des Zellverbands beeinflusst. Hierzu wurde die Generierung von Zelllinien in Auftrag gegeben, die mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie entweder TRPV6 deletieren oder überexprimieren, um diese funktionell mit Zellen mit physiologisch endogener TRPV6-Expression zu vergleichen. Im Zentrum der Untersuchungen stehen dabei sowohl morphologische Merkmale, insbesondere im Hinblick auf Differenzierungsprozesse und die Fähigkeit zur Zellfusion, als auch funktionelle Aspekte wie Barriere-assoziierte Transportvorgänge und hormonproduzierende Aktivität. Ergänzend sollen Unterschiede in der intrazellulären Calciumhomöostase in Abhängigkeit der TRPV6-Expression erfasst werden.

Abschließend dient eine massenspektrometrisch basierte Proteomanalyse der Identifikation von potenziellen TRPV6-assoziierten Signalwegen und kompensatorischen Regulationsmechanismen, um den Beitrag des Kanals zur Steuerung trophoblastischer Funktionen umfassend zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten und nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Perkin Elmer (USA).

2.1.2 Zellkultur

Zelllinien

BeWo-Wildtyp (WT) (Ubigene Katalognummer# YC-D018)

BeWo D10 und E10 Klone (Firma Ubigene Guangzhou, China, CRISPR/Cas9 modifiziertes *TRPV6* Target Gen, Gene ID 55503)

BeWo-Zellkulturmedium

Ham's F-12 Nutrient Mix (Gibco)

Glutamax Nutrimix F12 (Gibco)

20% (v/v) Fetales Kälberserum (Corning)

100U/mL Penicillin (Sigma-Aldrich-Merck)

100µg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich-Merck)

PBS-Puffer zum Waschen und Ernten der Zellen

136mM NaCl

2,7mM KCl

1,47mM KH_2PO_4

8mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

pH 7,4

Poly-L-Lysin Lösung zur Beschichtung von Glasplatten

100mg Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich-Merck)

gelöst in einem Liter autoklaviertem, deionisiertem Wasser

Forskolin-Lösung

12,8mM Forskolin (Sigma-Aldrich-Merck)

gelöst in DMSO

Trypsin zur Zellernte

10x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich-Merck)

1:10 verdünnt in PBS

siRNAs

TRPV6 Silencer AM 16704, ID 105492, 20nM, Aliquote eingestellt auf 10µM mit Nuklease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific)

TRPV6 Silencer AM 16704, ID 113577, 20nM, Aliquote eingestellt auf 10µM mit Nuklease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific)

Silencer Negativkontrolle 4390843, 5nM, Aliquote eingestellt auf 10µM mit Nuklease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific)

2.1.3 Permeabilitätsversuch

Humane Plazentakollagenlösung zur Membranbeschichtung

1mg/mL humanes Plazentakollagen (Sigma-Aldrich-Merck)

gelöst in sterilem Wasser

Ersatzmedium

TRITC-Dextran Lösung (10mg/mL) (Sigma-Aldrich-Merck) Endkonzentration 1mg/mL

FITC-Albumin Lösung (10mg/mL) (Sigma-Aldrich-Merck) Endkonzentration 0,25mg/mL

0,2% (m/v) BSA (Bovines Serumalbumin)

in PBS

Leermedium für basale Kammer

0,2% (w/v) BSA

in PBS

2.1.4 Immunzytochemie

Fixierungslösung

100% (v/v) Methanol

Blocking-Puffer

3% (w/v) BSA

1% (v/v) Ziegenserum

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

in PBS

Primärantikörperlösung

Primärantikörper (siehe Tabelle 1) 1:1000
in Blocking-Puffer

Sekundärantikörperlösung

Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) 1:1000
in PBS

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) -Lösung

DAPI (Sigma-Aldrich-Merck) 1:1000
in PBS

2.1.5 Calciumimaging

Fura-2-Acetoxymethylester (AM)-Lösung

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

Ringerlösung

140mM NaCl
2,8mM KCl
1mM CaCl₂
2mM MgCl₂
10mM HEPES
10mM Glucose
pH 7,3

2.1.6 Proteinbiochemie

Sofern nicht anders beschrieben wurden die Lösungen und Puffer mit Millipore Wasser (MilliQ-Anlage) angesetzt.

RIPA-Puffer zur Zelllyse

150mM NaCl
50mM Tris HCl pH 8
5mM EDTA
1% (v/v) Nonidet P40
0,1% (w/v) SDS
0,5% (v/v) Na-Deoxycholat

RIPA-Puffer zur Zellyse + Proteaseinhibitor

eine Tablette Proteaseinhibitor cOmplete™ Mini (Roche)
gelöst in 10mL RIPA-Puffer

2x Lämmli Denaturierungspuffer

8% (w/v) SDS
120mM TRIS pH 6,8
0,01% (w/v) Bromphenolblau
20% (v/v) Glycin
10% (v/v) β-Mercaptoethanol

4x Lämmli Denaturierungspuffer

16% (w/v) SDS
240mM TRIS pH 6,8
0,02% (w/v) Bromphenolblau
40% (v/v) Glycin
20% (v/v) β-Mercaptoethanol

MOPS Gelelektrophorese-Puffer

MOPS-Puffer NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X) (Thermo Fisher Scientific) 1:20
in Wasser

Transferpuffer Western Blot

20% (v/v) TransBlot Turbo 5x Transfer Buffer
20% (v/v) Ethanol reinst.

Ponceau-Lösung zur Proteinfärbung

0,5% (w/v) Ponceau
1% (v/v) Essigsäure

Stripping-Puffer zum Wiederherstellen von Western-Blot Membranen

62,5mM TRIS pH 6,0
2% (w/v) SDS
100mM β-Mercaptoethanol

10x TBS zum Waschen von Nitrocellulose-Membranen

500mM TRIS pH 7,5

1,5mM NaCl

1:10 in Wasser

TBST-Puffer als Waschpuffer zum Stripping

10% (v/v) Tween 20

in 1% (v/v) TBS

BSA-Lösung

5% (w/v) BSA

0,05% NaN₃

10% (v/v) 1xTBS (Lösungsmittel)

Primärantikörperlösungen

10µg Primärantikörper (siehe Tabelle 1)

2mL BSA-Lösung

8mL 1xTBS

0,05% (w/v) NaN₃

Magermilch in TBS zum Western-Blot Blocking und Ansetzen sekundärer Antikörperlösungen

5% (w/v) Magermilchpulver

in 1xTBS

Sekundärantikörperlösung

Sekundärantikörper (Tabelle 2)

in Magermilch in TBS

ECL-Lösung zum Entwickeln von Western Blots

50% (v/v) Western Lightning ® Plus ECL Oxidizing Reagent Plus

50% (v/v) Western Lightning ® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus

2.1.7 Massenspektrometrie

Fixierungslösung für MS-Gel

40% (v/v) Ethanol reinst.

10% (v/v) Essigsäure (Eisessig)

Bluesilver Coomassie Färbelösung

20% (v/v) Methanol

10% (v/v) Phosphorsäure

10% (w/v) Ammoniumsulfat

0,125% (w/v) Coomassie G250

Waschlösung A

50mM Ammoniumhydrogencarbonat

Waschlösung B

50% (v/v) Waschlösung A

50% (v/v) Acetonitril

Reduktionslösung

10mM Dithiothreitol

in Waschlösung A

Alkylierungslösung

5mM Iodacetamid

in Waschlösung A

Trypsin-Verdaulösung

20µg "Sequencing Grade Modified Trypsin" (Promega)

in 1mL Waschlösung A

Extraktionspuffer

50% (v/v) Acetonitril

2,5% (v/v) Ameisensäure

Peptid Rekonstitutionspuffer /Fließmittel A

0,1% (v/v) Ameisensäure

Fließmittel B

0,1%(v/v) Ameisensäure

90% (v/v) Acetonitril

2.1.8 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper für Immunpräzipitation (IP), Immunzytochemie und Western Blot (WB)

Antikörper	Klonalität	Epitoplage	Herkunft	Produzent	Verdünnung und Lösungsmittel
Anti-ZO-1- Antikörper	Polyklonal	N-terminal	Kaninchen	Invitrogen	1:1000 in Blocking Puffer
Affi 429 (TRPV6)	Polyklonal	C-Terminus	Kaninchen	FR 2.4 UdS, AG Flockerzi	IP 10µg WB 1:100
Affi 1271 (TRPV6)	Polyklonal	N-Terminus	Kaninchen	FR 2.4 UdS, AG Flockerzi	1:100

Tabelle 2: Sekundärantikörper für Immunzytochemie und Western Blot

Antikörper	Klonalität	Epitop	Herkunft	Produzent	Verdünnung und Lösungsmittel
VeriBlot IP Detection Reagent 131366	-	Humane IgG1, Rind, Ziege, humane Ratte, Schaf und Maus IgG2, Maus IgG3, humane IgG4, alle Kaninchen IgGs	-	Abcam	1:300 in Magermilch in TBS+ 0,01% Thiomersal
Alexa-Flour 488 anti- rabbit- Antikörper	Polyklonal	Schwere und leichte IgG-Ketten	Ziege	Invitrogen	1:1000 in PBS
Anti-rabbit HRP	Polyklonal	Schwere und leichte IgG-Ketten	Affe	GE Healthcare	1: 30.000

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 BeWo-Zellkultivierung

Die humanen BeWo-Zellen sowie die TRPV6-CRISPR/Cas9 Mutanten-Zelllinien D10 und E10 wurden über die Firma Ubigene (Korea) erworben, wobei die von der Firma bereitgestellten Sequenzierungsdaten der TRPV6-Mutationszelllinien von PD Dr. Ulrich Wissenbach (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Zentrum für Molekulare Signalübertragung (PZMS), Universität des Saarlandes) überprüft wurden. Die Zelllinien wurden nach Herstelleranweisung in F-12 Nut Mix mit 2mM Glutamax, 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (2.1.2) in 75cm² oder 175cm² Kulturflaschen (Greiner) und unter 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei 90-100% Konfluenz wurden die Zellen entweder mit PBS (2.1.2) gewaschen und mit Trypsin (2.1.2) „gesplitted“ oder mittels Zellschaber (Corning) und PBS geerntet, bei 200G für 5 Min zentrifugiert, das PBS abpipettiert und die Zellpellets bei -80°C weggefroren [180].

2.2.1.2 Experimentelle Variation der extrazellulären Calciumkonzentration in BeWo-Zellen

Um den Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Funktionen von BeWo-Wildtypzellen zu untersuchen, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium durch eines von vier definierten Medien ersetzt: entweder Medium mit regulärer Calciumkonzentration (0,94mM Ca²⁺/Ca²⁺ N) oder reduziertem Calciumgehalt (0,35mM Ca²⁺/Ca²⁺ L), jeweils ergänzt mit FSK oder DMSO. Die Reduktion der Calciumkonzentration auf 0,35mM wurde durch Zugabe von EDTA erreicht, wobei die erforderliche Menge (0,6 mM) mittels WebmaxC Standard (Version 7/3/2009) ermittelt wurde. Die tatsächlichen Calciumkonzentrationen wurden mit dem Dri-Chem NX500i 546 System (Fujifilm, Japan) überprüft [180].

2.2.1.3 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Glasplatten

Die Poly-L-Lysin-Beschichtung von Glasplatten (ORSAtec ø 12mm oder 2,5cm) dient der besseren Adhäsion der Zellen auf den entnehmbaren Glasplatten zu mikroskopischen Zwecken. Die Glasplatten wurden mit einer sterilen Pinzette in die Wells eingelegt und mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach 30 min wurde das Poly-L-Lysin (2.1.2) abgesaugt, zweimal mit sterilem Wasser und zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen. Danach konnten die Zellen für die verschiedenen Versuche auf den Glasplatten ausgesät werden.

2.2.1.4 Schnelfärbung der BeWo-Zellen

Zur Untersuchung der Zellproliferationsrate wurde eine versuchsspezifische Menge an Zellen entweder auf Kollagen-beschichtete Polyethylenterephthalat-Membranen (Corning, #353495, \varnothing 0,33cm²) oder in Zellkulturschalen (\varnothing 35mm, Falcon) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach definierter Inkubationszeit (24-72h) wurden die Zellen zunächst mit kaltem Methanol fixiert und danach mit dem Haema Schnelfärbekitt (Lehmann) nach Herstelleranweisung direkt in der Zellkulturschale oder dem Membraneinsatz gefärbt. Anschließend erfolgte die schrittweise Färbung mit Eosin-, gefolgt von der Applikation der Azur-Färbelösung. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung überschüssiger Farbstoffe konnten die Zellen anschließend mikroskopisch analysiert werden (Axio Imager M2, Zeiss).

2.2.1.5 Induktion von Synzytialisierung und Hormonsynthese in BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9-Mutanten

Die Synzytialisierung und die damit einhergehende Differenzierung von Zytotrophoblast-artigen zu Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen sowie die Hormonsynthese wurde durch FSK-Zugabe zum Zellkulturmedium induziert. Hierfür wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplatten (ORSAtec \varnothing 12mm) in einer 24-Well Platte oder in kleinen Zellkulturflaschen (Greiner, 25cm²) so ausgesät, dass sie nach 24h 70% konfluent waren. Um die Eigenschaften von Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen mit denen der Zytotrophoblast-artigen Zellen zu vergleichen, wurde das Medium (0,35mM oder 0,94mM Calcium) daraufhin entweder durch BeWo-Zellkulturmedium ersetzt, dem 30 μ M FSK in 0,45% DMSO (2.1.2) zugesetzt wurde, oder durch ein Medium, das lediglich die entsprechende Menge DMSO enthalten hat [180], wobei die DMSO behandelten Zellen die Zytotrophoblast-artige Zellen repräsentierten. Nach 48-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen sowohl für die immunzytochemische (2.2.3) - als auch für vergleichende Hormonsekretions (2.2.5) - und Proteomanalysen (2.2.7) weiterverarbeitet.

2.2.1.6 Untersuchung von Transporteigenschaften der BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9 Mutanten

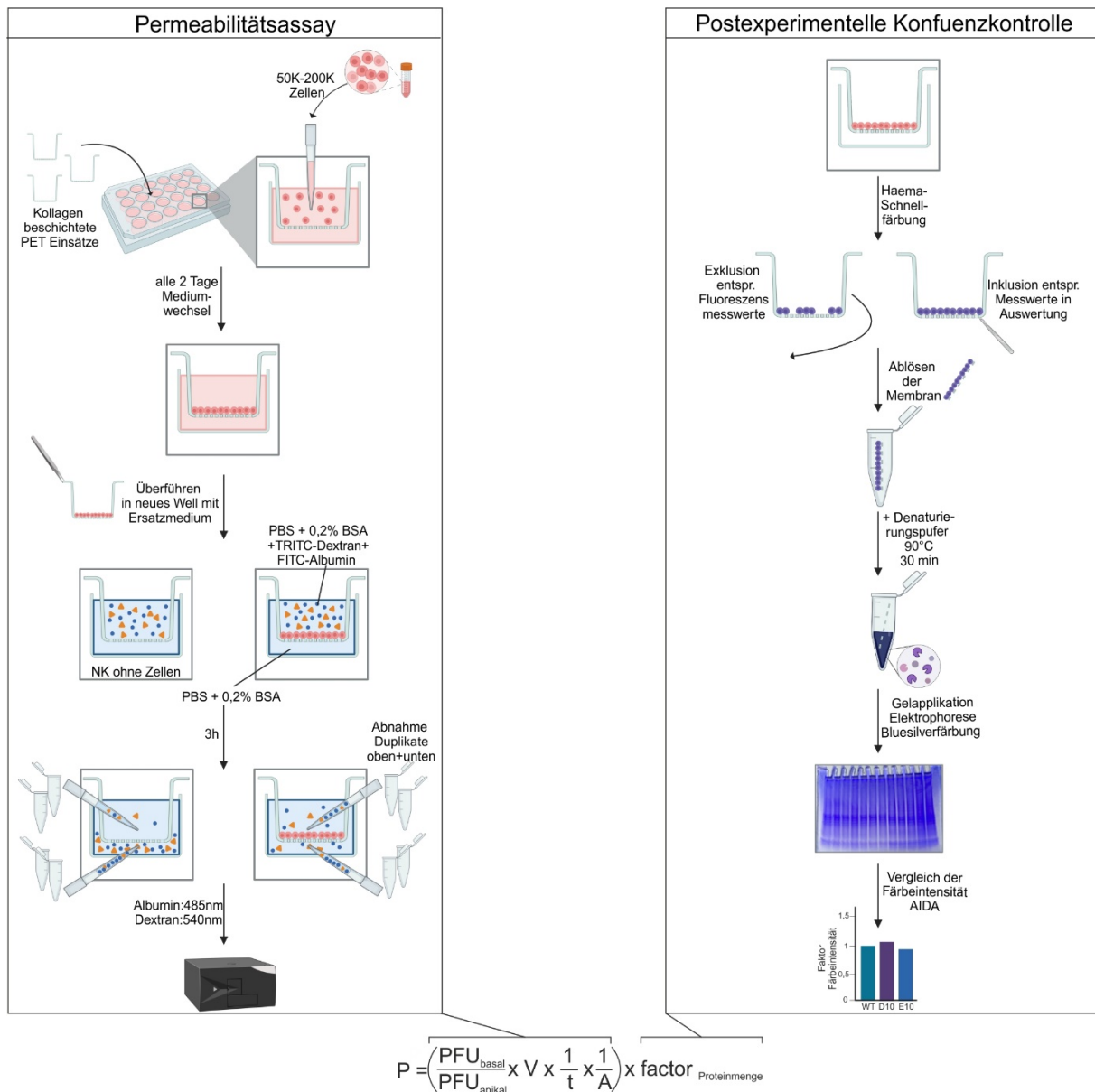


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Permeabilitätsmessung. Links: Übersicht der Zellkultivierung auf PET-Membraneinsätzen und anschließende Vermessung der TRITC-Dextran und FITC-Albumin Permeabilität. Rechts: Optische und densitometrische Validierung der Einzelschichtkonfuenz. Erstellt mit BioRender

Die Transporteigenschaften der BeWo-Zelllinien kann durch Messung der Durchlässigkeit einer Zellschicht in einem Transwellssystem charakterisiert werden. Zur Ermittlung des parazellulären Transports sind TRITC-Dextran- und für die des para- und transzellulären Transports FITC-Albumin gängige Substrate. Zunächst wurden Polyethylenterephthalat (PET) Einsätze (Corning, #353495, \varnothing 0,33cm²) in einer 24-Well Platte (Falcon) mit 100µL 0,4mg/mL humanem Plazentakollagen (2.1.3) in H₂O für 3h unter einer Laminar-Flow-Haube beschichtet,

wobei pro Versuch jeweils zwei zusätzliche Membranen als unbewachsene Negativkontrolle mit inkubiert wurden. Diese diente der Konfluenz-Kontrolle. Während die Zellen für die Ausplattierung vorbereitet wurden, erfolgte eine Vorbefeuchtung der Membranen durch Zugabe von vorgewärmten (37°C) PBS (2.1.2). 600µL BeWo-Zellkulturmedium (2.1.2) wurden in die basale Kammer (unteres Kompartiment) gegeben und in die apikale Kammer (oberes Kompartiment) das jeweilige Zellsuspensionsvolumen, das einer Aussaatdichte von 150.000-200.000 Zellen für den BeWo-Zell-TRPV6-Wildtyp und 50.000-100.000 Zellen für die beiden TRPV6-Mutanten D10 und E10 entsprach. Die Adaption der ausgesäten Zellzahl erfolgte aufgrund der schnelleren Proliferationsrate der beiden TRPV6-Mutantenzelllinien. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel in beiden Kammern durchgeführt, der anschließend alle zwei Tage bis zur vollständigen Konfluenz wiederholt wurde. Für die Permeabilitätsuntersuchung wurde die entsprechende Anzahl an Wells einer neuen 24-Well Platte mit 600µL Leermedium (2.1.3) versehen (unteres Kompartiment). Das Medium der apikalen Kammer wurde abgesaugt und die Einsätze wurden mit einer ausgekochten Pinzette von der alten Platte in die Wells der neuen Platte überführt. Im Anschluss wurden 100µL Ersatzmedium (2.1.3), welches die konjugierten Substrate TRITC -Dextran (1mg/mL) und FITC-Albumin (0,25mg/mL) enthielt, in die apikale Kammer pipettiert und die Platte (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach 3h wurden pro Transwellsystem jeweils 20µL aus der apikalen Kammer und in einem separaten Eppendorfgeläß 20µL aus der jeweiligen Empfängerammer (basale Kammer) mit 180µl PBS verdünnt, um die Transporteigenschaften von apikal nach basal zu charakterisieren. Zur Ermittlung der Substratkonzentrationen in den Kammern wurde eine Standartreihe erstellt:

- 1.Dextran: 1mg/mL, Albumin: 0,25mg/mL
- 2.Dextran: 0,5mg/mL, Albumin: 0,125mg/mL
- 3.Dextran: 0,25mg/mL, Albumin: 0,0625mg/mL
4. Dextran: 0,125mg/mL, Albumin: 0,031mg/mL
5. Dextran: 0,0625mg/mL, Albumin: 0,0156mg/mL
6. Dextran: 0,03125mg/mL, Albumin:0,0078mg/mL
7. Dextran: 0,0156mg/mL, Albumin: 0,0039mg/mL
8. Dextran: 0,0078mg/mL, Albumin: 0,00195mg/mL

Pro Probe wurden technische Duplikate aus der apikalen und basalen Kammer, sowie die Verdünnungsreihe auf eine schwarze Polystyrol-96-Well-Tecanplatten (Corning) aufgetragen und die Fluoreszenzintensität von FITC-Albumin bei 485nm und von TRITC-Dextran bei 540nm gemessen. Zur Berechnung des Permeabilitätsfaktors P wurde folgende Formel verwendet:

$$P = \left(\frac{RFU_{basal}}{RFU_{apikal}} \right) * V * \frac{1}{t} * \frac{1}{A}$$

RFU basal= Mittelwert Fluoreszenzintensität unten

RFU apikal= Mittelwert Fluoreszenzintensität oben

V=Volumen

1/t= Zeit (3h)

1/A= 1/Membranfläche des Transwell-Einsatzes

Im Anschluss an die Permeabilitätsmessung von Albumin und Dextran erfolgte eine visuelle Konfluenz-Kontrolle, indem die Membranen mit Hilfe einer Punktturnadel aus den Einsätzen gelöst wurden und die darauf befindlichen Zellen anschließend mittels HEAMA Schnellfärbekit angefärbt wurden (2.2.1.4). Lag keine Zellkonfluenz vor, wurde die jeweilige Membran sowie die zugehörigen Fluoreszenzintensitäten von der Auswertung ausgeschlossen. Um die Proteinmenge innerhalb der Versuchsreihe miteinander zu vergleichen, wurden die Zellen anschließend von der Membran gelöst, indem sie in ein Eppendorfgefäß überführt, 50µL 2x-Lämmli-Denaturierungspuffer (2.1.6) appliziert und für 30 Min bei 90°C inkubiert wurde. Dabei wurden Zell-Lysate generiert, wovon jeweils 15µL/Probe auf ein 4-20%-iges Mini-PROTEAN® BioRad Gel aufgetragen wurden. Mittels Comassie Färbelösung (2.1.7) wurden die Proteine auf dem Gel visualisiert und eine densitometrische Vergleichsanalyse mit der AIDA Image Analysis Software durchgeführt. Die dadurch entstandenen Faktoren wurden mit den zugehörigen Permeabilitätsfaktoren multipliziert, um die Zellmenge in die Auswertung mit einzubeziehen.

2.2.1.7 siRNA-Transfektion zur Reduktion der TRPV6-mRNA in BeWo-Zellen

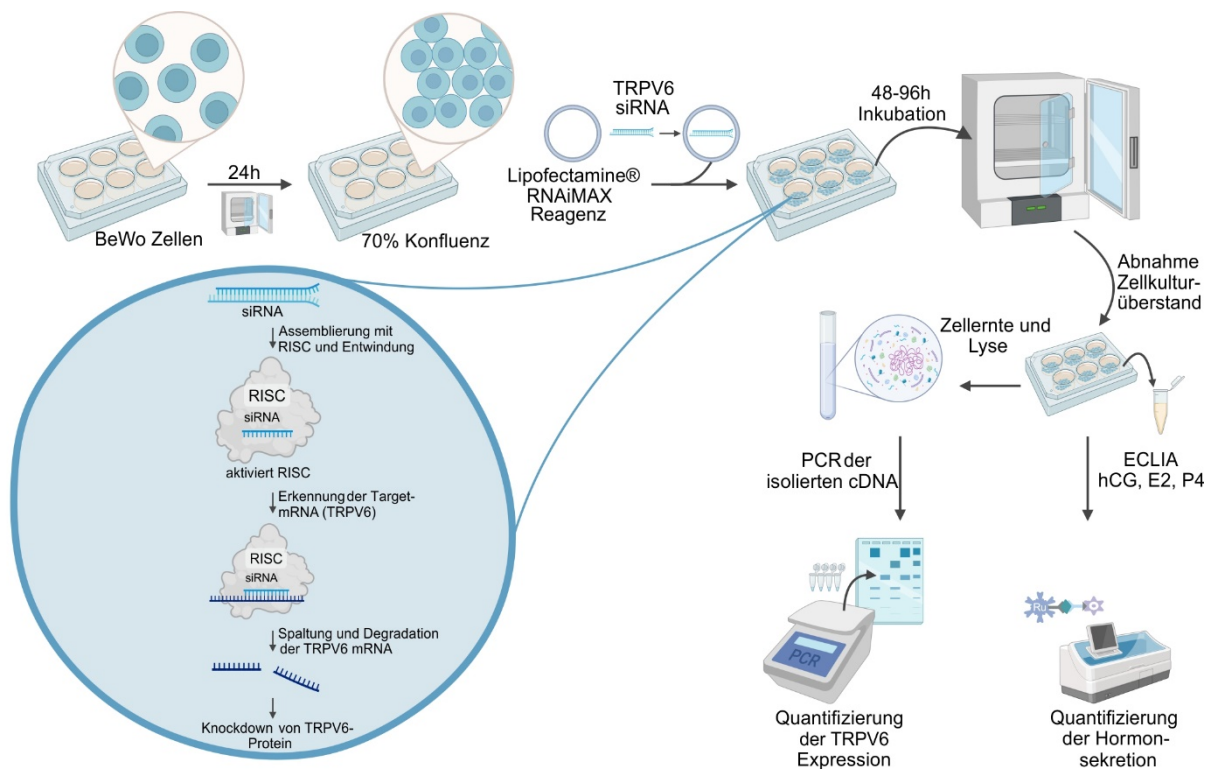


Abbildung 8: Experimenteller Aufbau der siRNA Transfektion zur Suppression der TRPV6 mRNA in BeWo Wildtyp-Zellen. Transfektion der Zellen bei 70-prozentiger Konfluenz und Inkubation mit gewähltem Transfektionskomplex für 48-96h entsprechend der Zellvitalität. Determinierung der Hormonkonzentration aus Zellkulturüberständen und parallele Generierung von Zelllysaten zur RNA-Extraktion, mit anschließender RT-PCR cDNA Synthese und Amplifikation mittels PCR zur Evaluation der TRPV6 Reduktion mittels siRNA. Erstellt mit BioRender

Zur Validierung der funktionellen Unterschiede zwischen der BeWo-Wildtyp- und den CRISPR/Cas9-Zelllinien wurde eine Transfektion mit TRPV6-gerichteten siRNAs durchgeführt, um die mRNA- und damit die TRPV6-Proteinexpression in der Wildtypzelllinie zu reduzieren. Die Eigenschaften der so generierten TRPV6-Knockdownzellen wurden anschließend mit denen der CRISPR/Cas9-Knockout D10-Zelllinie verglichen. Zwischen 340.000 und 420.000 BeWo-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und 24h lang und unter 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Die Zelltransfektion erfolgte unter Verwendung des in Opti-MEM™ Medium gelösten Lipofectamine™ RNAiMAX Reagenz (Thermo Fisher Scientific). Hierbei wurden 10-100nM TRPV6-spezifische siRNAs eingesetzt, entweder die TRPV6 adressierende siRNA mit der ID 105492, die mit der ID 113577 oder alternativ ein Mix beider TRPV6 adressierenden siRNAs im Verhältnis 1:1, sodass die siRNA-Endkonzentration ebenfalls zwischen 10 und 100nM lag (Thermo Fisher Scientific). Diese Mischung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Außerdem wurde ein Well jedes Experiments mit einer nicht zielgerichteten Kontroll-siRNA (Silencer® Select

Negative control #1 REF 4390843, Thermo Fisher Scientific) transfiziert, um sicherzustellen, dass das Transfektionsreagenz keine „Off-Target-Effekte“ verursacht. Der Transfektionskomplex verblieb zwischen 48h und einer Woche auf den Zellen und wurde alle zwei Tage um 2mL Medium (2.1.2) ergänzt, um das Überleben der Zellen sicherzustellen. Zur Untersuchung der Hormonsekretion wurden die Hormonkonzentrationen in den Zellkulturüberständen der unterschiedlich transfizierten Zellen im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes bestimmt. Die quantifizierten Werte wurden anschließend auf die Gesamt-RNA-Menge sowie intraexperimentell relativ zur Negativkontrolle normiert.

2.2.2 Genexpressionsanalyse

2.2.2.1 qPCR zur Quantifizierung der TRPV6-RNA-Expression

Die RNA der siRNA transfizierten BeWo-Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Plus Kit“ (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die Zellen wurden durch direkte Applikation von 600µL „QIAGENs RLT Plus Puffer“ (10µL β -ME/ 1mL Puffer RLT Plus) und durch Homogenisierung der Zellsuspension lysiert. Die RNA-Menge wurde mit einem NanoPhotometer® N60/N50 (Implen) bei 260/280nm quantifiziert. Ausgehend von der RNA wurde die cDNA-Synthese mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) wie folgt durchgeführt: 100ng der isolierten Gesamt-RNA wurden mit 4µL 5x Reaktionsmix vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20µL (\pm 5ng/µL) aufgefüllt, gemischt und 10 Min bei 25°C und anschließend 30 Min bei 55°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 85°C beendet. Die resultierende cDNA wurde als Vorlage für die Amplifikation von TRPV6-Transkripten in BeWo-Zellen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die PCR wurde mit 1,5µL 5ng/µL cDNA, 0,1µL Phusion-Polymerase (NEB), 5x HF-Puffer, 0,2µL 10mM dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate), 0,5µL jedes Primers (CACCATGTGCTGCATCTACC / AATGACAGTCACCAGCTCC für TRPV6 und GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG / ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA für GAPDH, 10mM) in einem Gesamtvolumen von 10µL bei 98°C für 60 Sek durchgeführt, gefolgt von einer Wiederholung von 20-45 Zyklen (98°C für 10 Sek, 64°C für 10 Sek und 72°C für 10 Sek). Zur Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte die Auftrennung auf einem drei-prozentigen Agarosegel (inklusive 0,00003% Ethidiumbromid) und die Dokumentation mit dem Gel Doc Imaging System (Herolab). Die Software ImageJ 1.54 wurde für die quantitative Analyse der PCR-Gelbandenintensität verwendet. Für jedes Experiment (n=5) wurden hierfür die PCR-Banden (Silencer ID 113577/ Silencer ID 105492/ Silencer 1:1 Mix, Silencer® Select Negative control #1) nach 30 PCR-Zyklen, normalisiert auf

die Bandenintensität des „Housekeeping-Gens“ GAPDH nach 30 PCR-Zyklen, zum Vergleich der TRPV6-Konzentrationen verwendet.

2.2.3 Immunzytochemie

2.2.3.1 ZO-1 Immunfärbung

Die BeWo-Zellen wurden für die Immunfärbung auf Poly-L-Lysin-beschichtete Glasplatten ausgesät (2.2.1.3, \varnothing 12mm), wobei pro Experiment und Klon bzw. Medium-Zusammensetzung vier Glasplatten mit Zellen vorbereitet wurden. Nach einer Inkubationszeit von 24h und Erreichen einer 70-prozentigen Zellkonfluenz wurden auf jeweils zwei Glasplatten 2mL Zellkulturmedium mit DMSO als Negativkontrolle und auf die übrigen zwei Glasplatten 30 μ M FSK-haltiges Zellkulturmedium (2.1.2) zur Induktion der Synzytialisierung appliziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 48h. Nach mikroskopischer Konfluenz-Kontrolle wurde die ZO-1 Immunfärbung durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 300 μ L PBS (2.1.2) gewaschen und anschließend für 20 Min bei -20°C mit 400 μ L 98% gekühltem Methanol (2.1.4) auf den Glasplatten fixiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 300 μ L frisch angesetzter Blocking-Puffer (2.1.4) appliziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Zellen dreimal für drei Min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 250 μ L des primären Antikörpers gegen das Tight-Junction-Protein Zona Occludens 1 (anti-ZO-1, 2.1.8, Tab. 1) über Nacht bei 4°C auf der Schüttelplatte. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Zellen erneut dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt mit 300 μ L des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 anti-rabbit (2.1.8, Tab. 2, in Blocking-Puffer) inkubiert. Nach Entfernung des Antikörpers wurden die Zellen erneut gewaschen, die Zellkerne mittels 10-minütiger DAPI-inkubation (1:1000 in PBS) gefärbt, die Zellen fünfmal gewaschen und die Glasplatten mit den Zellen auf Objektträgern mit „Mounting agent“ (Thermo Scientific) befestigt. Die Objektträger wurden für zwei Tage im Kühlschrank gelagert, um die Glasplatten auf dem Objektträger zu fixieren. Bilder der gefärbten BeWo-Zellen wurden mit einem Imager 2-Mikroskop (Zeiss) aufgenommen, das mit einer Axiocam MRm (Zeiss) ausgestattet war. Die Auswertung erfolgte, indem der Fusions-Index als Maß für die Zellfusion normiert auf die Zellzahl gebildet wurde ($((\text{NNS}-\text{S})/\text{T}) \times 100\%$), NNS= Anzahl der Kerne in Synzytien, S =Anzahl der Synzytien, T= Gesamtzahl der Kerne) [180].

2.2.3.2 Zellkerngrößenbestimmung

Zur klonsspezifischen Bestimmung der Zellkerngrößen wurden die Aufnahmen der ZO-1 Immunfärbung (2.2.3.1) herangezogen in der die Zellkerne mit DAPI visualisiert wurden. Hierbei wurden pro Zellklon und Bedingung der Durchmesser von mindestens 100 Zellkerne mit der AxioVision SE64 Rel.4.9 Software (Zeiss) vermessen und die Messwerte zwischen den Gruppen anschließend durch einen einseitigen ANOVA-Test verglichen.

2.2.4 Calcium Imaging mittels Fura-2

Relative Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration können mittels Fura-2 gemessen werden. Hierfür wurden die Zellklone zunächst auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplatten (2.2.1.3 $\varnothing = 2,5\text{cm}$) in Zellkulturschalen (Falcon, $\varnothing = 3\text{cm}$) ausgesät und in 2mL Zellkulturmedium für 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am Messtag wurden die Klone sequenziell vermessen, indem 1mL Medium aus der jeweiligen Zellkulturschale entnommen und 2 μL Fura-2-acetoxymethylester-Lösung (2.1.5) appliziert wurde. Nach Diffusion des Fura-2-AM Moleküls in die Zelle wird die AM-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolytisch abgespalten, sodass zytosolisch Fura-2 als Ca²⁺-Chelator zur Verfügung steht. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen dreimal mit Ringerlösung (2.1.5) gewaschen, die Glasplatten in eine Kammer mit offenem Boden eingesetzt und anschließend 300 μL der Ringerlösung seitlich appliziert. Anschließend wurde die Kammer mit den Zellen unter ein inverses Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) gelegt, das mit einem Fluar 20X/0,75 Objektiv (Zeiss), einem Monochromator (Polychrom V, TILL Photonics) und einer gekühlten ladungsgekoppelten (CCD) Kamera (Andor Technologies) ausgestattet war. Die TILLvisION Software (TILL Photonics) wurde für die Steuerung und Datenerfassung verwendet. Einzelne Zellen wurden nach der Visualisierung durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 360nm als „Regions of Interest“ (ROI) ausgewählt, zwei bis drei leere Bereiche als Hintergrund markiert und die emittierende Fluoreszenz von Fura-2 bei 510nm wurde nach alternierender Anregung bei 340nm und 380nm (0,5Hz) für 20 Millisekunden alle zwei Sekunden aufgezeichnet (Fura-Filter CHROMA). Die Verhältnisbilder wurden aus den bei 340 und 380nm aufgenommenen Fluoreszenzbildern nach Abzug der zellfreien Hintergrundfluoreszenz berechnet und von der TILLvisION Software automatisch über die Zeit aufgetragen. Die Endergebnisse repräsentieren das F340/F380-Verhältnis und wurden unter Zuhilfenahme des Programms Igor Pro zeitabhängig visualisiert. Für die Ermittlung der klonsspezifischen basalen Calciumkonzentrationsunterschiede wurde der Mittelwert aus den F340/F380-Verhältnissen von Minute 2-3 jeder ausgewählten RIO mit Excel berechnet, dem jeweiligen Klonen zugeordnet und die Datensätze mit GraphPad Prism 9 mittels einseitigen ANOVA Test statistisch ausgewertet.

2.2.5 Untersuchung der Schwangerschaftshormonproduktion von BeWo-Wildtypzellen und CRISPR/Cas9 Mutanten

Zur Untersuchung potenzieller Unterschiede in den Hormonsekretionsprofilen von β -hCG, Progesteron und Estradiol wurden die Zellen gemäß dem in Abschnitt 2.2.1.5 beschriebenen Inkubationsprotokoll behandelt. Im Anschluss wurden die Hormonkonzentrationen sowohl durch einen konventionellen Schwangerschaftstest (möLab) als auch im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes mittels „Elektrochemilumineszenz-Immunoassay“ (ECLIA) quantifiziert wobei die identifizierten Hormonkonzentrationen sowohl auf 1 μ g Protein als auch intraexperimentell bezogen auf den DMSO-behandelten BeWo-Wildtyp normiert wurden [180]. Die zugehörigen Zellen wurden darüber hinaus für weiterführende biochemische und massenspektrometrische Analysen aufgearbeitet.

2.2.6 Proteinbiochemie

2.2.6.1 RIPA-Lysat von BeWo-Wildtypzellen und CRISPR/Cas9 Mutanten

Die BeWo-Wildtypzellen und die CRISPR/Cas9 Mutanten wurden bis zur Konfluenz in großen Zellkulturflaschen (175cm²) kultiviert (2.2.1.1), geerntet und bei -80°C weggefroren. Zur Herstellung eines Lysats wurden jeweils 3-5 Zellpellets mit Hilfe von 2mL RIPA-Puffer inklusive Proteaseinhibitor (2.1.6) pro Zellpellet vereint und 30 Sekunden mit einer Ultraschallsonde homogenisiert. Danach wurde jede Zellsuspension zehnmal mit einer Kanüle (Braun, Sterican Ø 0,55 x 25mm) geschert und für 30 Min im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Suspension mit einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima™ MAX-E Ultrazentrifuge) bei 100.000 x g und 6°C für eine Stunde. Der Überstand (Solubilisat) wurde abpipettiert [180] und für weitere Versuche, wie Immunpräzipitationen, Proteingele und Western Blots verwendet.

2.2.6.2 BCA Assay zur Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Solubilisate (2.2.6.1) wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Durch Herstellung einer BSA-Standardreihe (0,0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 60 μ g/mL, 80 μ g/mL, 100 μ g/mL) wurde eine Eichgerade generiert. Aus 5 μ L des jeweiligen RIPA-Lysats wurden 50 μ L 1:100, 1:200, 1:400 und 1:600 Verdünnungen hergestellt. Zur Herstellung des BCA-Reagenzes wurden die Pierce BCA Protein Assay Reagent A und B-Lösungen im Verhältnis 50:1 gemischt dann 300 μ L der Lösung mit den verdünnten Proben und den BSA-Standards gemischt und 30 Min bei 60°C im Heizblock unter Schütteln inkubiert. 300 μ L der Standardreihe und der Probenverdünnungen wurden auf eine 96-Well Mikrottestplatte (Sarstedt AG & Co.KG) pipettiert und die Absorption bei 562nm photometrisch gemessen (Tecan Infinite M200).

2.2.6.3 Proteinfällung

Waren die Proteinmengen der RIPA-Lysate gering, wurde eine Aufkonzentrierung mittels Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Proteinfällung durchgeführt. Hierfür wurden die verdünnten Lösungen mit einem Proteingehalt von 200µg mit dem gleichen Volumen einer 40% TCA-Stocklösung (4°C) gemischt, 20 Min auf Eis inkubiert, 10 Min bei 2°C und bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit dem doppelten Volumen Aceton gewaschen, gevortext, zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde im offenen Eppendorfgefäß getrocknet und in 30µL 2x-Lämmli-Denaturierungspuffer (2.1.6) resuspendiert. Die Proben (200µg Protein/30µL) wurden dann zur Analyse des Proteoms auf ein Gel aufgetragen [180].

2.2.6.4 Immunpräzipitation von BeWo-Wildtypzellen und TRPV6-CRISPR/Cas9 Mutanten

Für die Immunpräzipitation eines Proteins wurde das RIPA-Lysat frisch hergestellt, wobei für jeden Klon die gleiche Menge an Ausgangsmaterial (3-4 Zellkulturflaschen) zur Lysat-Herstellung verwendet wurde. Während den Inkubations- und Zentrifugationsschritten der Lysat-Herstellung (2.2.6.1) wurden die magnetischen Antikörper-Beads vorbereitet: Hierzu wurden jeweils 50µL Protein A-Beads/Puffer Suspension (Invitrogen Dynabeads™, Thermo Fisher Scientific) in Eppendorfgefäße pipettiert, die Beads in einem Magnetständer konzentriert, der Überstand abgenommen, die Beads mit 500µL RIPA (2.1.6) versetzt, gevortext und erneut im Magnetständer konzentriert. Dann wurden 200µL RIPA-Puffer sowie 10µg (\pm 20µL) des polyklonalen TRPV6 Antikörpers 429 (2.1.8, Tab. 1) zugegeben und für 30 Min bei Raumtemperatur auf einem Drehschüttler inkubiert und bis zum Zentrifugationsende der Zellsuspension auf Eis gestellt. Der Überstand des inkubierten Bead-Antikörper Ansatzes wurde abgenommen und die Protein A-Antikörper-Beads dreimal mit 500µL RIPA-Puffer gewaschen. Die Bead-gebundenen Antikörper wurden anschließend mit dem Lysat aus mindestens drei großen Zellkulturflaschen über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag im Magnetständer erneut gewaschen. Die entstandenen Immunkomplexe wurden daraufhin in 50µL Denaturierungspuffer (2.1.6) aufgenommen und für 20 Min bei 60°C denaturiert.

2.2.6.5 Gelelektrophorese

Zur Proteintrennung wurde eine denaturierende Gelelektrophorese mit einem Bolt 4-12% Bis-Tris Plus-Polyacrylamid Gradientengel (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden die Proteine im Gel in einem Bolt MOPS SDS Running Buffer (2.1.6) bei einer Spannung von 80V für 15 Min und dann bis zum gewünschten Trennungsgrad bei 200V aufgetrennt [180]. Die gleichzeitige Auftrennung eines vorgefärbter Proteinmarkers (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) diente hierbei als Orientierung.

2.2.6.6 Western Blot

Die Proteine im Gel wurden mit Hilfe einer Blotting Kammer (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) unter Verwendung des Transferpuffers (2.1.6) bei 1,3A für 10 Min auf eine Nitrocellulosemembran (Bio-Rad) übertragen. Anschließend wurden die Proteine mit Ponceaurot (2.1.6) auf der Membran gefärbt, die Membran mit Wasser gewaschen und Marker sowie die Position der aufgetrennten Proteinproben markiert. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Blocking-Puffer (2.1.6) behandelt, kurz mit TBS (2.1.6) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 10mL der Primärantikörperlösung (2.1.6) inkubiert. Nach der nächtlichen Inkubation wurde der Blot dreimal für 10 Min mit TBS-Puffer gewaschen, 1h mit Sekundärantikörperlösung (2.1.6) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal 10 Min mit TBS gewaschen. Zur Detektion wurde der Blot eine Minute mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (2.1.6) behandelt. Die Chemilumineszenz wurde dann mit Hilfe des LAS4000mini (ImageQuant™ LAS 4000 mini, GE Healthacres Bio-Sciences) zu den Zeitpunkten 15 Sek, 1 Min, 5 Min und 60 Min visualisiert [180]. Die Auswertung erfolgte mit dem AIDA Image Analyzer V.4.27 und CorelDRAW X7. Sollte der Western Blot mit einem anderen Antikörper neu inkubiert werden, wurde der alte Antikörper zunächst abgelöst. Dazu wurde der Blot viermal für 5 Min mit TBST (2.1.6) gewaschen, für 30 Min mit Stripping-Puffer (2.1.6) bei 50°C inkubiert, sechsmal für 5 Min mit TBST gewaschen und für 1h blockiert (2.1.6). Dann erfolgte die Inkubation mit dem neuen Primärantikörper.

2.2.7 Massenspektrometrie

2.2.7.1 Vorbereitung der Proben

Massenspektrometrische Messungen wurden zur Identifizierung von Proteinen in den Eluaten nach Immunpräzipitationen oder zur vergleichenden Analyse der BeWo-Zell Proteome durchgeführt. 100 bis 200µg Protein aus den Zelllysaten bzw. die eluierten Immunpräzipitate wurden auf ein Bolt 4-12% Bis-Tris Plus-Polyacrylamid-Gradientengel (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen und mittels Gelelektrophorese bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt (2.2.6.5). Zur Proteinfixation wurde das Gel 1h bei Raumtemperatur mit Fixierlösung (2.1.7) behandelt. Daraufhin wurden die Proteine mit einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung (2.1.7) für mindestens 30 Min gefärbt und das Gel dreimal unter Schütteln für 10 Min mit destilliertem Wasser gewaschen. Vom Gel wurde aus Dokumentationszwecken ein Foto angefertigt. Je nach Probenkomplexität wurden 4-10 Gelbanden pro Probe ausgeschnitten und mit einer Pinzette entsprechend ihrer Laufposition in beschriftete Eppendorfgläser überführt. Die Gelbanden wurden dann zweimal alternierend für 5 Min mit Waschlösung A und B (2.1.7) schüttelnd gewaschen. Zur Reduktion von

Disulfidbrücken wurden die Banden dann 30 Min bei 56°C in 10mM Dithiothreitol (in Waschlösung A) inkubiert und die daraufhin frei vorliegenden Thiolgruppen durch Inkubation bei RT im Dunkeln mit 5mM Iodacteamid (in Waschlösung A) alkyliert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Banden erneut alternierend mit Waschlösung A und B für jeweils 5 Min gewaschen. Die Gelbanden wurden in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110 A, Savant) getrocknet und über Nacht mit jeweils 15 µL Porcine-Trypsin (20 ng/µL, Sequencing grade, Promega) bei 37°C inkubiert. Durch zweifache Applikation von 35µL Extraktionspuffer (2.1.7) auf die Gelstücke, 15-minütige Inkubation im Ultraschallbad und Abnahme der Überstände, wurden die resultierenden Peptide aus dem Gel gelöst. Das Extrakt wurde in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingedampft, in 20µL 0,1% Ameisensäure Lösung aufgenommen, 10 Min zentrifugiert, die Proben in Autosampler geeignete Glasgefäße mit Einsatz (Macherey-Nage GmbH) überführt und mit einem Bördeldeckel verschlossen [180].

2.2.7.2 Massenspektrometrie Nano-LC-HR-MS/MS

Die zu einer Probe gehörenden Extrakte, die aus acht bis zehn (Lysatanalyse) bzw. vier (Immunpräzipitatanalyse) Gelbanden generiert wurden, wurden einzeln vermessen und die Rohdaten im Anschluss der Messung kombiniert. Pro Messung wurden 6µL tryptisches Peptidextrakt mittels DDA-nano-LC-ESI-HR-MS/MS (data-dependent acquisition nano-liquid chromatography–electrospray ionization–high resolution-tandem mass spectrometry) analysiert. Hierfür wurde ein Ultimate 3000 RSLC Nano-Flüssigchromatographie-System mit integriertem Ultimate3000 RS-Autosampler mit einer Nanospray Flex Ionenquelle (alles Thermo Fisher Scientific), gekoppelt an ein Thermo Scientific Orbitrap Eclipse Tribrid Massenspektrometer, verwendet. Zur chromatographischen Trennung wurde die Probe in ein Säulensystem bestehend aus einer C18-Trap-Vorsäule (75µm × 2cm, Acclaim PepMap100C18, 3µm, Thermo Fisher Scientific) und einer Umkehrphasensäule (nano viper DNV Pep Map™ Neo capillary column, C18; 2µm; 75µm × 50cm, Thermo Fisher Scientific) geleitet. Hierbei wurden zwei mobile Phasen eingesetzt: Puffer A, bestehend aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure, und Puffer B, aus 90% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure (2.1.7). Bei einer Flussrate von 300 nL/Min wurde folgender 120-minütiger HPLC-Gradient erzeugt, womit die Peptide entsprechend ihrer Polarität getrennt und eluiert wurden: Min 0-5 4% Puffer B, Min 5-80 Erhöhung von Puffer B-Anteil auf 31% , Min 80-95 Erhöhung von Puffer B-Anteil auf 50%, Min 95-100 Erhöhung von Puffer B-Anteil auf 90%, Min 100-105 Puffer B-Anteil auf 90% gehalten, Min 105-106 Reduktion von Puffer B-Anteil auf 4% und Min 106-120 Buffer B auf 4% halten. Mit einem beschichteten Emitter (stainless steel, Thermo Fisher Scientific) wurde das Eluat direkt (durch Anlegen einer 2,4keV Spannung) in das Massenspektrometer geleitet. Im positiven Messmodus wurden MS1-Peptidspektren unter Verwendung des Orbitrap-

Analysators erfasst, wobei eine Auflösung von 120.000, eine Radiofrequenz der Ionenfokussierungslinsen von 30% und ein m/z -Bereich von 375-1500 eingestellt wurden. Die maximale Integrationszeit (MaxIT) wurde auf „auto“ gesetzt und es wurde ein Intensitätsschwellenwert von 10^4 definiert. Um die Analyse zu optimieren, wurde eine dynamische Exklusion der zehn häufigsten Peptide für einen Zeitraum von 60 Sekunden durchgeführt. Die MS2-Spektren wurden in der linearen Ionenfalle gesammelt, mit einem Quadrupol-Modus isoliert (Isolationsfenster von 1,2), die Fragmentierung erfolgte durch hochenergetische Kollisionsdissoziation (HCD) mit einer Kollisionsenergie von 30%, als Scangeschwindigkeitseinstellung wurde „fast“ festgelegt und die Datenerfassung erfolgte im Zentroid-Modus [180].

2.2.7.3 Auswertung der massenspektrometrischen Rohdaten

Die Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten („rawfiles“) erfolgte mit der Proteome Discoverer 3.0 Software (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des Sequest HT-Algorithmus, wobei die Rohdaten, die zu einer Probe gehörten, als Fraktionen der Probe zusammengefasst und mit der UniProt Homo sapiens-Datenbank abgeglichen wurden (20.354 Sequenzen, Version November 2023). Für die Datenbanksuche wurden folgende Parameter verwendet: Trypsin diente als proteolytisches Enzym, es wurden maximal zwei fehlende interne Spaltstellen pro Peptid akzeptiert, eine Mutter-Ionen-Massentoleranz von 10ppm für die Suche nach Peptidkandidaten und eine Fragment-Ionen-Massentoleranz von 0,6 Dalton für passende Fragmentpeaks wurde erlaubt, sowie eine minimale Peptidlänge von 6 und eine maximale Länge von 144, die Carbamidomethylierung von Cystein wurde als statische und die Oxidation (M) und N-Acetylierung als dynamische Modifikation zugelassen. Die Peptid-Spektrum-Matches (PSM) wurden mit dem „Percolator“ unter Verwendung der „Target/Decoy-Strategie“ mittels q-Wert validiert. Die „false discovery rate“ (FDR) wurde auf 0,01 gesetzt. Im Rahmen der „label-free-quantification“ (LFQ) wurde der „Minora Feature Detector“ verwendet, um chromatografische Peaks in MS1-Daten zu erkennen und sie den Peptidspektren zuzuordnen. Nur PSM mit hoher Zuverlässigkeit wurden für die Komponentenverifizierung verwendet. Ein weiterer Teil der Quantifizierung ist die Zuordnung von „Features“ aus verschiedenen Rohdaten durch Retentionszeitabgleich unter Verwendung des „Feature mapper“, wobei eine maximale Retentionszeitverschiebung von 10 und eine maximale Massentoleranz von 10ppm zulässig waren. Modifikationen mit einem geringeren Wahrscheinlichkeitsschwellenwert als 75/100 wurden für Peptide nicht angezeigt („PSM Grouper“). Zur Proteinidentifikation waren mindestens zwei exklusive Peptide notwendig. Es wurden alle Peptide verwendet, die nicht von verschiedenen Proteinen oder Proteingruppen gemeinsam genutzt wurden, und gemeinsam genutzte Peptide wurden dem Protein

zugeordnet, das mehr Identifizierungen aufwies. Der „Precursor Ion Quantifier“ war die Hauptkomponente der LFQ, wobei die Abundanz der Vorläufer, die zur statistischen Analyse herangezogen wurde, auf der entsprechenden Intensität basierte. Da die verwendete LFQ hierfür stark unter fehlenden Werten leidet, nutzt die PD 3.0-Software eine „Match-between-runs“ Funktion. Wenn ein Peptid in einer der Proben sicher identifiziert wurde, in einer anderen hingegen nicht, wird in dieser mittels festgelegter Retentionszeit- und m/z -Grenzwerte nach einem „LC-feature“-Kandidaten, der das fehlende Peptid sein könnte, gesucht. Wird eine Übereinstimmung gefunden liegt ein „Indizienbeweis“ vor, der zur Angabe eines theoretischen Abundanz-Wertes für ein bestimmtes Peptid in einer Probe führt, in der es keinen direkten Beweis für das Vorhandensein dieses Peptids gibt. Zudem verwendet die Software zur Korrektur von experimentellen Verzerrungen die Gesamtpeptidmenge zur Normalisierung. Die Proteinabundanz-Werte wurden durch Summierung der Peptidabundanz-Werte der Einzelproben berechnet. Die PD 3.0-Software verwendete die „pairwise ratio“ Methode für die Analyse der „Fold Change“ und die Identifizierung von Unterschieden zwischen den Proben. Die „Abundanz-ratios“ wurden als Median aller möglichen „pairwise ratios“ der Replikate angegeben, wobei die maximale „Fold Change“ bei 100 lag. Zum Vergleich der Proteinexpression zwischen zwei Gruppen wurde im PD 3.0 ein t-Test durchgeführt, wobei die Verteilung der von der Software vorgegebenen „Background“-Proteine zur Berechnung des p-Werts herangezogen wurde [180]. Um mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, erfolgte ein ANOVA-Test auf Grundlage der Verteilung der individuellen Abundanz von Proteinen oder Peptiden wobei die Signifikanzgrenze bei $p < 0,05$ lag.

2.2.8 Datenverarbeitung, Visualisierung und statistische Analyse

Hormonkonzentrationen wurden entweder mit einem konventionellen Schwangerschaftstest (möLab) oder im Zentrallabor der Universität des Saarlandes bestimmt. Igor Pro 6.31 wurde für die Visualisierung der intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen verwendet. Die statistische Analyse von Hormonlevels, Fusionsindex, Zellkerngrößen und der TRPV6 RNA-Menge wurde mit Excel und GraphPad Prism 8.0.2 und die massenspektrometrische Rohdatenverarbeitung und der Proteinexpressionsvergleich mit der Proteom Discoverer 3.0 Software (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte t-Test herangezogen. Mehrere Bedingungen wurden mit Hilfe eines einseitigen ANOVA Tests mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Für beide Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

Die allgemeinen GO-Term-Analysen wurden mit ShinyGO 0.82 durchgeführt. Hierfür erfolgte die Berechnung der „false discovery rate“ (FDR) mittels Benjamini-Hochberg-Methode und der P-Wert wurde mit dem hypergeometrischen Test berechnet. Fold Enrichments stellen den

Prozentsatz der Gene einer Liste, die in einem Pfad liegen, durch den entsprechenden Prozentsatz in den Hintergrundgenen (Hintergrund-Gene= alle proteinkodierenden Gene) dar. Es wurden nur Pfade berücksichtigt, die innerhalb definierten Pfadgröße von 2-5000 liegen. Nach der Analyse wurden die Pfade anhand eines FDR-Cutoffs von 0,05 gefiltert. Zudem wurden signifikante Pfade zunächst nach FDR gefiltert und sortiert und dann die besten 15 nach Fold-Enrichment sortiert. Darüber hinaus erfolgte eine additive manuelle GO-Term-Analyse, um gezielt Proteine zu identifizieren, die in einem der drei folgenden funktionellen Kontexte relevant sind: (1) Calciumhomöostase, (2) Steroidhormonbiosynthese und -sekretion sowie Cholesterolfstoffwechsel (als Steroidvorläufer), und (3) Schwangerschaftsassozierte Prozesse. Hierzu wurden die jeweils in einem Zellklon angereicherten Proteine über die ID-Mapping-Funktion der UniProt-Webplattform hochgeladen. Unter dem Menüpunkt „Customize columns“ wurde die Option „Gene Ontology (Biological Process)“ aktiviert, sodass sämtliche in UniProt hinterlegte GO-Terms zum biologischen Prozess für jedes Protein in der Ergebnisübersicht angezeigt wurden. Die so erzeugten Tabellen wurden anschließend im Excel-Format exportiert. In Excel erfolgte eine manuelle Durchsicht der GO-Terms nach relevanten Schlüsselbegriffen wie „calcium“, „channel“, „steroid hormone“, „cholesterol“, „placenta“ und „pregnancy“. Ziel war es, Proteine zu identifizieren, deren GO-Terms Hinweise auf eine funktionelle Zugehörigkeit zu einer der drei zuvor definierten Kategorien geben. Diese manuelle Zuordnung ermöglichte eine gezielte funktionelle Annotation der angereicherten Proteine außerhalb automatisierter Klassifikationsverfahren. Experimentelle Arbeitsabläufe oder Signalkaskaden wurden mit BioRender.com und CorelDRAW X7 17.0.0.491 (Corel, Ottawa) erstellt. Kristallstrukturvisualisierungen wurden mit UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss verschiedener extrazellulärer Calciumkonzentrationen auf Funktion und Proteom von BeWo-Wildtypzellen

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits im Rahmen einer Veröffentlichung in „Reproductive Biology and Endocrinology“ publiziert [180]. Im Zentrum der zugrunde liegenden Studie stand die Untersuchung des Proteinexpressionsprofils von BeWo-Wildtypzellen während der durch Forskolin (FSK) induzierten Synzytialisierung in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentrationen. Ziel war es, die zellulären Prozesse der Zelldifferenzierung näher zu charakterisieren, trophoblastenspezifische Marker zu identifizieren und die Regulation der Hormonproduktion unter diesen Bedingungen zu analysieren. Hierzu kamen sowohl die immunzytochemische Färbung des Zona occludens 1 (ZO-1) Proteins (2.2.3.1), semi-quantitative Massenspektrometrie-gestützte Proteomanalysen (2.2.7) als auch funktionelle Hormonmessungen von β -hCG, Progesteron und Estradiol (2.2.5) zum Einsatz. Im Folgenden werden die wesentlichen Befunde dieser Untersuchung zusammengefasst dargestellt (Abb. 9 und 10).

3.1.1 Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Synzytialisierung und Hormonsekretion von BeWo-Wildtypzellen

Der Prozess der FSK-induzierten Synzytialisierung wurde in BeWo-Wildtypzellen unter vier verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Hierfür wurde die Lokalisationsänderung des membranständigen tight junction Proteins ZO-1 immunzytochemisch visualisiert. Die BeWo-Wildtypzellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Glasplatten ausgesät (Abschnitt 2.2.1.3) und anschließend für 48h mit einem von vier Kulturmedien behandelt: (1) DMSO bei regulärer Calciumkonzentration (0,94mM), (2) DMSO bei reduzierter Calciumkonzentration (0,35mM), (3) FSK bei regulärer Calciumkonzentration und (4) FSK bei reduzierter Calciumkonzentration (2.2.1.5). Nach der Fixierung der Zellen erfolgte eine Inkubation mit einem spezifischen Antikörper gegen das ZO-1 Protein, gefolgt von einer Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppelten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper, sowie eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne (2.2.3.1). Zur Quantifizierung der Zellfusion wurde der Fusionsindex herangezogen, der das Verhältnis der in Synzytien enthaltenen Zellkerne zur Gesamtanzahl an Zellkernen angibt. Obwohl unter der reduzierten extrazellulären Calciumkonzentration von 0,35mM eine veränderte Zellmorphologie festgestellt wird, sind die BeWo-Zellen weiterhin sowohl teilungs- als auch fusionsfähig. Die Behandlung mit FSK führt unter beiden Calciumkonzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung des Fusionsindex, wobei die Zellfusion unter normalen Bedingungen

(0,94mM Ca^{2+}) deutlich stärker ausgeprägt ist (Abb. 9A, B). In Abwesenheit von FSK ergibt sich kein signifikanter Unterschied im Fusionsverhalten zwischen den Calciumbedingungen. Auch die Sekretion von β -hCG nach 48-stündiger Inkubation der Wildtypzellen unter den vier unterschiedlichen Kulturbedingungen (2.2.5) zeigte eine Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration: Zwar führt die Behandlung mit FSK sowohl unter niedrigem extrazellulärem Calcium (Ca^{2+} L) als auch unter regulärem Calcium (Ca^{2+} N) zu einem Anstieg der β -hCG-Sekretion, jedoch liegen die Sekretionswerte unter Ca^{2+} L signifikant unter denen bei Ca^{2+} N. Nach FSK-Stimulation erreicht die β -hCG-Konzentration unter Ca^{2+} L lediglich ein Drittel des Niveaus, das unter Ca^{2+} N gemessen wird. Auch die basale Sekretion (ctrl) ist unter Ca^{2+} L reduziert (Abb. 9C). Die Konzentrationen von Progesteron und Estradiol steigen nach FSK-Behandlung unter normalen extrazellulären Calcium-Bedingungen (Ca^{2+} N) ebenfalls signifikant an. Im Gegensatz zu hCG zeigen sich jedoch keine calciumabhängigen Unterschiede in der Sekretion dieser Steroidhormone (Abb. 9D, E). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass extrazelluläres Calcium einen Einfluss auf die Synzytialisierung und die β -hCG-Sekretion von BeWo-Zellen ausübt, während die Produktion von Progesteron und Estradiol unter den gewählten Bedingungen calciumunabhängig erfolgt.

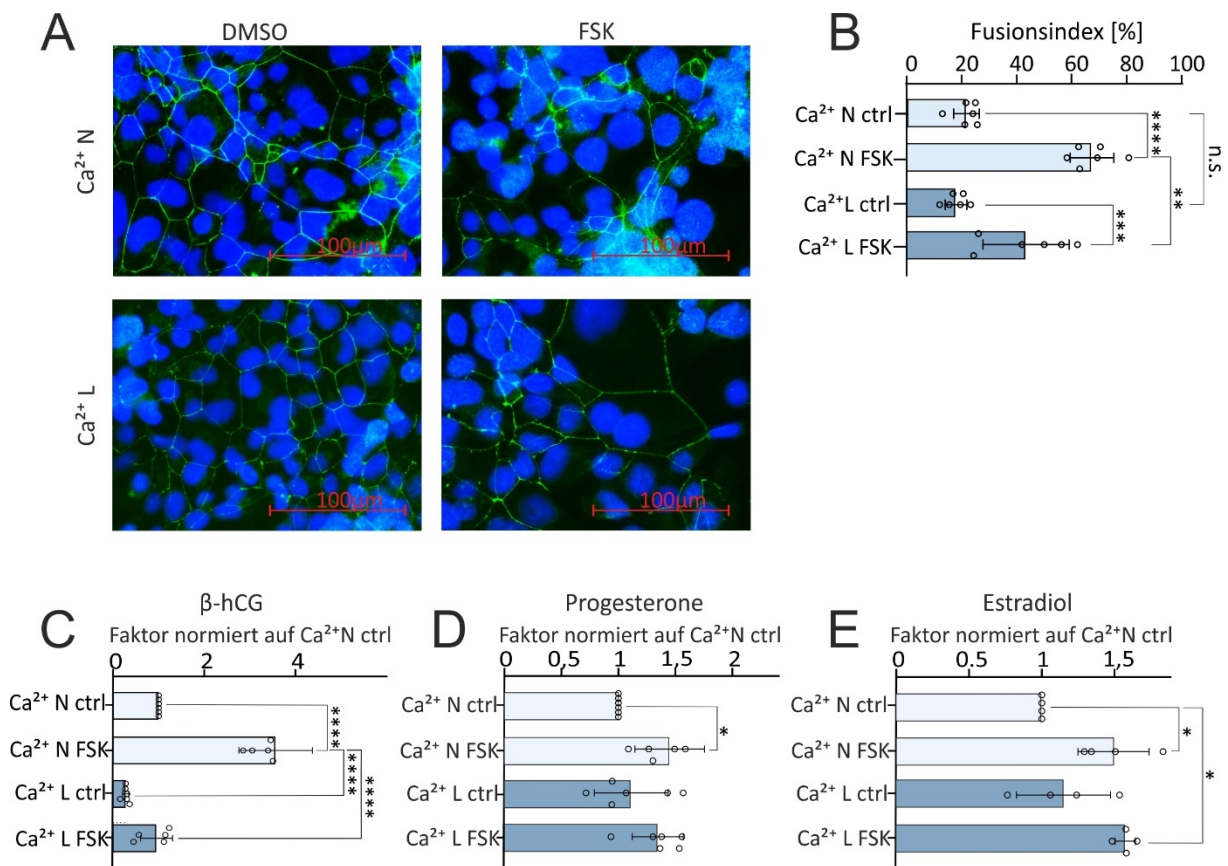


Abbildung 9: Zona occludens-1 (ZO-1) Immunfärbung und Hormonsekretion Zyto (DMSO)- und Synzytiotrophoblast (FSK)-artiger BeWo Wildtypzellen kultiviert mit 0,35mM (L) oder 0,94mM (N) calciumhaltigen Medium (A) Repräsentative Aufnahmen der ZO-1 Immunfärbung +DMSO (ctrl)/FSK kultiviert mit niedriger (L=low) oder regulärer (N=normal) Calciumkonzentration im Zellkulturmedium. Maßstabbalken entspricht 100μM. (B) Statistische Auswertung der ZO-1 Färbung mittels Fusionsindex: $\left(\frac{(N-S)}{T}\right) \cdot 100$; N= Anzahl der Nuclei in Synzytien, S= Anzahl der Synzytien, T= Gesamtzahl der Nuclei), Anzahl der ausgezählten Bilder=6. Durchführung eines einseitigen ANOVA Tests mit Bonferroni-Korrektur, dargestellt als Mittelwert \pm SD, $p > 0,05$ = nicht signifikant (n.s.), $p = 0,05-0,01$ =*, $p = 0,01-0,001$ =**, $p = 0,001-0,0001$ =***. β -hCG (C), Progesteron (D) und Estradiol (E) Quantifizierung in Überständen von BeWo Wildtypzellen kultiviert mit niedriger (L) oder regulärer (N) Calciumkonzentration +FSK/DMSO. Normierung der Hormonwerte auf 1μg Protein des entsprechenden Zelllysats und darauffolgende Normierung auf die Hormonkonzentrationen von Ca²⁺ N ctrl. Prüfung auf signifikante Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert \pm S.D, n=6 (hCG, Progesteron), n=4 (Estradiol)

3.1.2 Untersuchung der Expression und Calciumabhängigkeit fusionsinduzierter Proteine in BeWo-Wildtypzellen

Der durch FSK-induzierte Synzytialisierungsprozess sollte zunächst unter regulären extrazellulären Calciumbedingungen (Ca^{2+} N) analysiert werden, um differenzierungsabhängige Veränderungen im Proteom der BeWo-Zellen zu identifizieren. Hierzu wurden BeWo-Zellen in Medium mit 0,94mM Calcium entweder mit DMSO oder mit FSK behandelt (2.2.1.5) und die daraus gewonnenen Lysate anschließend einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Von den 491 Proteinen mit signifikanten Expressionsunterschieden lassen sich 40 identifizieren, deren Funktionen laut Literatur entweder mit der Regulation oder Induktion der Zellfusion in Verbindung stehen und somit bereits als Marker des Synzytialisierungsprozesses gelten, oder die mit Prozessen wie der Synthese und dem Metabolismus von Steroid- und Glykoproteinhormonen sowie der Plazentaentwicklung assoziiert sind. Mehrere dieser Proteine gelten zudem als in der Plazenta angereichert oder plazentaspezifisch gebildet. Dazu zählen unter anderem: Protein S100-P (S100P), Syncytin-2 (ERVFRD1), A-kinase anchor protein 12 (AKAP12), Syndecan-1 (SDC1), Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TRPV2), Placental growth factor (PGF), Adiponectin receptor protein 1 (ADIPOR1), Cytochrome c oxidase subunit 7C (COX7C), Inhibin alpha chain (INHA), Syncytin-1 (ERVW1) sowie Adrenodoxin (FDX1), Cytochrome P450 (CYP) 11A1, Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1 (HSD17B1), 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) und Aromatase (CYP19A1) (Abb. 10 A).

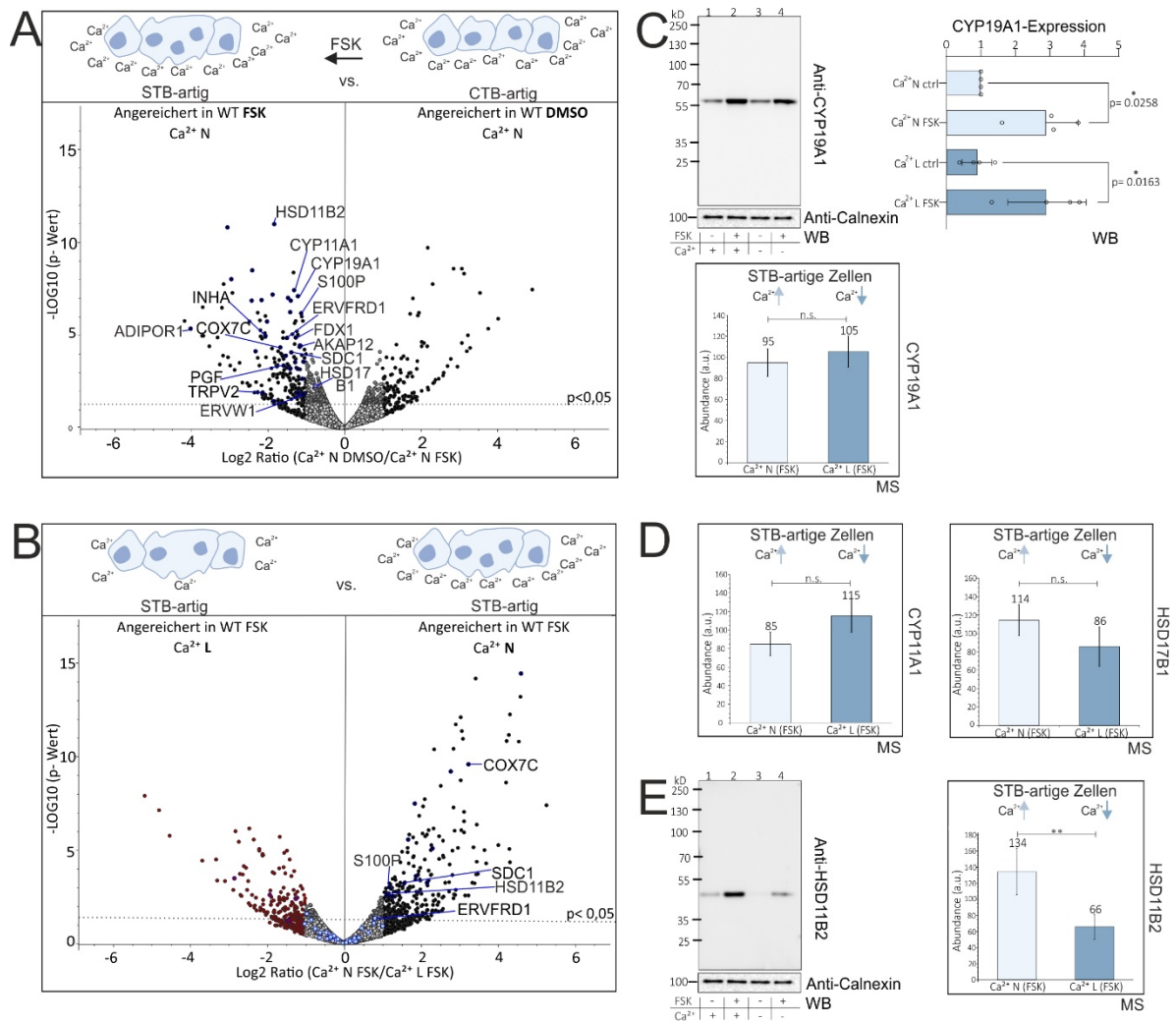


Abbildung 10: Analyse FSK induzierter Proteinexpression und der Calciumabhängigkeit. Massenspektrometrische Analyse (MS) von Lysaten DMSO- und FSK-behandelter BeWo-Wildtypzellen unter normalen Ca^{2+} -Bedingungen (0,94mM; Ca^{2+} N) (A) sowie von FSK-behandelten Zellen unter normalen und reduzierten Ca^{2+} -Bedingungen (0,35mM; Ca^{2+} L) (B), dargestellt als Vulcano-Blot auf Basis eines ungepaarten t-Tests der proteinspezifischen Abundanz-Verhältnisse der Vorläuferionen. Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Maximaler p-Wert = $1,0e-17$, Maximale Abundanz ratio = 100, $n=4$; x-Achse = binärer Logarithmus (Abundanz Bedingung 1/Bedingung 2); y-Achse = negativer dekadischer Logarithmus (P-Wert); schwarze Datenpunkte = Log_2 ratio ≥ 1 unter normalen Calciumbedingungen, rote Datenpunkte = Log_2 ratio ≥ 1 unter reduzierten Calciumbedingungen. (C) Western Blot (WB) und MS-Analyse der Aromatase- (C) und HSD11B2- Expression (E). Inkubation mit Calnexin-Antikörper als Ladekontrolle. $n=4$ (WB und MS). (D) MS-Analyse der CYP11A1 und HSD17B1 Expression. Durchführung eines einseitigen ANOVA Tests mit Bonferroni-Korrektur, dargestellt als Mittelwert \pm SD (C) (WB). Durchführung eines ungepaarten t-Tests dargestellt als Mittelwert \pm S.D., $p > 0,05$ = nicht signifikant (n.s.), $p = 0,05-0,01$ = *, $p = 0,01-0,001$ = **, $p = 0,001-0,0001$ = *** (MS) (C unten, E rechts)

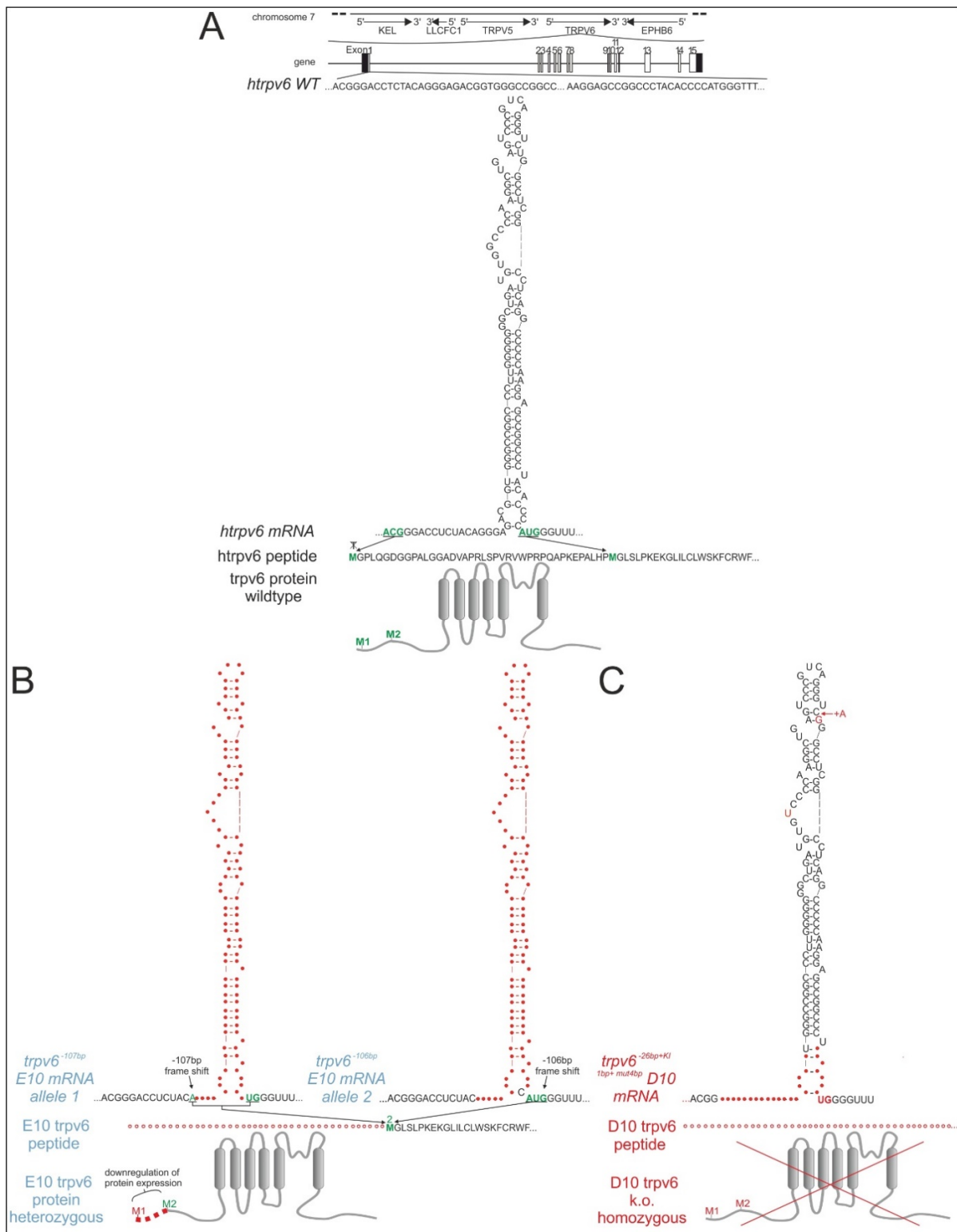
Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Expression dieser Marker durch eine Reduktion der extrazellulären Calciumkonzentration beeinflusst wird. Dazu wurde unter anderem ein

semi-quantitativer Vergleich der Proteinexpression (2.2.7) von FSK-behandelten Zellen unter reduzierter (0,35mM) und regulärer (0,94mM) Calciumkonzentration (2.2.1.5) vorgenommen. Im massenspektrometrischen Proteomvergleich zeigen exemplarisch AKAP12, PGF sowie die Enzyme der Steroidhormonsynthese CYP11A1, HSD17B1 und CYP19A1 keine Unterschiede in der Expression in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration (Abb. 10C, D). Für CYP19A1, eine P450-Monooxygenase, die die Umwandlung von C19-Androgenen in die C18-Estrogene Estron und Estradiol katalysiert [181-183], lässt sich die Calciumunabhängigkeit zusätzlich durch die Quantifizierung der CYP19A1-Bandenintensität im Western Blot bestätigen (Abb. 10C). Dies steht im Einklang mit der ebenfalls nicht calciumabhängigen Erhöhung der Estradiolkonzentration. Im Unterschied dazu zeigen andere Marker des Synzytialisierungsprozesses eine klare Calciumabhängigkeit: das an der mitochondrialen Elektronentransferkette der Steroidsynthese beteiligte FDX1 und die plazentaspezifische beta-Untereinheit von hCG CGB3 wird in DMSO behandelten Zellen signifikant angereichert detektiert wenn die Zellen unter regulärem Calcium inkubiert wurden, während HSD11B2, das bioaktives Cortisol zu inaktivem Cortison metabolisiert und somit eine feto-maternale Glukokortikoid-Barriere bildet [76], selbiges Expressionsmuster nach FSK Behandlung aufweist was ebenfalls durch Western Blot Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 10E). Weitere calciumabhängig exprimierte Marker umfassen S100P, ERVFRD1, SDC1 und COX7C, deren Expression nach FSK-Stimulation unter Ca^{2+} N signifikant höher ausfällt als unter Ca^{2+} L.

Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen, dass bestimmte Proteine, die nach FSK-Stimulation in BeWo-Zellen verstärkt exprimiert werden und beispielsweise der Steroidhormonsynthese zugeordnet sind, unabhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration gebildet werden. Dies spiegelt sich sowohl in der vergleichbaren Expression entsprechender Enzyme, wie etwa der Aromatase, als auch in der konstanten Sekretion zugehöriger Hormone, wie beispielsweise Estradiol, im Zellkulturüberstand wider. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei anderen Markern, darunter CGB3, FDX1 und HSD11B2, eine deutliche Calciumabhängigkeit: Ihre Expression wird durch extrazelluläres Calcium moduliert und nimmt bei reduzierter Calciumkonzentration ab. Für CGB3 (hCG) manifestiert sich dies zusätzlich in einer verminderten hormonellen Sekretion. Darüber hinaus ist auch der FSK-induzierte Synzytialisierungsprozess in BeWo-Zellen selbst calciumabhängig.

3.2 Analyse der genomischen *Trpv6*-Sequenz in den CRISPR/Cas9-modifizierten BeWo-Klonen D10 und E10

Die Firma Ubigene wurde mit der Herstellung von *TRPV6*-Knockout BeWo-Zelllinien beauftragt. Hierfür wurde das CRISPR/Cas9 System verwendet und mit zwei „guide-RNAs“, gerichtet gegen den Vorwärts- und Rückwärtsstrang der *TRPV6*-DNA-Sequenz in Exon 1, gearbeitet (Abb. 11A). Die adressierte Sequenz innerhalb des *TRPV6* Exon 1 formt nach Transkription durch Basenpaarbildung der komplementären RNA-Nukleinbasen Cytosin (C)-Guanin (G) und Adenin (A)-Uracil (U) auf mRNA Ebene eine Sekundärstruktur (RNA-folding Phänomen) in Form einer charakteristischen Stammschleife, den sogenannten „Stem loop“ [151]. Die Bildung dieser 120 Basenpaare umfassenden Schleifenstruktur wird als ursächlich für verschiedene translationsregulatorische Phänomene im Zusammenhang mit der Synthese des humanen *TRPV6*-Proteins angesehen: 1) die Hinderung der Ribosomen in 3'-Richtung zu scannen und die Translation mit einem stromabwärts gelegenen AUG-Codon der mRNA zu starten 2) die unkonventionelle Interaktion der Methionin-bindenden tRNA mit einem ACG-Triplett um die *TRPV6*-Translation zu initiieren 3) die daraus resultierende Suppression der Translation des *TRPV6*-Proteins in Säugetieren. Ubigene generierte mit genannter Methodik die zwei stabilen CRISPR/Cas9 BeWo-Zelllinien D10 und E10, die uns zusammen mit der Referenz BeWo-Wildtypzelllinie, aus der die *TRPV6*-Mutantenzelllinien entstanden sind, und den zugehörigen Sequenzierungsdaten zugesendet wurden. Zusätzlich wurden die bereitgestellten Sequenzierungsinformationen der Mutationszelllinien von PD Dr. Ulrich Wissenbach (Fachbereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie) überprüft und bestätigt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und der daraus resultierenden mRNA- bzw. Proteinstrukturen sind für beide Zellklone in Abbildung 11 zusammengefasst.



(Abbildungsbeschriftung Abbildung 11 siehe nächste Seite)

Abbildung 11: Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der *TRPV6* BeWo- Zellmutanten die durch CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung generiert wurden (A) *TRPV6* Lokalisation auf Chromosom 7 neben *EPHB6* und *TRPV5* Gen. Darunter die Struktur des humanen *TRPV6* Gens mit 15 Exons dargestellt als weiße Boxen, UTRs als schwarze Boxen und Introns als Linien. Darunter ein Teil der Ziel-Nukleotidsequenz, die von gRNA1 (GAGCCGGCCCTACACCCCAT + PAM Motiv GGG, Vorwärtsstrang) und gRNA2 (GGCCCACCGTCTCCCTGTAG+ PAM Motiv AGG, Rückwärtsstrang) in Exon 1 adressiert wurde, um *TRPV6*-CRISPR/Cas9 Mutanten zu generieren. Unter der Nukleotidsequenz die Sekundärstruktur der *TRPV6* mRNA inklusive „Stem Loop“, Start-ACG Codon und darauffolgendes Methionin codierendes AUG-Codon unterstrichen. Darunter der adressierte Abschnitt des *TRPV6* Peptids, erstes und zweites Methionin der Peptidkette in grün. (B) Schematische Darstellung der beiden Allele (Deletion von 106 und 107 Basenpaaren) der heterozygoten CRISPR/Cas9 Mutante „E10“ und der vermuteten Peptidsequenz. Deletierte Nukleotide in der Sekundärstruktur der mRNA als rote Punkte gekennzeichnet und alternatives Start-Codon in grün dargestellt. Fehlende Aminosäuren in Peptidsequenz als rote Kreise gekennzeichnet und die allgemeine Darstellung des Kanalproteins mit fehlender Sequenz als rot gestrichelte Linie im Protein dargestellt. (C) Schematische Darstellung der homozygoten CRISPR/Cas9 Mutante „D10“ und der fehlenden Peptidsequenz die durch Deletion von 26 Basenpaaren, Insertion eines Basenpaares und Mutation von vier Basenpaaren entstanden ist, gekennzeichnet als rote Kreise. Gelöschte und eingefügte Nukleotide in der Sekundärstruktur der mRNA durch rote Punkte bzw. rote Buchstaben gekennzeichnet. Darunter die modellhafte Darstellung des Kanalproteins, welches aufgrund der Modifikationen nicht exprimiert wird (durchgestrichene Linie). Erstellt mit BioRender

Die Translation des *TRPV6*-Peptids, das aus 765 Aminosäuren besteht, im BeWo-Zellwildtyp beginnt mit einem Methionin (M1), das durch das ACG-Codon codiert wird (Abb. 11A). Im Gegensatz dazu wird das 39 Basentriplets 3' stromabwärts liegende Methionin (M2) durch ein konventionelles AUG-Triplett codiert. Der dazwischen liegende translationsregulatorische „Stem-Loop“ der *TRPV6*-mRNA, aus dem der N-Terminus des Proteins entsteht, wurde im Rahmen der CRISPR/Cas9-Genomeditierung auf DNA- Ebene gezielt von den verwendeten gRNAs adressiert. In der BeWo-Zelllinie E10 resultiert die Wahl dieser Zielsequenz in der Etablierung einer compound-heterozygoten *TRPV6*-CRISPR/Cas9-Mutante, die durch die Deletion von 106 bzw. 107 Basenpaaren charakterisiert ist (Abb. 11B). Beide Allele evozieren, dass anstelle des ACG-Codons das unmittelbar nach dem „Stem-Loop“ folgende konventionelle AUG-Codon als Start-Codon für die Proteinbiosynthese fungiert, was die Synthese eines verkürzten Kanalproteins, das einen fehlenden N-Terminus aufweist, zur Folge haben würde. Das Fehlen des beschriebenen N-Terminus würde zu einer signifikanten Reduktion der Translationssuppression und daher Überexpression von *TRPV6* in dieser Zellmutante führen. Im Gegensatz dazu legt die Deletion von 19 Basenpaaren, gefolgt von einer Mutation von Guanin zu Uracil (G→U), einer Insertion von Adenin (+A), die unmittelbar darauffolgende Mutation von Uracil zu Guanin (U→G), eine zusätzliche Deletion von 7 Basenpaaren und anschließende Mutation von Adenin-Uracil zu Uracil-Guanin (AU→UG) im beschriebenen Sequenzbereich nahe, das weder ACG noch das unmittelbar nach dem „Stem loop“ gelegene AUG als Codon zum Start der *TRPV6* Proteinbiosynthese verwenden werden

kann (Abb. 11C). Die Analyse der Sequenzierungsdaten impliziert daher die Klassifizierung der CRISPR/Cas9-mutierten Zelllinie D10 als homozygoten Klon mit einem gezielten Knockout des *TRPV6*-Gens. Zusammenfassend zeigen die Sequenzierungen der beiden CRISPR/Cas9-Klone, dass Klon D10 vermutlich einen vollständigen TRPV6-Knockout darstellt und kein Protein exprimiert. Klon E10 hingegen scheint ein TRPV6-Protein zu bilden, das N-terminal um etwa 40 Aminosäuren verkürzt ist und im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Expression aufweist.

3.3 Semiquantitative Untersuchung der TRPV6 Expression in BeWo-Wildtyp,- D10- und E10-Zelllinien

Zur Überprüfung der Expression wurden der BeWo-Wildtyp und die beiden D10- und E10-Zelllinien kultiviert, die Zellen geerntet (2.2.1.1) und RIPA-Lysate hergestellt (2.2.6.1). Der Proteingehalt der Lysate wurde bestimmt und anschließend das TRPV6 Protein mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper (AK429, siehe Tab. 1) aus der jeweils gleichen Menge Gesamtprotein immunpräzipitiert (2.2.6.4). Die Eluate der TRPV6 Immunpräzipitation aus Wildtyp, D10 und E10 wurden anschließend mittels Western Blot- (2.2.6.6) und massenspektrometrischer Analyse (2.2.7) auf die Expression von TRPV6 hin untersucht (Abb.12).

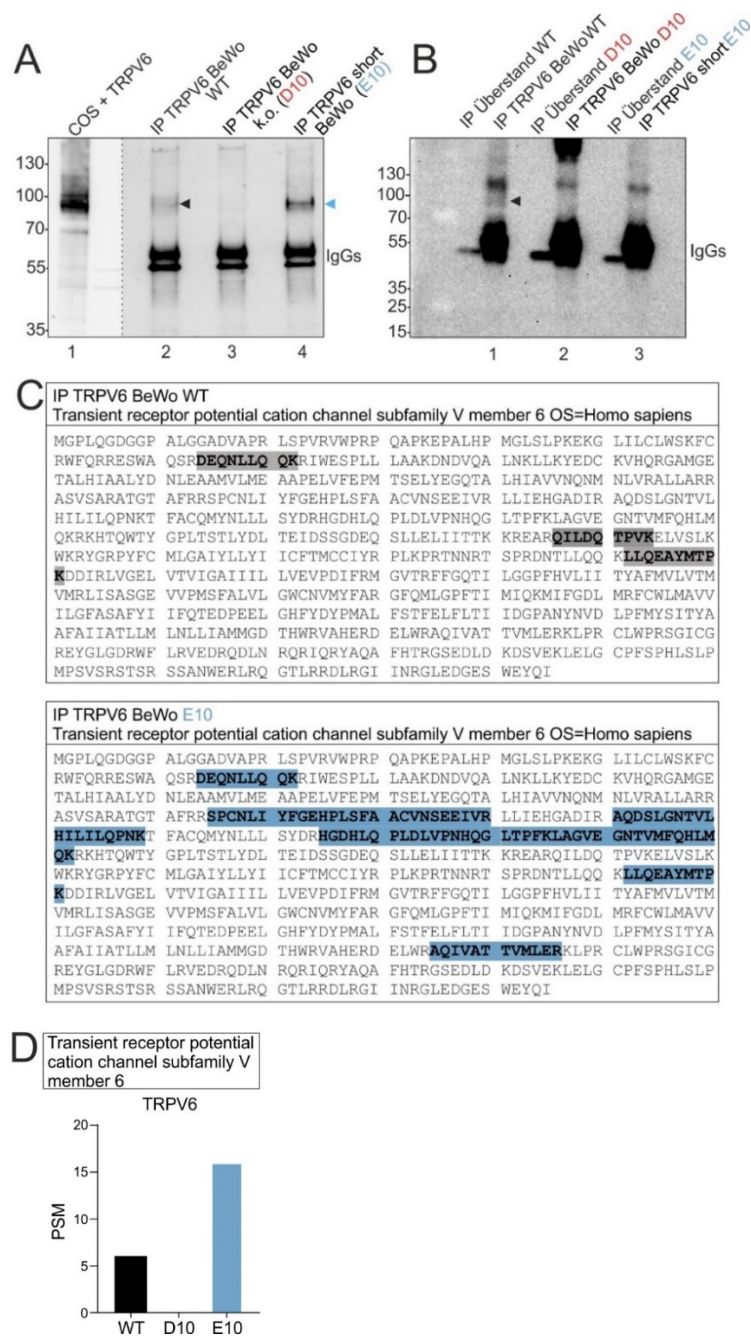


Abbildung 12: Quantifizierung des TRPV6 Proteins nach Immunpräzipitation (IP) in BeWo-Zellwildtyp und BeWo CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10 (A) Western Blot Analyse der TRPV6-Expression in TRPV6-Immunpräzipitationen. 1. Lysat TRPV6 transfizierter COS Zellen als Positivkontrolle 2. IP TRPV6 aus BeWo WT Zellen 3. IP TRPV6 aus BeWo-D10 Zellen 4. IP TRPV6 aus BeWo-E10 Zellen. Inkubation mit primärem TRPV6 Antikörper gegen den C-Terminus von TRPV6 und mit sekundärem Anti-Kaninchen Antikörper. (B) Western Blot Analyse der TRPV6-Expression in IPs. Applikation von WT (1), D10 (2) und E10 (3) IP und links davon die zugehörigen Überstände der IP. Inkubation mit primärem TRPV6 Antikörper gegen den N-Terminus von TRPV6 und mit sekundärem Anti-Kaninchen Antikörper. (C) Lage der durch MS Analyse identifizierten tryptischen TRPV6 Peptide innerhalb der humanen TRPV6 Proteinsequenz (Accession-Nr. Q9H1D0) in BeWo-Zellwildtyp (grau) und BeWo-Zell-Klon E10 (blau), n=3. (D) Summe zugehöriger massenspektrometrisch identifizierter TRPV6 „Peptid-Spektrum Matches (PSM)“

Im Western Blot, der mit dem TRPV6-Antikörper inkubiert wurde, der sich gegen den C-Terminus des TRPV6 Proteins richtet, wird ein Signal immunpräzipitierter TRPV6-Proteine im BeWo-Zellwildtyp (Abb. 12A, Spur 2) und ein stärkeres Signal in der CRISPR/Cas9 BeWo-Zellmutante E10 (Abb. 12A, Spur 4) bei ca. 85kDa detektiert, welches mit der theoretischen Masse des Proteins (87,3kDa) übereinstimmt und auch der Größe des in COS Zellen heterolog überexprimierten TRPV6 Proteins (Abb. 12 A, Spur 1) entspricht. Die Beobachtung eines intensiveren Signals im Zellklon E10 untermauert die Hypothese, dass mit dieser Zelllinie ein Klon mit übermäßiger Expression des TRPV6-Proteins produziert wurde. In der CRISPR/Cas9 BeWo-Zellmutante D10 ist kein TRPV6 im Western-Blot nachweisbar (Abb. 12A, Spur 3). Auf einem weiteren Western-Blot, der mit einem Antikörper inkubiert wurde der sich gegen den, in den CRISPR/Cas9 Zelllinien mutierten, N-Terminus richtet (polyklonaler Antikörper 1271), kann lediglich im BeWo-Zellwildtyp ein schwaches Signal immunpräzipitierter TRPV6-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 12B, Spur 1). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Sequenzierungsanalysen, die implizieren, dass in der BeWo-Zelllinie D10 kein TRPV6-Protein und in der Zelllinie E10 ein verkürztes Protein ohne N-Terminus gebildet wird. Darüber hinaus kann lediglich im BeWo-Zellwildtyp und in der Mutationszelllinie E10 TRPV6 massenspektrometrisch detektiert werden. Die im Wildtyp erfassten Peptide decken 4% der TRPV6 Aminosäuresequenz ab während in der E10-Mutante 15% abgedeckt werden (Abb. 12C). Dieselbe Tendenz zeigt die Summe aller „Peptid Spektrum Matches“ (PSM) in den jeweiligen Klonen. Während im Klon D10 erneut kein TRPV6 nachgewiesen wird, können im BeWo-Wildtyp 6 und im Klon E10 16 PSM detektiert werden (Abb. 12D). Zusammengefasst bestätigt sowohl die Western-Blot als auch die massenspektrometrische Analyse der drei Klone die Sequenzierungsdaten. Es stehen daher für die folgenden Untersuchungen drei Zelllinien zur Verfügung: 1) die BeWo-Wildtypzelllinie, die durch eine niedrige endogene Expression des Vollängen-TRPV6-Proteins charakterisiert ist, 2) die BeWo-Zellmutante (E10), die eine Überexpression des verkürzten TRPV6-Proteins aufweist, welches keinen translationssupprimierenden N-Terminus enthält und 3) die TRPV6-Knockoutzelllinie (D10).

3.4 Semiquantitative Untersuchung der TRPV6 Expression in Forskolin-behandelten BeWo- Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Da BeWo-Zellen nicht nur als Zytotrophoblast-artiges Zellmodell verwendet werden können, sondern durch FSK-Behandlung fusionieren und Synzytiotrophoblast-artige Zellen bilden, wurde die TRPV6-Expression in den drei BeWo-Zelllinien auch nach 48-stündiger FSK-Inkubation untersucht (2.2.1.5). Auch hier wurden zunächst Zellysate aus jeweils drei großen

Zellkulturflaschen pro Klon hergestellt (2.2.6.1) und TRPV6 anschließend mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des C-terminalen Antikörper 429 angereichert (2.2.6.4).

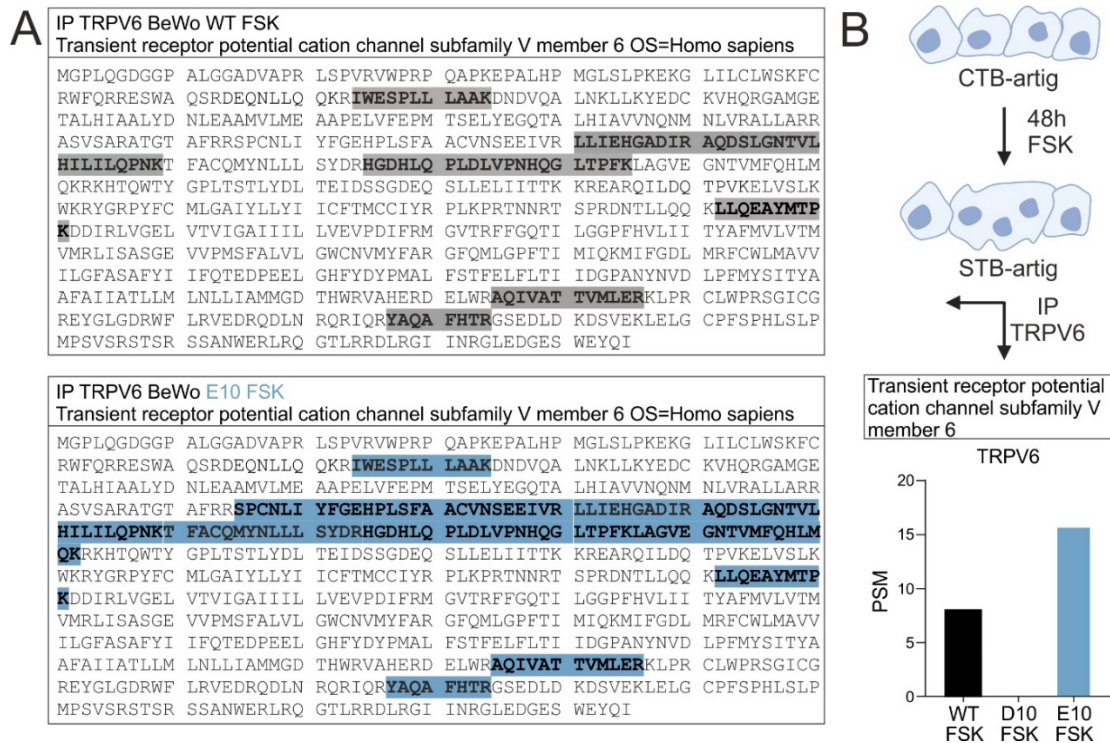


Abbildung 13: Quantifizierung des TRPV6 Proteins nach IP in BeWo-Zellwildtyp und BeWo CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10 nach FSK vermittelter Bildung von Synzytiotrophoblast-artigen Zellen (A) Detektierte Aminosäuresequenzen nach TRPV6-IP und massenspektrometrischer Analyse in BeWo-Zellwildtyp (grau) und BeWo-Zell-Klon E10 (blau), n=1. (B) Summe zugehöriger massenspektrometrisch identifizierten TRPV6 PSM

Auch in Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen kann TRPV6 nur in der Wildtyp und der CRISPR/Cas9 Mutanten-Zelllinie E10 nachgewiesen werden, während im Klon D10 erneut keine TRPV6 Peptide massenspektrometrisch detektiert werden konnten. Auch in dieser Untersuchung bestätigte sich, dass die TRPV6-überexprimierende Mutante E10, hier mit 16 PSM (Abb. 13B), eine höhere Anzahl an identifizierten Peptiden aufweist, sowie eine höhere Abdeckung der Aminosäuresequenz, hier von 20% (Abb. 13A). Im Vergleich dazu ergibt die Analyse des Wildtyps lediglich 8 PSM und eine Sequenzabdeckung von 12%. Tatsächlich kann nach Induktion der Zellfusion eine vergleichsweise höhere Abdeckung der Aminosäuresequenz von TRPV6 in Wildtypzellen erreicht werden, als in den unbehandelten Zellen die lediglich 4% Aminosäureabdeckung zeigen (Abb. 12C), die Anzahl an PSM war mit 6 im unbehandelten BeWo-Zellwildtyp jedoch ähnlich (Abb. 12D). Die erhöhte Sequenzabdeckung trotz vergleichbarer Anzahl an PSM lässt sich vermutlich durch die höhere Variation an unterschiedlichen Peptiden erklären, die nach der Behandlung mit FSK im Wildtyp

identifiziert werden. Im Gegensatz dazu werden in den unbehandelten Wildtypzellen mehrere Spektren für identische Peptide detektiert.

3.5 Charakterisierung der Proliferationsrate von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Nach Quantifizierung der TRPV6-Expression in den drei Zelllinien sollten zunächst Unterschiede im Kultivierungsverhalten der Klone untersucht werden. Dafür wurde jeweils eine 100% konfluente Zellkulturflasche (75cm²) trypsinisiert, die Zellen gezählt und 120.000 Zellen/Klon in eine Zellkulturschale (Ø 35mm) transferiert. Nach 24h wurde das Medium abgenommen und es erfolgte eine Pappenheim Färbung (2.2.1.4) zur zellmorphologischen Charakterisierung (Abb. 14).

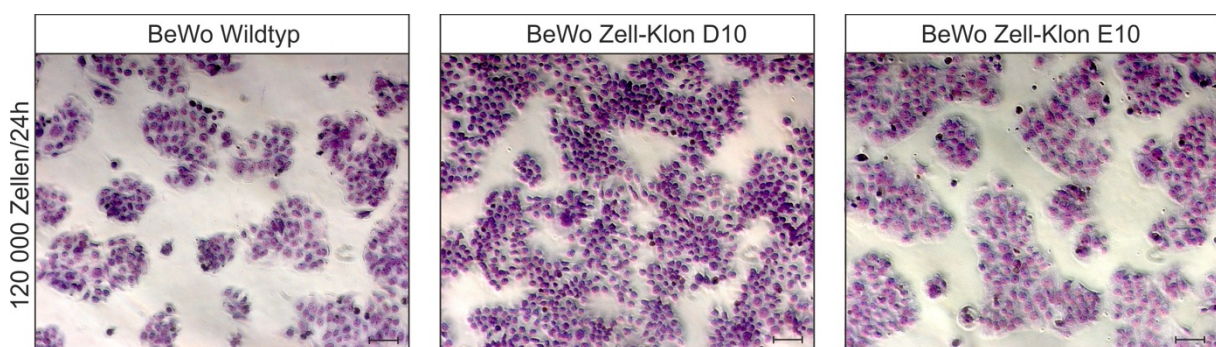


Abbildung 14: Pappenheim-Färbung der BeWo-Zellklone nach 24h-Inkubation von 120.000 BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zellen. Mikroskopische Analyse klonspezifische Konfluenz-Unterschiede nach 24h mit Axio Imager M2 (Zeiss). Maßstab Balken entspricht 100µm

Morphologisch erscheinen die Zellen der CRISPR/Cas9-Knockoutmutante D10 kleiner als die der TRPV6 exprimierenden Wildtyp- und E10-Zelllinie. Der Formvergleich der Wildtyp- und E10-Zellen ergibt hingegen keine augenscheinlichen Unterschiede. Zudem zeigen beide mutierten Zellklone, vor allem der Knockout D10, eine höhere Konfluenz nach 24-stündiger Inkubationszeit, was für eine schnellere Proliferation der D10- und E10-Zellen spricht.

3.6 Nachweis des Tight junction Proteins Zona-occludens-1 in BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Um potenziell TRPV6-bedingte Unterschiede im Ausmaß der Zellfusion zu quantifizieren, wurden die DMSO- oder FSK-behandelten BeWo-Zelllinien (2.2.1.5), analog zur Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Calciumkonzentration, einer ZO-1-Immunfärbung unterzogen (2.2.3.1). Dabei wurden die Zellen mit einem ZO-1-Antikörper (2.1.8, Tab.1), einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (2.1.8, Tab.2) sowie mit DAPI zur Zellkernfärbung inkubiert. Das Ausmaß der Synzytialisierung in den drei Zellklonen wurde anschließend erneut durch Berechnung eines Fusionsindex quantifiziert [184] (Abb. 15).

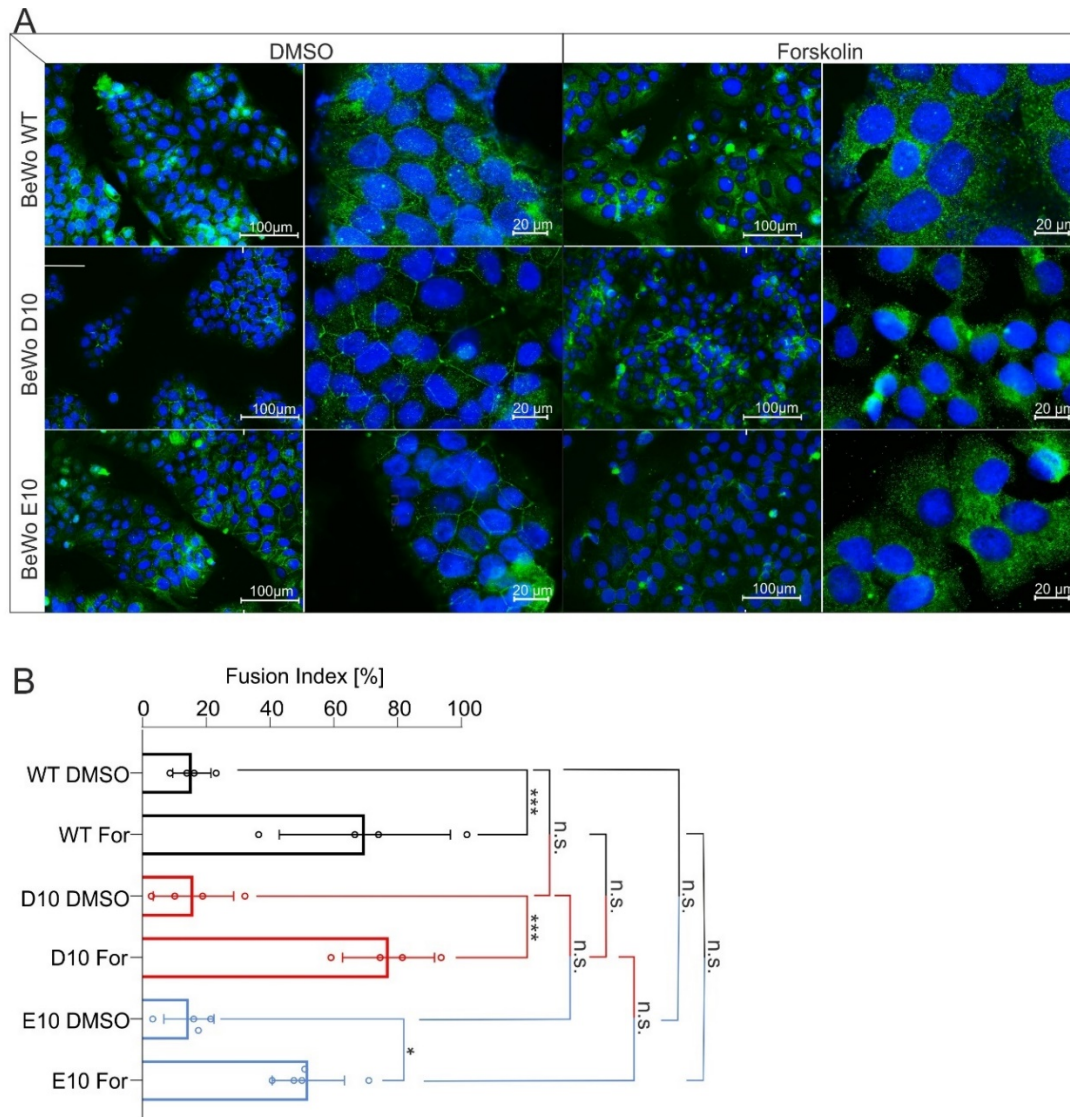


Abbildung 15: Visualisierung der Synzytialisierung mittels ZO-1 Immunfärbung. Inkubation der BeWo-Zellklone +DMSO/FSK für 48h und (A) Färbung mit einem ZO-1 Antikörper (grün) sowie mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Visualisierung der Zellkerne (blau) (B) Statistische Auswertung mittels Fusionsindex: $\left(\frac{(N-S)}{T}\right) \cdot 100$; N= Anzahl der Nuclei in Synzytien, S= Anzahl der Synzytien, T= Gesamtzahl der Nuclei), Anzahl der ausgezählten Bilder=4. Durchführung eines einseitigen ANOVA Tests mit Bonferroni-Korrektur, dargestellt als Mittelwert \pm SD, $p > 0,05$ = nicht signifikant (n.s.), $p = 0,05-0,01$ =*, $p = 0,01-0,001$ =**, $p = 0,001-0,0001$ =***, Maßstabbalken entspricht 100 bzw. 20µM

In den DMSO behandelten Zytotrophoblast-artigen Zellklonen dominiert die Lokalisation des ZO-1 Proteins in der Plasmamembran, sodass eine Begrenzung der Einzelzellen beobachtet werden kann. Im Gegensatz dazu weisen alle mit FSK stimulierten, Synzytiotrophoblast-artigen Zelllinien eine signifikante Reduktion der ZO-1 Signalstärke und der kontinuierlichen Färbung zwischen benachbarten Zellen auf, begleitet von einer vorherrschenden intrazellulären Lokalisation des Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15A). Sowohl in den BeWo TRPV6-Wildtypzellen als auch in den CRISPR/Cas9-Mutationszelllinien

induzierte die Behandlung mit FSK die Bildung mehrkerniger, Synzytiotrophoblast-artiger Zellen, was sich in einem signifikanten Anstieg des Fusionsindex im intra-klonalen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen widerspiegelt (Abb. 15B). Der inter-klonale Vergleich der Fusionsindizes, sowohl unter DMSO-Inkubation als auch nach FSK-Stimulation, zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Zellfusion zwischen Wildtyp-Zellen und den entsprechend behandelten Mutationszelllinien (D10, E10). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Fähigkeit zur Synzytialisierung in den BeWo-Zellklonen nicht von der Expression des TRPV6 Proteins abhängt.

3.7 Vergleich der Zellkerngröße von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Da die Pappenheim-Färbung morphologische Unterschiede in der Zellgröße zeigte, erfolgte im Rahmen der ZO-1-Immunfärbung zusätzlich eine mikroskopische Vermessung von mindestens 100 DAPI-gefärbten Zellkernen pro Klon (2.2.3.2). Der Zellkerndurchmesser wurde mithilfe der Software AxioVision SE64 Rel. 4.9 bestimmt (Abb. 16).

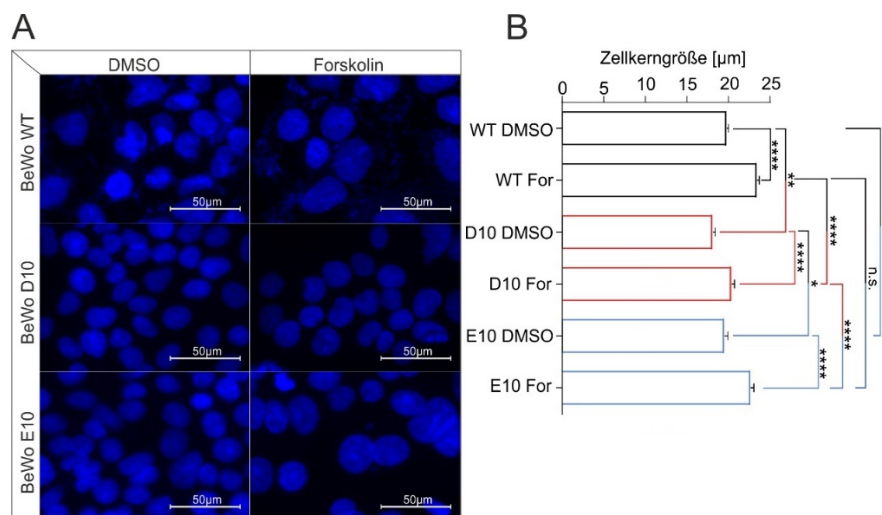


Abbildung 16: Vergleichende Analyse der Zellkerngrößen der BeWo-Zelllinien WT (schwarz), D10 (rot) und E10 (blau) nach DAPI-Färbung. (A) Exemplarische Aufnahmen der Zellkerne DMSO/FSK behandelter Zellklone. (B) Quantifizierung der Zellkerngrößen. Anzahl der ausgezählten Zellkerne: WT DMSO n= 107, WT FSK n= 103, D10 DMSO n= 134, D10 FSK n= 123, E10 DMSO n= 112, E10 FSK n= 122; Statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, Angabe der Mittelwerte +SD, p-Wert von > 0,05 = nicht signifikant (ns), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****), Maßstabsbalken entspricht 50µm

Die Vergleichsanalyse zeigt, dass die durch FSK induzierte Zellfusion und der resultierende Übergang von Zyto- zu Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen in allen drei Klonen mit einer signifikanten Vergrößerung der Zellkerne korreliert (Abb. 16 A, B). Der Vergleich der TRPV6-exprimierenden Zelllinien WT und E10, wie bereits in der Pappenheim-Färbung dokumentiert, ergibt keine Unterschiede in der Zellkerngröße. Allerdings bestätigen sich die zuvor

beobachteten morphologischen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der CRISPR/Cas9-Knockoutmutante D10 auch auf der Ebene der Zellkerne: Sowohl die Zellkerne der Zytotrophoblast- als auch der Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Wildtypzellen weisen signifikant größere Nuklei auf als die entsprechend behandelten D10-Knockoutzellen. Dies gilt ebenfalls für den Vergleich der beiden Mutanten D10 und E10, wobei die Zellkerne der TRPV6-überexprimierenden Mutante E10 signifikant größer sind (Abb. 16B). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den vorherigen morphologischen Befunden und deuten darauf hin, dass das Fehlen von TRPV6 in den untersuchten BeWo-Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die Größe der Zellkerne hat.

3.8 Untersuchung der freien Calciumkonzentration im Zytosol von BeWo- Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Da TRPV6 als Calciumkanal in trophoblastähnlichen Zellen untersucht und gezielt verändert wurde, sollten mögliche Unterschiede in der basalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zwischen dem BeWo-Wildtyp und den TRPV6-Klonen D10 (kein TRPV6) und E10 (überexprimiert) analysiert werden. Dafür wurden die Zellen auf Glasplatten ausgesät (2.2.1.3) und Ca^{2+} -Imaging-Experimente mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluorophor Fura-2 und calciumhaltiger Ringerlösung durchgeführt, wobei der Quotient (F340/380) der Fura-2 Fluoreszenz zur relativen Quantifizierung der zytosolischen Calciumkonzentration herangezogen wurde (2.2.4) (Abb. 17).

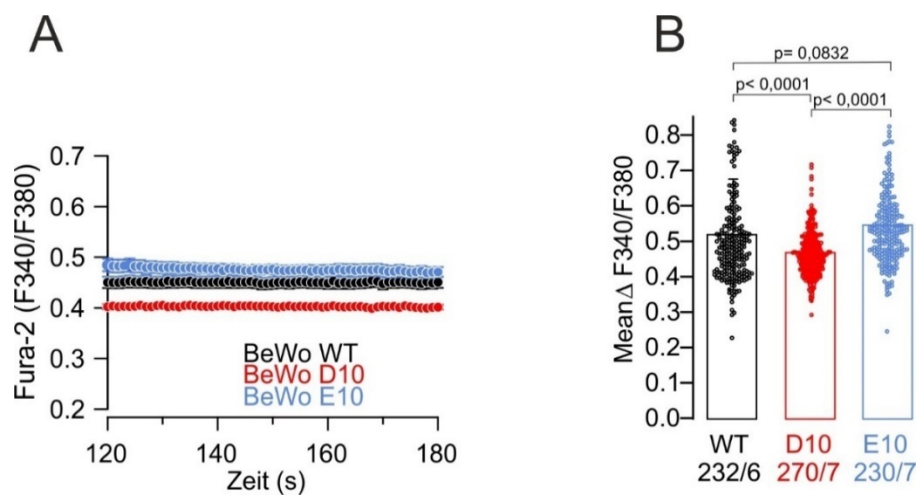


Abbildung 17: Zytosolische Calcium-Konzentrationsunterschiede zwischen BeWo-Zelllinien (A) Repräsentative Aufzeichnung der zytosolischen Calciumkonzentration von BeWo WT-, D10- und E10-Zellen mittels Ca^{2+} -Imaging. Daten als Mittelwerte \pm S.E.M., Mess-Zeit 60 Sekunden. (B) Quantifizierung der relativen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von BeWo WT-, D10- und E10-Zellen mittels Ca^{2+} -Imaging. Bestimmung der basalen Ca^{2+} -Konzentration durch Verwendung des mittleren Verhältnisses von Sekunde 120-180. Prüfung auf signifikante Unterschiede durch einseitigen ANOVA Test mit Bonferroni-Korrektur, dargestellt als Mittelwert \pm S.D. n-Zellen aus x-Experimenten (n/x) vermessen

Der mittlere Fura-2-Fluoreszenzquotient zwischen Messminute zwei und drei, der für die Ermittlung des freien zytosolischen Calciumspiegels herangezogen wird, ist sowohl im Wildtyp als auch in der TRPV6-überexprimierenden E10 Zelllinie leicht, d.h. um ca. 10%, aber signifikant höher als in der TRPV6-Knockoutmutante D10 (Abb. 17 A/B rot vs. schwarz und blau). Der Vergleich der beiden TRPV6-exprimierenden Zelllinien (WT und E10) ergibt keinen signifikanten Unterschied des basalen Calciumlevels, zeigt jedoch die Tendenz einer leicht höheren Konzentration in der TRPV6-überexprimierenden Mutante (Abb. 17B, schwarz vs. blau). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPV6 an der Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration in den BeWo-Zelllinien beteiligt ist und eine Deletion des Proteins zu einer Reduktion der basalen zytosolischen Calciumkonzentration führt.

3.9 Untersuchung der trans- und parazellulären Transporteigenschaften in BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinien

Da die BeWo-Zellen als Zellmodell für plazentare Trophoblasten verwendet werden, die eine feto-maternale Barrierefunktion übernehmen, erfolgte als nächstes die Analyse der Transporteigenschaften der verschiedenen BeWo-Zelllinien. Zu diesem Zweck wurden die drei Klone auf mit humanem Plazentakollagen beschichtete Polyethylenterephthalat (PET)-Membranen mit einer Porengröße von 8 µm ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die parazellulären Transporteigenschaften von TRITC-Dextran sowie der para- und transzelluläre Transport von FITC-Albumin durch die Zellmonoschicht untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen Konzentrationen im apikalen und basalen Kompartiment nach dreistündiger Inkubation bestimmt und zur Berechnung eines Permeabilitätsfaktors herangezogen (2.2.1.6) (Abb. 18).

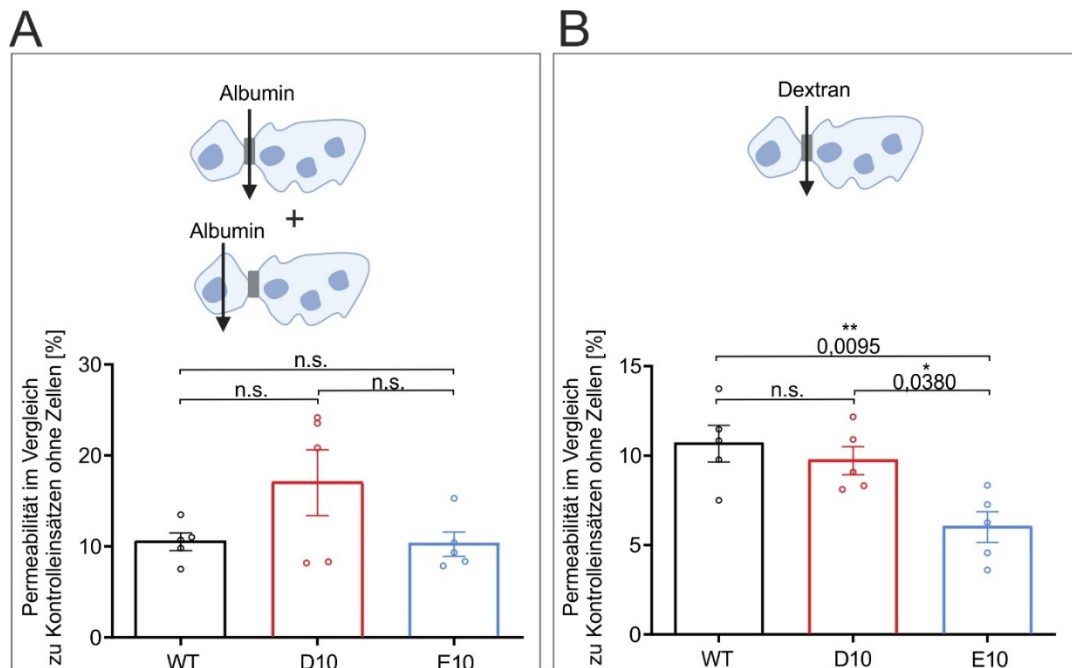


Abbildung 18: Überprüfung der Substratpermeabilität von Albumin und Dextran durch Monoschicht von BeWo-Zellklonen. Quantifizierung der Permeabilität von Albumin (A) und Dextran (B) mittels Permeabilitätsfaktor, normiert auf Zellmenge pro Membran, dargestellt in Relation zur Permeabilität durch Zell-lose Kontroll-Einsätze, n=5

Die Untersuchung der para- und transzellulären Permeabilität von Albumin durch die Monoschichten zeigt zwar die Tendenz einer höheren Transportrate durch die kleineren Zellen des TRPV6 Knockoutklons D10, der statistische Vergleich der drei Zellklone ergibt jedoch keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse des parazellulären Transports von Dextran, dass der Transfer im TRPV6-überexprimierenden Klon E10 im Vergleich zum TRPV6-Knockout D10 oder zum niedrig exprimierenden Wildtyp signifikant reduziert ist. Demnach hätten hohe TRPV6 Mengen einen supprimierenden Effekt auf den parazellulären Transport durch Trophoblasten.

3.10 Vergleich der Hormonsekretionsfähigkeit von BeWo-Wildtyp-, D10- und E10-Zelllinie

Wie unter 1.1.3 erörtert, bilden BeWo-Zellen wie auch plazentare Trophoblasten das Glykoprotein-Hormon humanes Choriogonadotropin (hCG) sowie die schwangerschaftsrelevanten Steroidhormone Progesteron und Estradiol. Daher sollte im Nachfolgenden untersucht werden, ob der TRPV6-Verlust bzw. die TRPV6-Überexpression in der Epithelzell-artigen BeWo-Zelllinie deren Fähigkeit der Hormonsekretion beeinflusst. Dafür wurde die Hormonkonzentration im Zellkulturüberstand der Zellklone nach 48-stündiger DMSO bzw. FSK-Behandlung (2.2.1.5) bestimmt, um die Sekretionseigenschaften von sowohl Zyto-

als auch Synzytiotrophoblast-artigen Zellen zu untersuchen (2.2.5). Um Einflüsse von interexperimentellen Schwankungen in der Auswertung zu reduzieren, wurde die Konzentrationseinheit des jeweiligen Hormons auf 1µg Protein und auf den DMSO behandelten Wildtyp jedes Experiments normiert (Abb. 19-21).

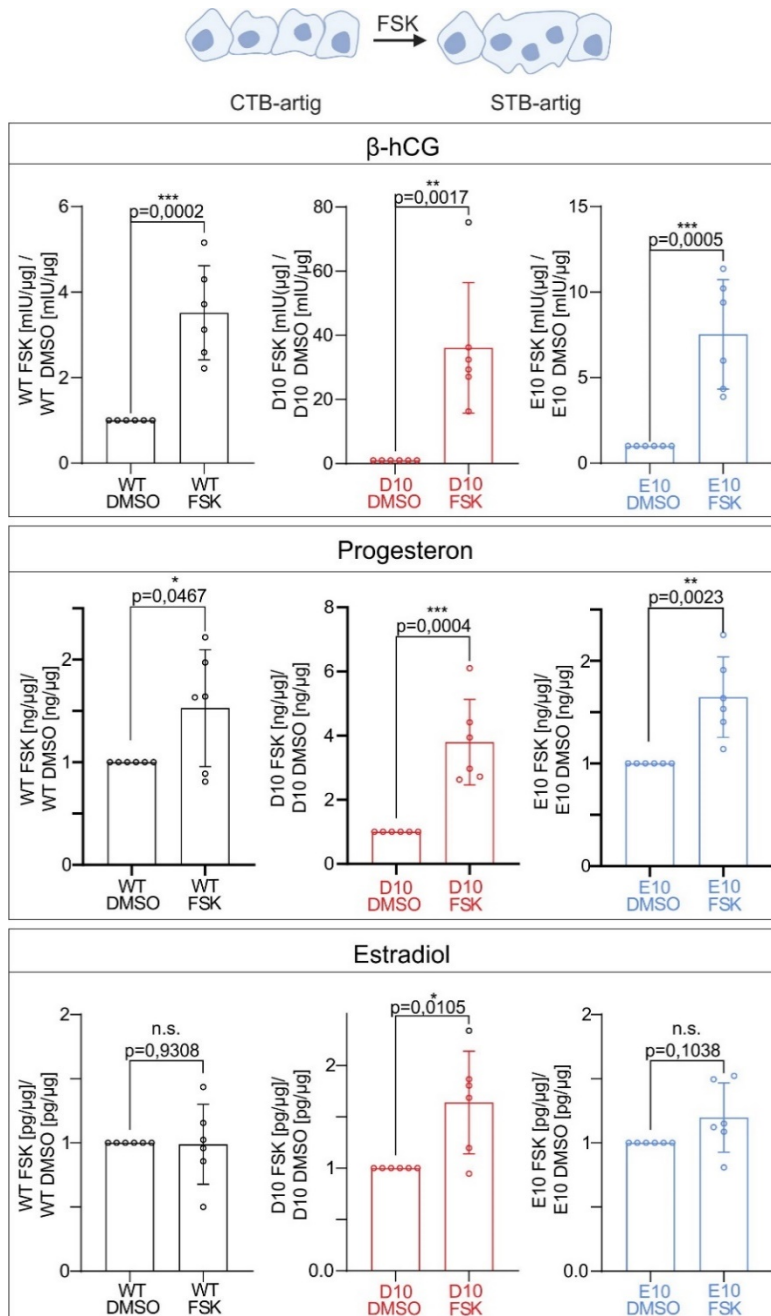


Abbildung 19: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β -hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h mit 30µM FSK in 0,45% DMSO oder nur mit 0,45% DMSO. Hormonbestimmung via ECLIA (Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes). Normierung der Hormonwerte auf 1µg Protein des entsprechenden Zelllysats und darauffolgende Division der Hormonkonzentrationen in stimulierten Zellen (FSK) durch die Konzentration in unstimulierten Zellen (DMSO). Prüfung auf signifikante Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert \pm S.D, n=6

Da die Synzytialisierung in allen drei Zellklonen durch FSK induziert werden konnte (siehe 3.6, Abb.15) wurde zunächst überprüft, ob alle drei Zelllinien auch den damit einhergehenden Anstieg an schwangerschaftsrelevanten Hormonen im Zellkulturüberstand aufweisen. Dazu wurden intra-klonal die Sekretionseigenschaften von Zytotrophoblast- (DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen (FSK) BeWo-Zellen verglichen. Im Rahmen der FSK-induzierten Zellfusion zeigt sich in allen BeWo-Zelllinien ein signifikanter Anstieg sowohl von β -hCG als auch von Progesteron, während der Anstieg von Estradiol nach FSK-Stimulation nur im Knockoutklon statistisch signifikant ist.

Da die Eigenschaften von hCG, Progesteron und Estradiol als Synzytialisierungsmarker in allen drei Zellklonen weiterstehend bestätigt werden konnten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der inter-klonale Vergleich der Sekretionsfähigkeit TRPV6-bedingte Unterschiede hervorbringt. Zunächst wurden die Hormonspiegel der DMSO-behandelten, Zytotrophoblast-artigen Zellklone mittels kommerziellem Schwangerschaftstest (Abb. 20) und Elektrochemilumineszenz-Immunassay (Abb. 21) (Zentrallabor) miteinander verglichen.

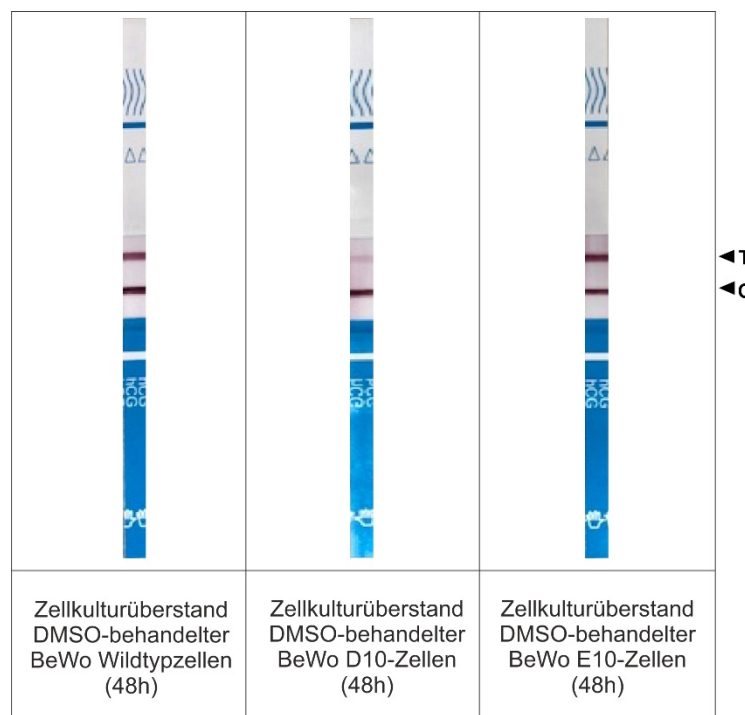


Abbildung 20: Durchführung eines kommerziellen Schwangerschaftstests zum Nachweis von humanem Choriongonadotropin (hCG) im Zellkulturüberstand DMSO-stimulierter BeWo-Zellklone (48h). C= Kontrolllinie, T= Testlinie

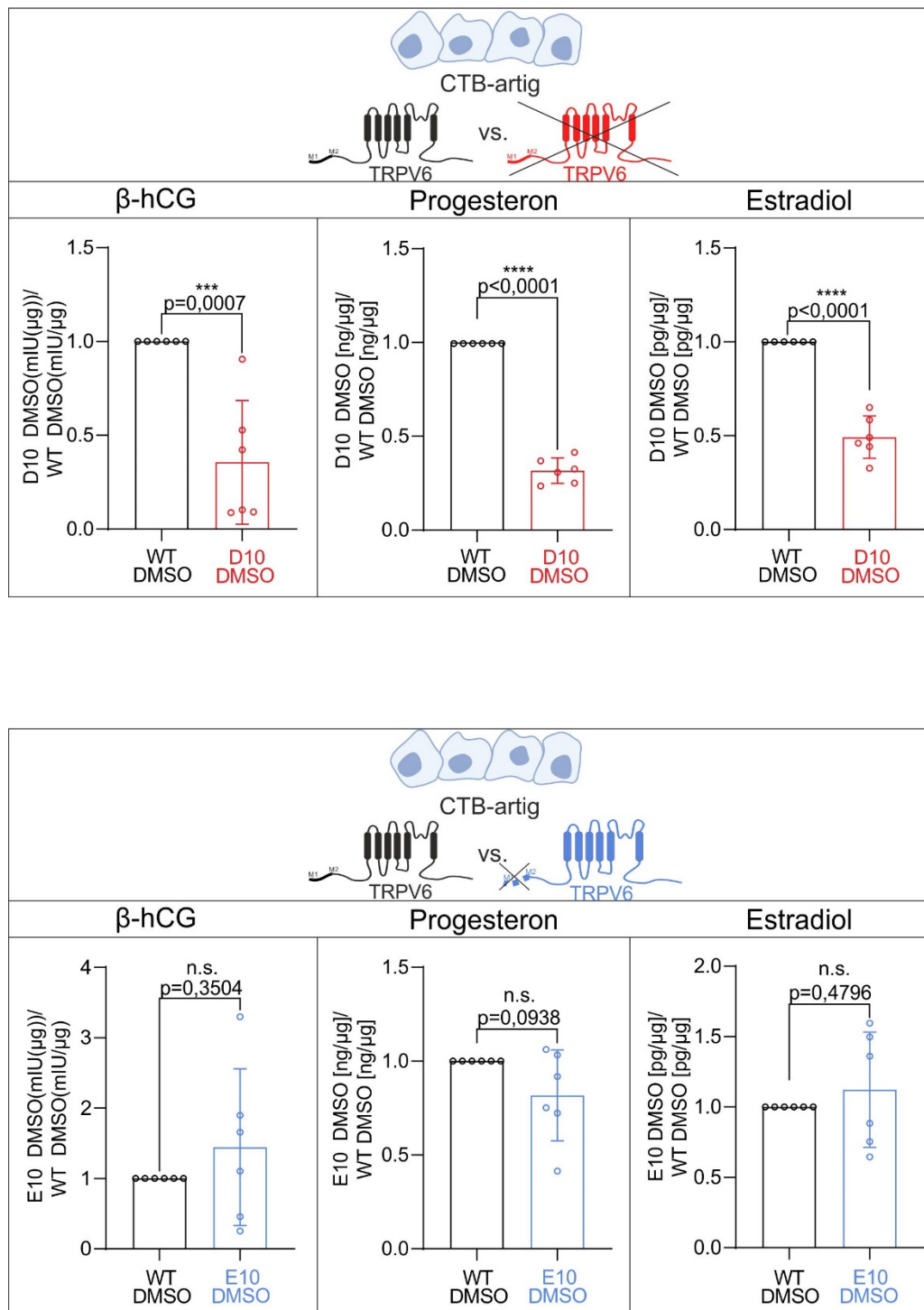


Abbildung 21: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β-hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h in 0,45% DMSO, repräsentativ für plazentare Zytotrophoblasten. Normierung der Hormonwerte auf 1µg Protein des Zelllysats und darauffolgende Division der Hormonkonzentrationen in TRPV6 Mutanten durch die Konzentration im BeWo-Zellwildtyp. Prüfung auf signifikante Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert ± S.D, n=6

Die nicht stimulierten BeWo-TRPV6-Knockoutzellen D10 (Abb. 21, rot) weisen im Vergleich zu den Wildtypzellen eine signifikant reduzierte Sekretion von hCG, Progesteron und Estradiol in den Zellkulturüberstand auf (Abb. 20, Abb. 21, schwarz), wobei bei allen drei Hormonen eine mittlere Sekretionsreduktion um mindestens 50% vorliegt. Im Gegensatz dazu zeigt der TRPV6-überexprimierende BeWo-Zellklon E10 keine signifikanten Unterschiede in der Sekretionsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21 schwarz vs. blau).

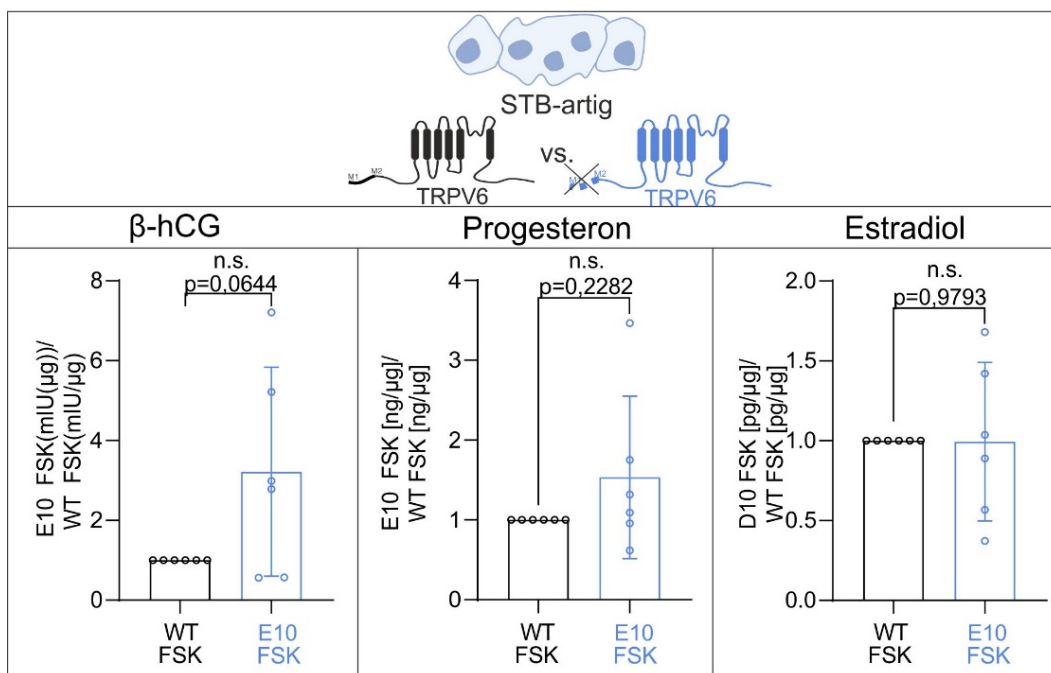
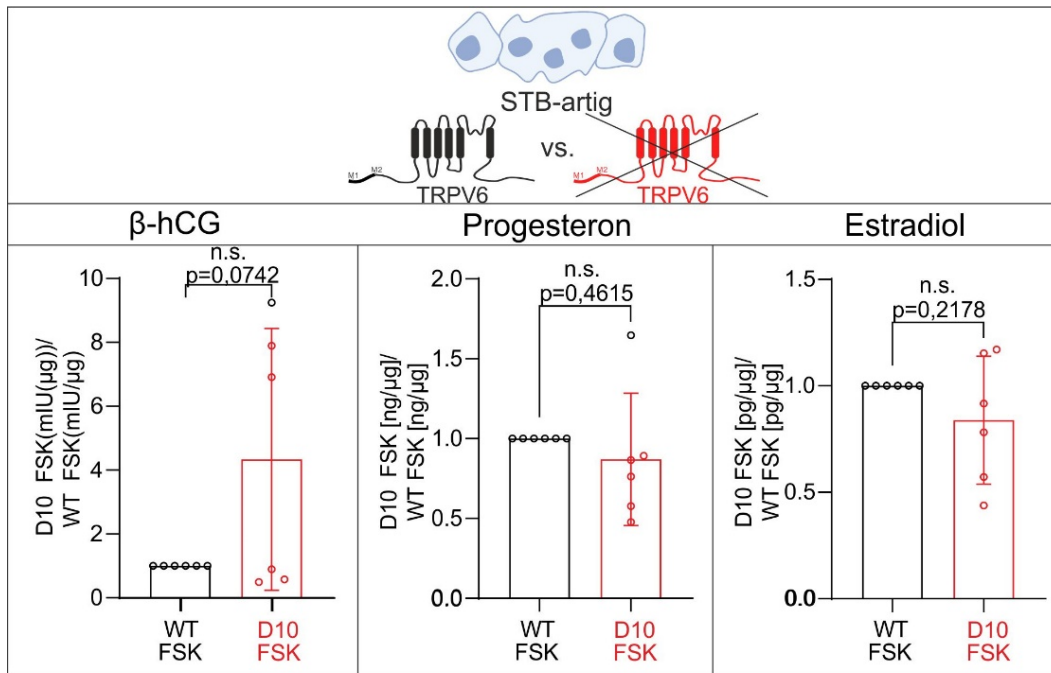


Abbildung 22: Quantifizierung schwangerschaftsrelevanter Hormone (β-hCG, Progesteron, Estradiol) in Überständen von BeWo-Zellklonen kultiviert für 48h mit 30μM FSK in 0,45% DMSO, repräsentativ für plazentare Synzytiotrophoblasten. Normierung der Hormonwerte auf 1μg Protein des Zelllysats und darauffolgende Division der Hormonkonzentrationen in TRPV6 Mutanten durch die Konzentration im BeWo-Zellwildtyp. Prüfung auf signifikante Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert ± S.D., n=6

Nach FSK-Stimulation können weder im TRPV6-Knockoutklon D10 noch im überexprimierenden Klon E10 signifikante Unterschiede in der Hormonsekretion gegenüber dem BeWo-Wildtyp festgestellt werden (Abb. 22), wobei die Variabilität der Hormonsekretion nach 48-stündiger FSK-Behandlung höher ist als nach der DMSO-Inkubation (Abb. 21). In nicht-stimulierten BeWo-Zellen geht der Verlust von TRPV6 offenbar mit einer reduzierten Hormonsekretion einher, wohingegen eine erhöhte TRPV6-Expression keine sekretionsfördernden Effekte zu vermitteln scheint. Diese Ergebnisse implizieren, dass gewisse TRPV6-Mengen für die Hormonsekretion oder Synthese in plazentaren Zytotrophoblasten notwendig sind. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Synzytiotrophoblasten ist im Rahmen der vorliegenden Analyse nicht gegeben, da die Aktivierung der Adenylatzyklase durch FSK die hormonelle Sekretionsfähigkeit des Knockoutklons D10 erfolgreich reaktivieren konnte.

3.11 Vergleich der hormonellen Sekretionsaktivität von BeWo-Wildtypzellen und siRNA-induzierten TRPV6-Knockdownzellen

Durch CRISPR/Cas9-Genomeditierung wurde sowohl ein TRPV6-Knockoutklon (D10) als auch ein TRPV6-überexprimierender BeWo-Zellklon (E10) erzeugt, wodurch sich prinzipiell die Möglichkeit ergibt, die Funktion des Proteins unter zwei konträren Expressionsbedingungen zu untersuchen. Allerdings lassen sich die beobachteten funktionellen Unterschiede, die auf die jeweilige TRPV6-Expressionsmenge zurückgeführt werden, nicht durch den Vergleich mit einer zweiten, aus einer anderen Einzelzelle abgeleiteten, CRISPR/Cas9-Zelllinie mit identischem Expressionsprofil absichern. Dadurch kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen TRPV6-spezifischen Effekten und potenziellen klonalen Artefakten infolge der Genomeditierung nicht zweifelsfrei gewährleistet werden. Daher erfolgte die Evaluation der TRPV6 abhängigen Hormonsekretion, indem BeWo - Wildtypzellen mit TRPV6-adressierenden siRNAs zur Suppression der TRPV6-Translation transfiziert wurden (2.2.1.7). Die TRPV6 Menge wurde mittels RNA-Isolation, RT-PCR und anschließender Amplifikation der so generierten cDNA mittels PCR und Applikation der PCR-Produkte auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel quantifiziert (die praktische Durchführung der (RT-)PCR erfolgte durch Stefanie Buchholz, Institut für experimentelle Pharmakologie & Toxikologie, Homburg) (2.2.2.1). Sofern eine Suppression der TRPV6-Transkripte festgestellt wurde, erfolgte die Ermittlung der Hormonkonzentration im zugehörigen Zellkulturüberstand (Abb. 23). Es wurde anschließend überprüft, ob diese Zellen hinsichtlich ihrer Hormonsekretionsfähigkeit eine ähnliche Abweichung vom BeWo-Wildtyp zeigten, wie sie zuvor im TRPV6-Knockoutklon D10 festgestellt wurde.

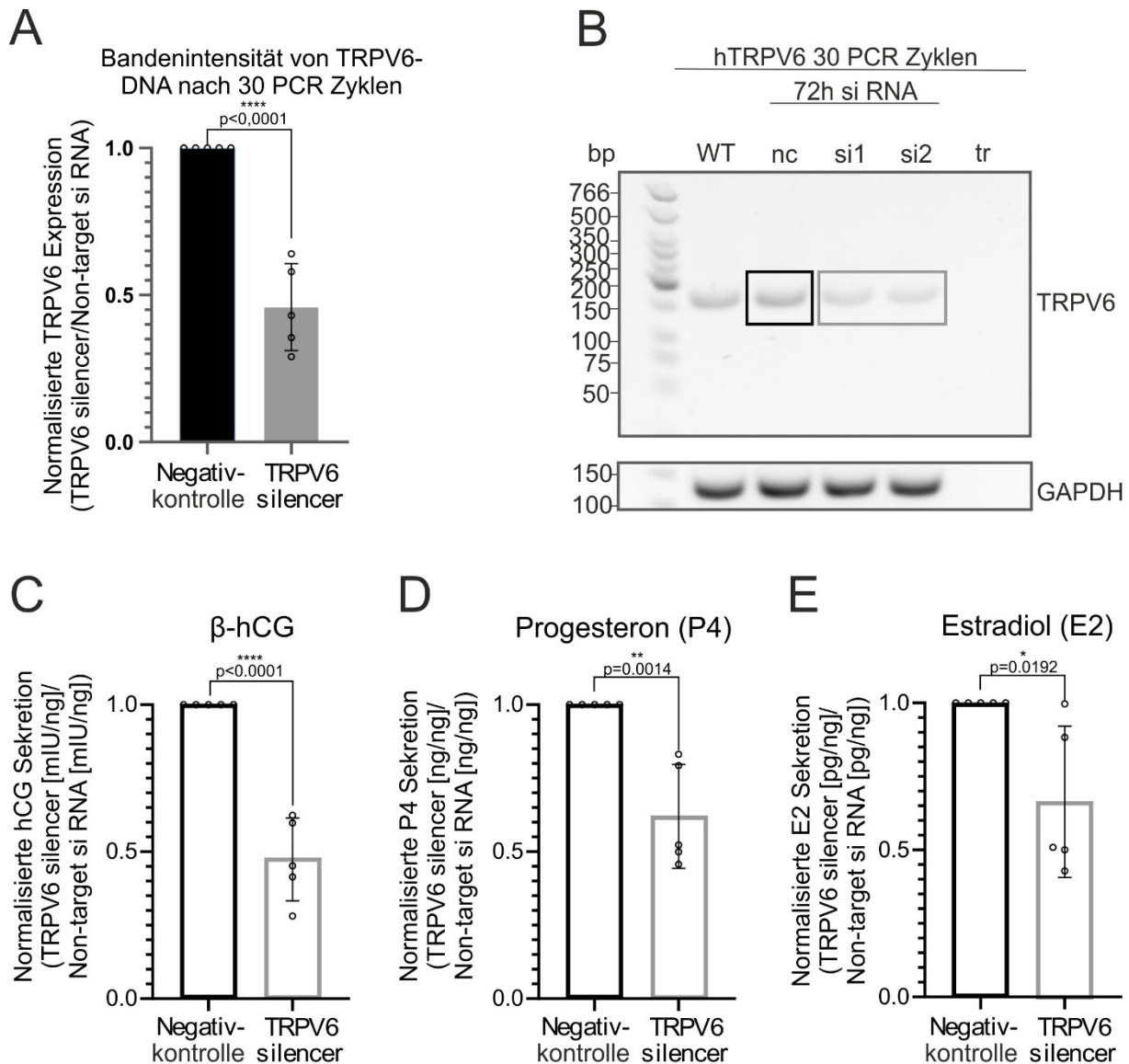


Abbildung 23: Hormonsekretionsfähigkeit von BeWo-Wildtypzellen und siRNA-vermittelten TRPV6-Knockdownzellen. (A) Vergleich der TRPV6-Bandenintensität der TRPV6-PCR-Produkte auf Agarosegel nach 30 Zyklen, normiert auf GAPDH Bandenintensität. Zellen inkubiert mit nicht zielgerichteter Kontroll-siRNA als Negativkontrolle (schwarz) oder verschiedenen Kombinationen von TRPV6-siRNAs (10-100nM, grau). Prüfung auf signifikante Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert \pm S.D, $n=5$. (B) Repräsentatives Gel verwendet zur densitometrischen Quantifizierung der TRPV6-PCR-Produkte von BeWo-Wildtypzellen (WT), TRPV6-siRNA behandelten BeWo-Zellen (si1/2), nicht zielgerichtete Kontroll-siRNA behandelten BeWo-Zellen (nc), Transfektionsreagenz (tr) zum Ausschluss von Kontaminationen (oben). Darunter GAPDH-PCR-Produkte (30 Zyklen) der einzelnen Proben als Ladekontrolle. β -hCG [mIU/mL] (C), Progesteron [ng/mL] (D) und Estradiol [pg/mL] (E)-Spiegel in Zellkulturüberständen von oben genannten BeWo-Zellen bestimmt durch ECLIA, normalisiert auf 1ng RNA und auf Hormonspiegel der Negativkontrolle (= 100%). Unterschiede durch ungepaarten t-Test dargestellt als Mittelwert \pm S.D, $n=5$

In den Transfektionsansätzen zeigt sich eine durchschnittliche Reduktion der TRPV6-Transkripte um etwa 50% (Abb. 23A). Die Bestimmung der Hormonkonzentrationen in den

Zellkulturüberständen ergibt, dass insbesondere hCG (Abb. 23C), aber auch die Progesteron- (Abb. 23D) und Estradiolspiegel (Abb. 23E), signifikant vermindert sind, wenn BeWo-Zellen mit TRPV6-supprimierender siRNA anstelle einer nicht-zielgerichteten Kontroll-siRNA transfiziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse korrelieren daher mit den Beobachtungen der TRPV6-CRISPR/Cas9 Knockoutzelllinie D10, die im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine signifikant reduzierte Sekretion von Hormonen in den Zellkulturüberstand zeigt. Diese Analyse unterstützt daher die Annahme, dass eine reduzierte TRPV6-Expression mit einer gleichzeitigen Suppression der Synthese bzw. Sekretion von Glykoprotein- und Steroidhormonen in plazentaren Trophoblasten assoziiert ist.

3.12 Proteomanalyse der BeWo-Zellklone

Im Anschluss an die Inkubation mit DMSO bzw. FSK (2.2.1.5) erfolgte eine massenspektrometrische Analyse der Zelllysate. Diese Untersuchung verfolgte das Ziel, die zuvor beobachteten funktionellen Unterschiede auf Proteinebene näher zu charakterisieren und den Einfluss von TRPV6 auf die Expression weiterer Proteine in BeWo-Zellen zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen aus den Hormonbestimmungsversuchen (Abschnitt 3.10) lysiert (2.2.6.1) und anschließend einer Proteinquantifizierung (2.2.6.2) und -fällung (2.2.6.3) zur Aufkonzentrierung unterzogen. Von jedem Klon wurden 200µg Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und damit pro Probe zehn Gelbanden generiert. Nachdem die einzelnen Gelbanden gewaschen wurden, erfolgte die Reduktion und Acetylierung, ein in Gel-Verdau mit Trypsin und die Extraktion der Peptide (2.2.7.1). Über einen 120-minütigen HPLC-Gradienten wurden die Proben getrennt, massenspektrometrisch analysiert (2.2.7.2) und mit der Proteom Discoverer Software miteinander verglichen (2.2.7.3). Im Folgenden werden die Begriffe „DMSO-behandelte Zellen“ und „Zytotrophoblast-artige Zellen“, „synzytialisiert“, „fusioniert“ und „FSK-stimuliert“, sowie „FSK-behandelte Zellen“ und „Synzytiotrophoblast-artige“ Zellen als Synonyme verwendet.

3.12.1 Proteomanalyse TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen

3.12.1.1 Proteomanalyse Zytotrophoblast-artiger TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen

Aufgrund der Analyse drei biologischer Replikate pro Klon und der damit einhergehenden Menge an Rohdaten konnten lediglich zwei Bedingungen miteinander verglichen werden (2.2.7.3). Zunächst sollte der Einfluss von TRPV6 auf das Proteom von Zytotrophoblast (CTB)-artigen BeWo-Zellen untersucht werden, weshalb die Lysate des DMSO-behandelten Wildtypklons mit denen von DMSO behandelten-TRPV6-Knockout D10-Zellen verglichen wurden (Abb. 24 und 25).

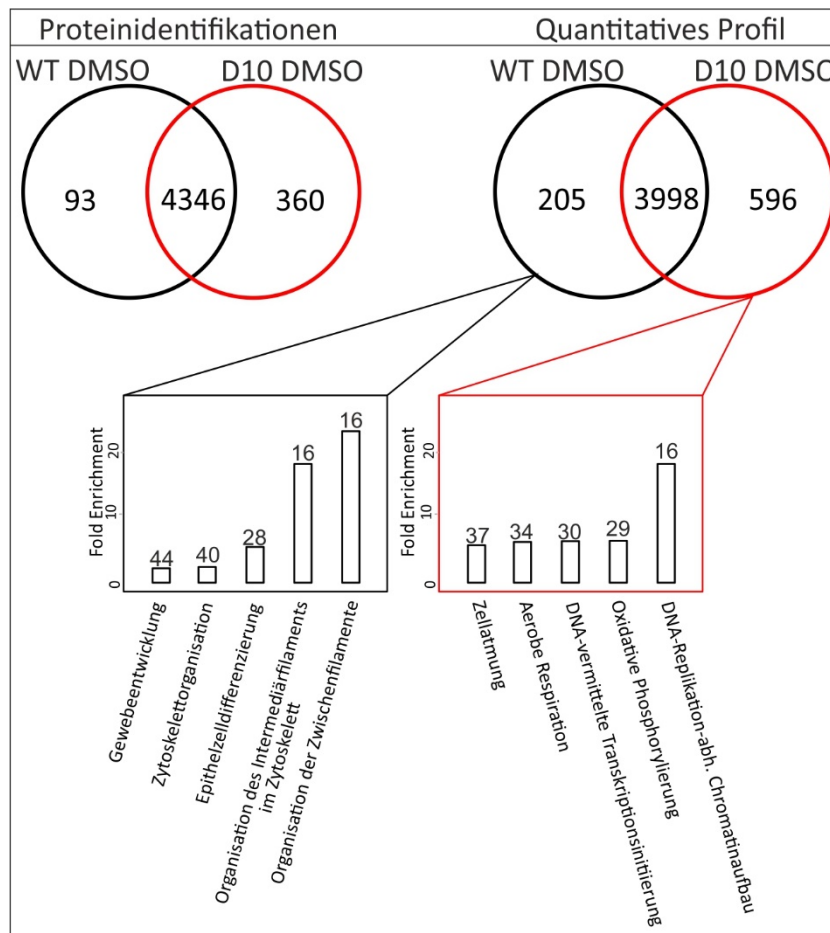


Abbildung 24: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Proteomanalyse von DMSO behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo-TRPV6-Knockoutzellen D10. Oben Venn-Diagramm identifizierter (links) und quantifizierter Proteine (rechts). Darunter „Gene Ontology-Biological Process“ Analyse von unterschiedlich exprimierten Proteinen (ShinyGO). Anzahl der angereicherten Gene die einem Signalweg angehören über Balken im Diagramm dargestellt

Die Proteomanalyse der BeWo-Wildtyp und TRPV6-Knockoutzellen zeigt, dass 93 Proteine exklusiv im Wildtyp und 360 Proteine exklusiv im Knockoutklon exprimiert werden, während 4346 Proteine in beiden Klonen detektiert werden können. Von den 4799 identifizierten Proteinen sind nach statistischer Analyse 205 signifikant im Wildtyp angereichert und 596 Proteine im Klon D10. Das quantitative Profil impliziert daher, dass durch das Fehlen von TRPV6 im Knockoutklon die Bildung von vielen Proteine induziert wird, gegebenenfalls um potenzielle funktionelle Defizite zu kompensieren. Diese Hypothese wird durch die GO-Term Analyse angereicherter Proteine im Knockoutklon D10 untermauert (2.2.8). Diese zeigt, dass mehrere Proteine der DNA-Replikation, der DNA-vermittelten Transkription sowie ATP-synthetisierender Prozesse signifikant häufiger detektiert werden. Im Wildtyp hingegen dominieren Proteine der Zytoskelett-Organisation sowie der Gewebeentwicklung und

Epithelzelldifferenzierung. Letzteres deckt sich mit der Charakterisierung der BeWo-Zellen als Epithelzell-artige Modelzelllinie.

Vor dem Hintergrund der beobachteten Unterschiede in der Fura-2 Ratio als Parameter der relativen intrazellulären Calciumkonzentration (3.8), sowie der Sekretion von Steroid- und Glykoproteinhormonen (3.10) wurde im Folgenden eine gezielte Analyse solcher Proteine angestrebt, die an den zugrunde liegenden Signalwegen beteiligt sind (2.2.8) und im Proteom des Wildtyps im Vergleich zum TRPV6-Knockoutklon differenziell exprimiert werden (Abb. 25).

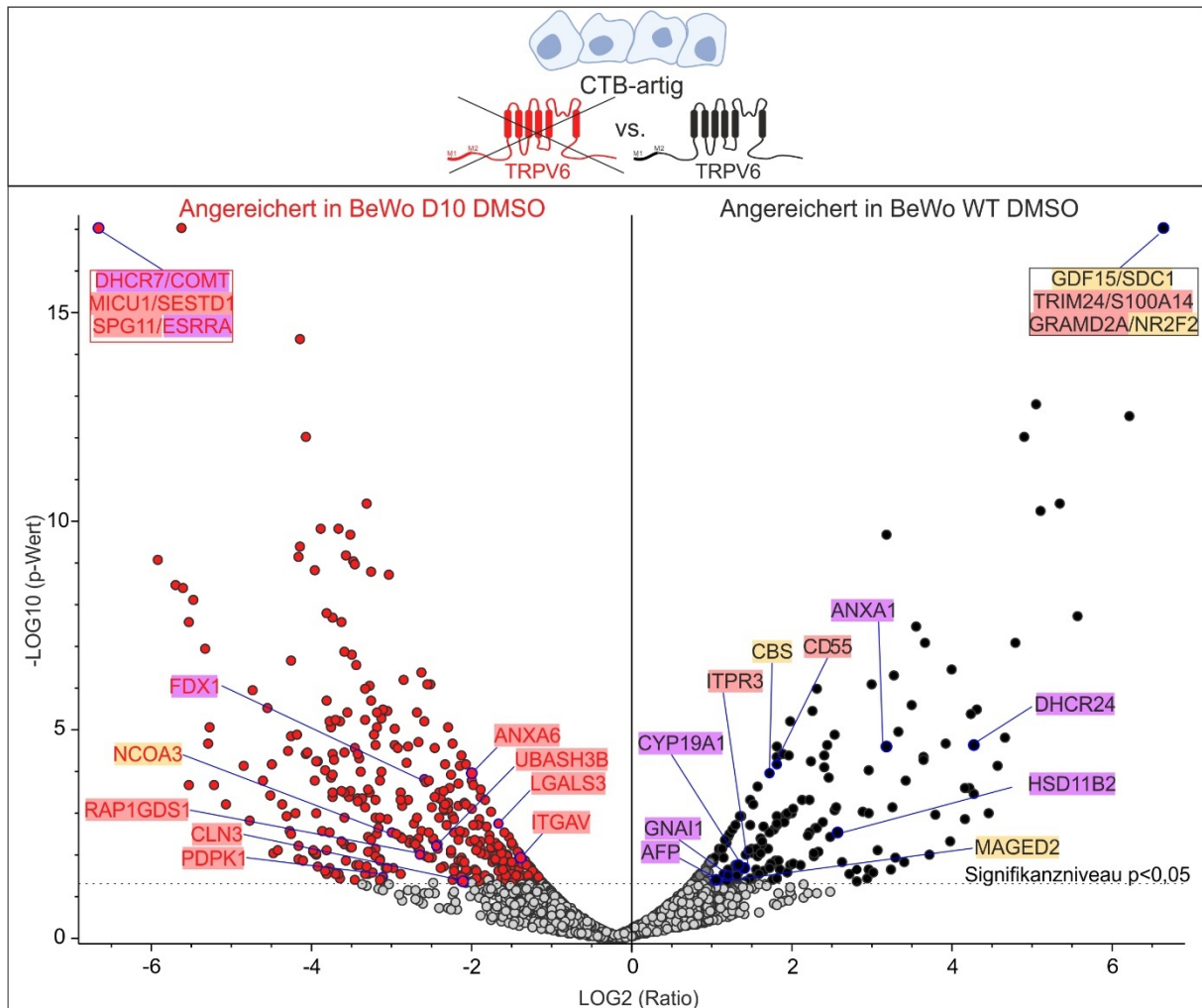


Abbildung 25: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus DMSO behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-Knockoutzellen D10 (links), dargestellt als Vulcano-Blot auf Basis eines ungepaarten t-Tests der proteinspezifischen Abundanz-Verhältnisse der Vorläuferionen. Signifikanzniveau $p < 0,05$, maximaler p-Wert= $1,0e-17$, maximale Abundance ratio= 100, $n=3$; x-Achse= binärer Logarithmus (Abundanz WT/Abundanz D10); y-Achse= negativer dekadischer Logarithmus (P-Wert); rote Datenpunkte= angereichert in BeWo D10 DMSO Lysaten, schwarze Datenpunkte= angereichert in BeWo Wildtyp DMSO Lysaten, graue Datenpunkte= kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen BeWo D10 und Wildtyp-Lysaten. Hervorhebung von Proteinen des/der Calciumionen-Transfer/Homöostase (rot), der Plazentaentwicklung/ schwangerschaftsrelevanter Funktion (gelb) und des/der Steroidhormon-/Cholesterol- Metabolismus/Synthese/Sekretion (lila)

In den Lysaten des TRPV6-defizienten BeWo-Zellklons D10 sowie in den Lysaten des TRPV6-exprimierenden BeWo-Zellwildtyps können Proteine der zuvor genannten Kategorien in unterschiedlichem Ausmaß identifiziert werden. Bei der Betrachtung des undifferenzierten BeWo-Zellwildtyps fällt auf, dass im Vergleich zum TRPV6-Knockoutklon D10 eine signifikante Anreicherung von Proteinen der Kategorien „Steroidhormon- bzw. Cholesterol-Metabolismus, Synthese oder Sekretion“ (lila) sowie von Proteinen mit schwangerschaftsrelevanten Funktionen (gelb) zu verzeichnen ist: Als klassische Proteine der Steroidhormonsynthese sind das Estradiol-synthetisierende Enzym Aromatase (CYP19A1), sowie der Glukokortikoid-metabolisierende calciumabhängige Synzytialisierungsmarker HSD11B2 (3.1.2) [180], im TRPV6-exprimierenden Wildtyp im Vergleich zum Knockoutklon signifikant angereichert. An der Synthese des Steroidhormon-Vorläufers Cholesterol ist unter anderem die Delta-(24) -sterol Reduktase (DHCR24) beteiligt, indem sie die Reduktion der delta-24-Doppelbindung von Sterol-Zwischenprodukten katalysiert [185]. DHCR24 wird ebenfalls im TRPV6 exprimierenden BeWo-Zellwildtyp signifikant stärker exprimiert. Im Wildtyp ist darüber hinaus das Ca^{2+} -bindende, Glukokortikoid-regulierte Protein Annexin A1 (ANXA1) signifikant angereichert. Die G(i)-Protein-Untereinheit Alpha-1 (GNAI1), ein Guanin-Nukleotid-bindendes Protein mit Transducer-Funktion in diversen G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden, wird in der Literatur mit der Aktivierung Cholesterolsynthese-assoziiierter Prozesse in Verbindung gebracht [186] und ist im BeWo-Wildtyp im Vergleich zum Knockoutklon deutlich stärker exprimiert. Darüber hinaus wird bei Uniprot auch das Alpha-fetoprotein (AFP) als Teil des Progesteron-Stoffwechselprozesses genannt und im Wildtyp signifikant mehr als im Knockout detektiert.

Auch Proteine mit schwangerschaftsrelevanten Funktionen sind im Wildtyp im Vergleich zum TRPV6-Knockoutklon 100-fach angereichert. Dazu zählen der Growth/differentiation factor 15 (GDF15), ein Schwangerschaftshormon, das eine starke plazentare Expression aufweist, der calciumabhängige Synzytialisierungsmarker Syndecan-1 (SDC1) (3.1.2) [180] und der COUP transcription factor 2 (NR2F2) der bei Uniprot unter anderem als Teil der Entwicklung der mütterlichen Plazenta genannt wird. Darüber hinaus zeigen auch die Cystathionin- β -Synthase (CBS), die laut Uniprot eine Rolle in maternalen Prozessen während der Schwangerschaft spielt, sowie das Melanoma-Associated Antigen D2 (MAGED2), das als essenziell für die fetale renale Salzurückresorption, die Fruchtwasserhomöostase und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beschrieben wird [187], im BeWo-Wildtyp eine erhöhte Expression.

Neben den signifikant angereicherten Proteinen der Hormonsynthese und Sekretion sowie der Proteine, die mit der Schwangerschaft assoziiert werden, sind auch in geringerem Umfang Proteine der Calciumhomöostase und des Transfers signifikant im Wildtyp angereichert. Der

Transcription intermediary factor 1-alpha (TRIM24) und das Protein S100-A14 (S100A14) die auf Uniprot als Teil der Calciumhomöostase erwähnt werden und das GRAM domain-containing protein 2A (GRAMD2A), das als Regulator des Speicher-gesteuerten Calciumeintritts fungiert [188], sind am stärksten im Wildtyp angereichert. Ebenso ist der Complement decay-accelerating factor (CD55), der die zytosolische Calciumkonzentration positiv reguliert [189] und der Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channel (ITPR3), der Calcium aus dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums ins Zytoplasma transportiert [190], stärker im Wildtyp exprimiert.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen sich jedoch Proteine, die an der Calciumhomöostase und dem Calciumtransfer beteiligt sind, im TRPV6-Knockoutklon D10 signifikant verstärkt exprimiert. In der TRPV6-CRISPR/Cas9-Knockoutmutante D10 werden das mitochondriale Calcium Uptake Protein 1 (MICU1), das als Calciumsensor fungiert [191] und bei niedrigen zytosolischen Calciumkonzentrationen die Pore des MCU-Kanals verschließt und so die mitochondriale Calciumaufnahme verhindert [192], das SEC14 Domain and Spectrin Repeat-Containing Protein 1 (SESTD1), das den Transmembrantransport von Calciumionen durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle negativ reguliert und von dem beschrieben wird, dass es mit TRPC4 und TRPC5 assoziiert ist [193], sowie Spatacsin (SPG11), das als Regulator des homöostatischen Gleichgewichts zwischen Cholesterin-Transfer und zytosolischem Calcium beschrieben wird [194], jeweils über 100-fach angereichert gemessen. Zudem sind in der TRPV6-defizienten Zelllinie D10 Annexin 6 (ANXA6), ein potenzieller Regulator der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern [195], das bei UniProt als Mediator der Mobilisierung gebundener Calciumionen ins Zytosol beschriebene UBASH3B (Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein B), das in Monozyten den Calciumimport regulierende Galectin-3 (LGALS3) [196] sowie Integrin αV (ITGAV) signifikant angereichert. Im TRPV6-Knockoutklon D10 sind auch der Rap1 GTPase-GDP Dissociation Stimulator 1 (RAP1GDS1), Battenin (CLN3) und die 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDPK1) stärker exprimiert. RAP1GDS1 beeinflusst die Calciumkonzentration negativ im endoplasmatischen Retikulum und positiv in den Mitochondrien [197], CLN3 wird bei UniProt als Regulator der zytosolischen Calciumkonzentration beschrieben und PDPK1 wirkt als Mediator, der die Freisetzung von gebundenen Calciumionen in das Zytosol positiv beeinflusst [198].

Im TRPV6-defizienten Klon D10 sind zudem Proteine angereichert, die eine Relevanz für Schwangerschaft, Steroidhormonsynthese und zugehörige Signalwege besitzen. Hierzu zählen der Nuclear Receptor Coactivator 3 (NCOA3), der die plazentare Morphogenese reguliert [199] und als selektiver Koaktivator der $\text{ER}\alpha$ -induzierten Stimulation des plazentaspezifischen Proteins PLAC1 wirkt [200], das Cholesterolsynthese-Enzym 7-

Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7) [201], das Estrogen-metabolisierende Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) [202], der Elektronenlieferant der mitochondrialen Pregnenolon-Synthese Adrenodoxin (FDX1) [203] sowie der Steroidhormonrezeptor ESRRA. In diesem Klon dominiert jedoch die Expression von Proteinen der Calciumhomöostase, die potenziell kompensatorisch vermehrt gebildet werden.

3.12.1.2 Proteomanalyse Synzytiotrophoblast-artiger TRPV6 defizienter- und BeWo-Wildtypzellen

Um den Einfluss der FSK-Behandlung und der damit einhergehenden Aktivierung der Adenylatzyklase sowie Induktion der Synzytialisierung auf die Proteinexpression des TRPV6-Knockoutklons D10 im Vergleich zum BeWo-Zellwildtyp zu untersuchen, wurde das Proteom FSK-behandelter BeWo-Wildtyp- mit dem der Knockoutzellen D10 verglichen (2.2.1.5, 2.2.7) (Abb. 26 und 27). Zudem sollte geprüft werden, ob die zuvor beobachteten Expressionsunterschiede von Proteinen, die an der Calciumhomöostase, der Hormonsynthese und von Proteinen, die im Kontext der Schwangerschaft erwähnt werden, auch nach der Synzytialisierung (FSK-Behandlung) in den Zellen erhalten bleiben.

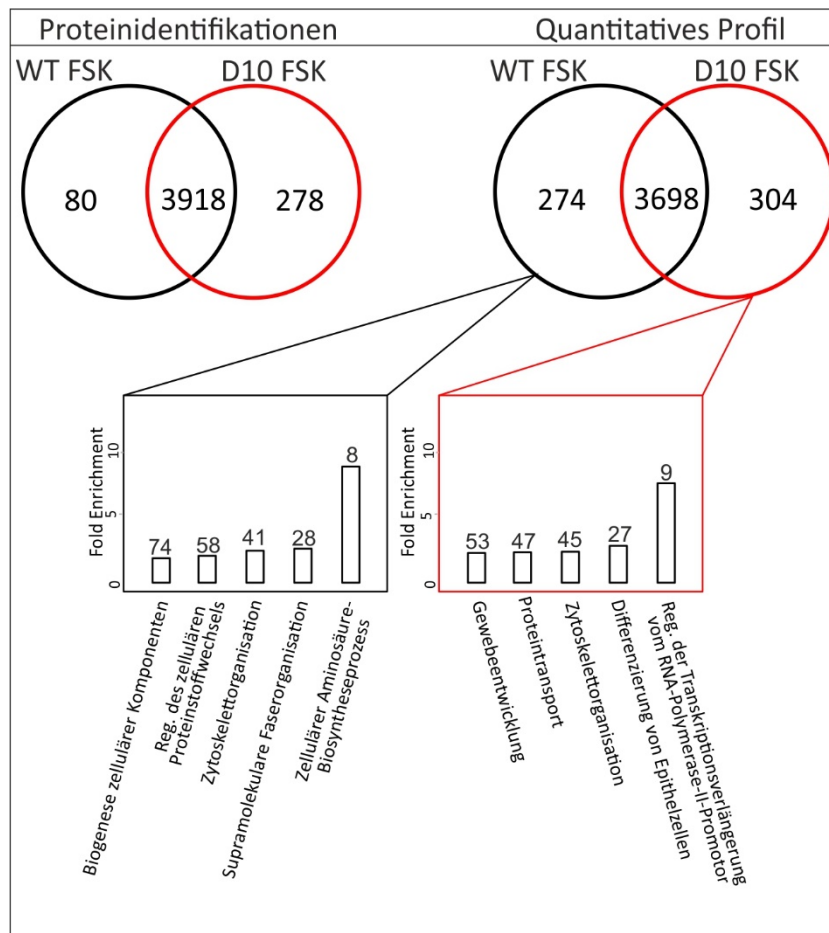


Abbildung 26: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von FSK behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo TRPV6 Knockoutzellen D10. Oben Venn-Diagramm identifizierter (links) und quantifizierter Proteine (rechts). Darunter „Gene Ontology-Biological Process“ Analyse von unterschiedlich exprimierten Proteinen (ShinyGO). Anzahl der angereicherten Gene die einem Signalweg angehören über Balken im Diagramm dargestellt

In den durch FSK-Inkubation gebildeten Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Wildtyp- und TRPV6-Knockout-Zelllysaten werden 80 Proteine nur im Wildtyp und 278 Proteine nur im Knockoutklon exprimiert, während 3918 Proteine in beiden Klonen detektierbar sind. Von den 4276 identifizierten Proteinen unterscheiden sich 3698 Proteine nicht signifikant in ihrer Expression, während 274 Proteine signifikant hoch und 304 im Wildtyp signifikant herunterreguliert sind. Im Gegensatz zum quantitativen Profil der Zytotrophoblast-artigen Zellen (3.12.1.1, Abb. 24), werden nach FSK-Stimulation vergleichbar viele Proteine abundanter im Wildtyp und im TRPV6-Knockoutklon gebildet. Analysiert man auch hier intra-klonal die Funktionen angereicherter Proteine fällt auf, dass nach der FSK-induzierten Zellfusion eine weniger klare funktionelle Differenzierung angereicherter Proteine erkennbar ist als in den DMSO-behandelten Zellen. In beiden Zellklonen sind unterschiedliche Proteine, die an der zellulären Proteinbiosynthese beteiligt angereichert. Zudem weisen beide Klone

eine erhöhte Expression verschiedener Proteine auf, die für die Zytoskelettorganisation verantwortlich sind. Im Wildtyp findet man mehr Proteine die am Proteintransport-, im Knockoutklon mehr Proteine, die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind. Nach der FSK-induzierten Zellfusion sind zudem Proteine, die den GO-Terms „Gewebeentwicklung“ und „Epithelzelldifferenzierung“ zugeordnet werden, vermehrt im Knockoutklon detektierbar, während im Wildtyp Proteine dominieren, die allgemeineren GO-Terms wie der Biogenese zellulärer Komponenten zugeordnet werden können. Die zuvor beobachtete Abgrenzbarkeit klonspezifisch angereicherter funktioneller Proteingruppen scheint nach FSK-Behandlung nicht mehr so deutlich ausgeprägt zu sein wie im Proteomvergleich DMSO-behandelter Zellen.

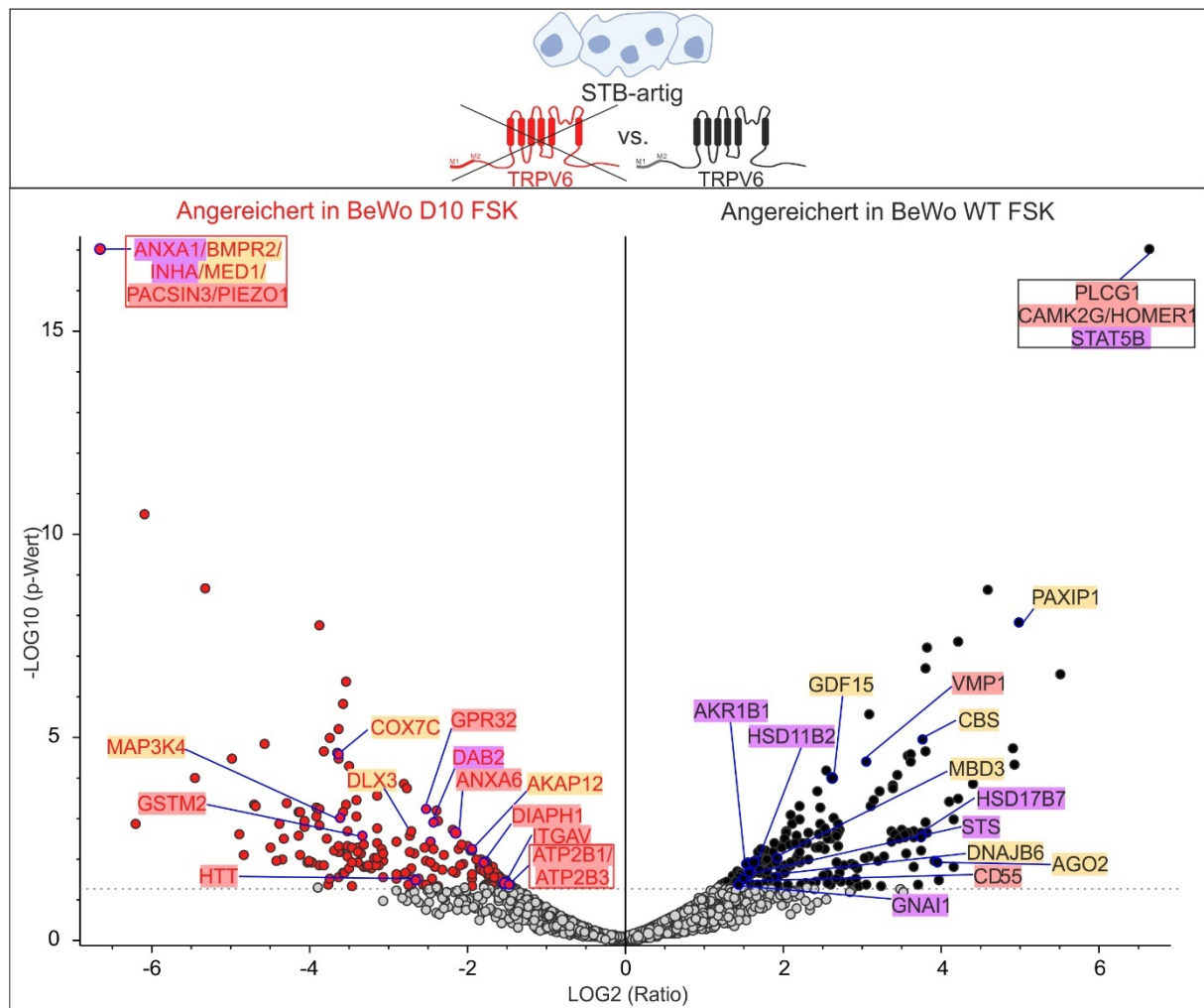


Abbildung 27: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus FSK- behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-Knockoutzellen D10 (links), dargestellt als Vulcano-Blot auf Basis eines ungepaarten t-Tests der proteinspezifischen Abundanz-Verhältnisse der Vorläuferionen. Signifikanzniveau $p < 0,05$, maximaler p-Wert= $1,0e-17$, maximale Abundance ratio= 100, $n=3$; x-Achse= binärer Logarithmus (Abundanz WT/Abundanz D10); y-Achse= negativer dekadischer Logarithmus (P-Wert); rote Datenpunkte= angereichert in BeWo D10 FSK Lysaten, schwarze Datenpunkte= angereichert in BeWo-Wildtyp FSK Lysaten, graue Datenpunkte= kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen BeWo D10 und Wildtyp-Lysaten. Hervorhebung von Proteinen des/der Calciumionen- Transfer/Homöostase (rot), der Plazentaentwicklung/ schwangerschaftsrelevanter Funktion (gelb) und des/der Steroidhormon-/Cholesterol- Metabolismus/Synthese/Sekretion (lila)

Wie bereits durch die GO-Term-Analyse der intra-klonal angereicherten Proteine angedeutet, verlieren mehrere Proteine, die in DMSO-behandelten BeWo-Wildtypzellen gegenüber dem TRPV6-Knockoutklon D10 signifikant stärker exprimiert sind, nach FSK-induzierter Zellfusion ihr differentielles Expressionsprofil. Aus der Kategorie der Steroidhormon-Synthese und Sekretion trifft das auf das Estradiolsynthese-Enzym CYP19A1 und das Progesteron-Stoffwechselprotein AFP zu. Zudem kann die Sterol-Reduktase DHCR24 nach FSK-Inkubation nicht mehr detektiert werden. Das zuvor in DMSO-behandelten Wildtypzellen

angereicherte Annexin A1 wird hingegen post-synzytial angereichert im TRPV6-Knockoutklon D10 detektiert. Die Cortisol-metabolisierende Dehydrogenase HSD11B2 und das G-Protein GNAI1 werden jedoch auch nach FSK-Behandlung stärker im Wildtyp exprimiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Proteine sowohl in Zyto- als auch in Synzytiotrophoblasten in Abhängigkeit von TRPV6 gebildet werden. Darüber hinaus lassen sich nach FSK-induzierter Synzytialisierung weitere Proteine aus der Kategorie der Steroidhormonsynthese identifizieren, die im BeWo-Wildtyp in höherem Maße exprimiert sind als im TRPV6-Knockoutklon. Dazu zählt der Signal Transducer and Activator of Transcription 5B (STAT5B), ein Signalprotein mit Einfluss auf den durch 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vermittelten Progesteronabbau [204] und regulatorischer Funktion im Kontext der Synzytialisierung [205]. Ebenfalls angereichert sind das Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B1 (AKR1B1), ein Vertreter der an der C21-Steroidhormonbiosynthese beteiligten Aldo-Ketoreduktasen [206], sowie die Sterylsulfatase (STS), die Sulfatgruppen von Steroidvorstufen abspaltet [207]. Auch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7 (HSD17B7), ein weiteres Enzym der Steroidhormonsynthese [208], weist im Wildtyp eine höhere Expression auf als im Knockout.

Aus der Gruppe der im BeWo-Wildtyp angereicherten, schwangerschaftsassozierten Proteine zeigen SDC1 und MAGED2 nach FSK-induzierter Zellfusion keine Expressionsunterschiede mehr. NR2F2 wird nach FSK-Behandlung der Zellen nicht mehr detektiert, während GDF15 und CBS auch nach Zellfusion signifikant stärker im Wildtyp exprimiert werden, was auch hier impliziert, dass die Bildung dieser plazentaren Proteine in Zyto- und Synzytiotrophoblasten TRPV6-abhängig ist. Zusätzlich sind PAXIP1 (PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1A), das an der Chorionentwicklung beteiligt ist [209], sowie die laut UniProt mit embryonaler bzw. Chorionentwicklung assoziierten Proteine Methyl-CpG-binding domain protein 3 (MDB3) und DnaJ homolog subfamily B member 6 (DNAJB6) im TRPV6-exprimierenden Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Wildtyp stärker exprimiert. Analog dazu ist auch das Protein argonaute-2 (AGO2), ein beschriebener Regulator der Trophoblasten-Migration [210], signifikant im fusionierten Wildtyp angereichert.

Auch Proteine aus den GO-Term-Kategorien der Calciumhomöostase, die im Zytotrophoblast-artigen Wildtyp signifikant angereichert waren, zeigen nach FSK-induzierter Zellfusion zum Teil keine signifikanten Unterschiede in ihrer Anreicherung mehr. Sowohl S100A14 als auch GRAMD2A werden nach Induktion der Zellfusion nicht mehr detektiert, während TRIM24 und der ITPR3-Kanal keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr zwischen BeWo-Wildtyp und TRPV6 Knockoutklon D10 zeigen. Nur CD55 zeigt auch nach FSK-Behandlung der Zellen

einen signifikanten Expressionsunterschied. Zu den weiteren im fusionierten Wildtyp angereicherten Proteinen der Calciumhomöostase zählen die 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate Phosphodiesterase gamma-1 (PLCG1), die Calcium-/Calmodulin-abhängige Protein Kinase Typ II gamma Untereinheit (CAMK2G), das Homer Protein homolog 1 (HOMER1) und das Vacuole Membranprotein 1 (VMP1). PLCG1 reguliert die Freisetzung von gebundenen Calciumionen in das Zytosol positiv [198], während CAMK2G den Calciumtransport [211], und VMP1 die ATP-ase gekoppelte Aktivität von Calcium-Transmembrantransportern induziert [212]. HOMER1 fungiert als Aktivitätsregulator von Kationenkanälen [213].

Auch im TRPV6-Knockout sollte anschließend geprüft werden, ob sich nach FSK-induzierter Zellfusion die Expression jener Proteine verändert, die zuvor nach DMSO-Inkubation gegenüber dem Wildtyp angereichert und funktionellen Kategorien zugeordnet wurden. Dabei zeigt sich, dass viele dieser Proteine nach Aktivierung der Adenylatzyklase im TRPV6-defizienten Klon D10 entweder nicht mehr detektiert werden können oder keine signifikanten Expressionsunterschiede zum Wildtyp mehr aufweisen. Ersteres trifft auf MICU1, SEST1, RAP1GDS1, CLN3 und PDPK1 zu, Proteine mit Funktionen in der Calciumhomöostase, die nach induzierter Zellfusion massenspektrometrisch nicht mehr nachweisbar sind. Weitere Proteine der Calciumhomöostase wie SPG11, UBASH3B und LGALS3 werden zwar in FSK-behandelten Zellen erfasst, weisen jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr auf. Lediglich ITGAV und Annexin A6 sind nach wie vor in der TRPV6-Knockoutmutante signifikant angereichert. Darüber hinaus sind nach FSK-Behandlung in TRPV6-Knockoutzellen weitere Proteine angereichert: darunter PACSIN3 (Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3), PIEZO1 (Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1), GSTM2 (Glutathione S-transferase Mu 2), GPR32 (G-protein coupled receptor 32), DIAPH1 (Diaphanous homolog 1), sowie die Calcium-Transporter PMCA1 und PMCA3 (Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 und 3), und das Protein Huntingtin (HTT). Bei all diesen Proteinen handelt es sich ebenfalls um Komponenten des Calciumtransfers und der Homöostase [214-220]. Demnach bleiben auch nach der Zellfusion potenziell kompensatorisch vor allem Proteine der Calciumhomöostase im TRPV6-Knockoutklon angereichert.

Proteine der Steroidhormonkategorie, die in DMSO-behandelten Zytotrophoblasten in der TRPV6-CRISPR/Cas9 Knockoutzelllinie D10 stärker exprimiert werden, sind nach Induktion der Zellfusion entweder nicht mehr detektierbar (ESRRA) oder zeigen keine Unterschiede im Expressionsprofil im Vergleich zum Wildtyp (DHCR7, COMT, FDX1). Stattdessen sind in FSK-

behandelten TRPV6-Knockoutzellen das Disabled homolog 2 (DAB2) Protein, dessen Expression durch verschiedene schwangerschaftsrelevante Hormone induziert wird [221], sowie die Inhibin-alpha-Kette (INHA), die als Induktor der FSH-Sekretion fungieren kann [104], signifikant angereichert.

Auch für die Kategorie der schwangerschaftsrelevanten Proteine zeigt sich im TRPV6-Knockoutklon nach FSK-induzierter Synzytialisierung ein verändertes Expressionsmuster: Anstelle der in DMSO-behandelten D10-Zellen angereicherten Proteine lassen sich nun andere Vertreter derselben Kategorie detektieren, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Expression aufweisen. Hierzu zählt beispielsweise der Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 (BMPR2), der an zentralen Regulationsprozessen an der feto-maternalen Schnittstelle beteiligt ist [222], sowie MED1 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1) ein Faktor der murinen Plazentaentwicklung [223]. Ebenfalls signifikant angereichert im TRPV6-Knockoutklon D10 ist MAP3K4 (Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase 4), ein Regulator des IGF1R/Akt-Signalwegs mit Bedeutung für das fetoplazentare Wachstum [224]. Gleiches gilt für das Homeobox-Protein DLX3, das in die Differenzierung humaner Trophoblasten involviert ist [225]. Zusätzlich sind im TRPV6-Knockoutklon zwei Synzytialisierungsmarker signifikant stärker exprimiert: die calciumabhängig gebildete COX7C, sowie das calciumunabhängig exprimierte AKAP12 (3.1.2) [180]. Zusammenfassend zeigt sich, dass die zuvor klare funktionelle Trennung der im BeWo-Wildtyp und im TRPV6-Knockoutklon angereicherten Proteine nach der FSK-induzierten Fusion zu Synzytiotrophoblast-artigen Zellen nicht mehr im gleichen Maß erkennbar ist.

3.12.2 Proteomanalyse von TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen

3.12.2.1 Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen

Im Anschluss an die Analyse des TRPV6-Defizits sollte der Einfluss einer Überexpression auf das BeWo-Proteom untersucht werden. Konform zu den vorherigen Vergleichsanalysen wurden zunächst die massenspektrometrischen Daten von Zytotrophoblast-artigen, DMSO-behandelten BeWo-Wildtypzellen mit denen der äquivalent inkubierten, TRPV6-überexprimierenden Zellen E10 in Relation gesetzt (2.2.7) (Abb. 28 und 29).

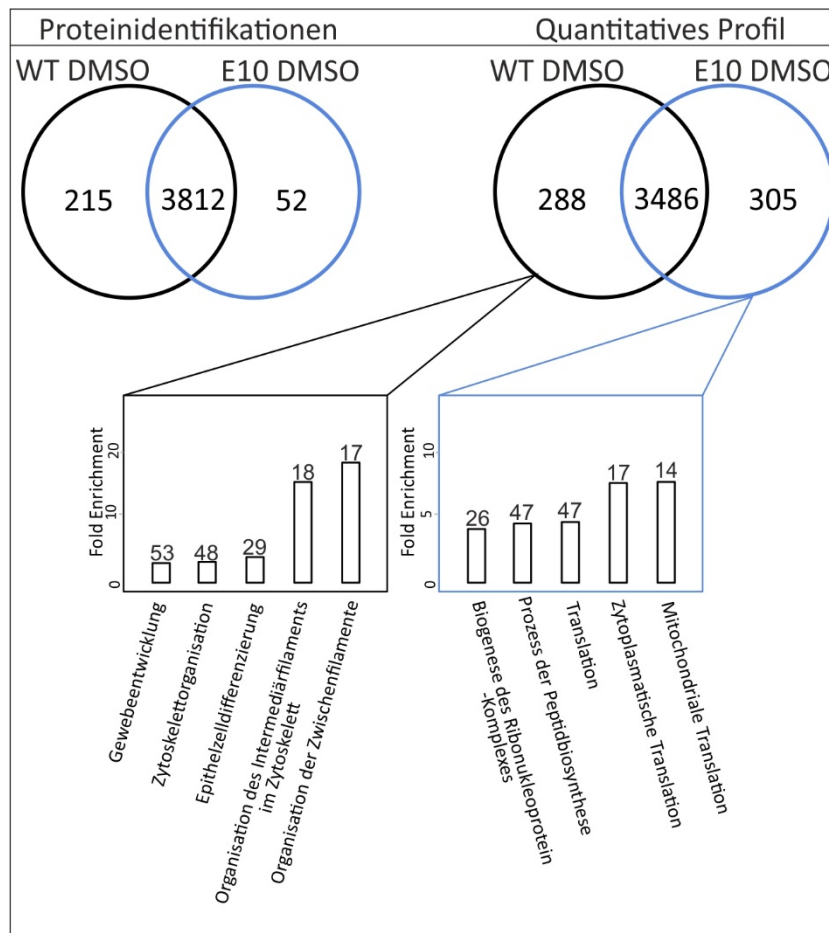


Abbildung 28: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von DMSO behandelten BeWo-Wildtyp- und BeWo TRPV6-überexprimierenden-Zellen E10. Oben Venn-Diagramm identifizierter (links) und quantifizierter Proteine (rechts). Darunter „Gene Ontology-Biological Process“ Analyse von unterschiedlich exprimierten Proteinen (ShinyGO). Anzahl der angereicherten Gene die einem Signalweg angehören über Balken im Diagramm dargestellt

In der vergleichenden massenspektrometrischen Analyse von DMSO-behandelten Wildtyp- und TRPV6-überexprimierenden E10-Zellen werden insgesamt 4079 Proteine identifiziert. Davon sind 215 exklusiv und 288 signifikant angereichert im Wildtyp nachweisbar, während 52 Proteine exklusiv und 305 signifikant stärker im Zellklon E10 exprimiert sind (Abb. 28). 3486 Proteine unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Expression. Analog zum Vergleich mit dem Knockoutklon D10 dominiert im BeWo-Wildtyp die Expression von Proteinen, die mit zellulärer Organisation, Epithelzelldifferenzierung und Gewebeentwicklung assoziiert sind. Im TRPV6-überexprimierenden Klon hingegen weist die GO-Term-Analyse eine Anreicherung von Proteinen auf, die an der Translation beteiligt sind, da sämtliche fünf dominanten funktionellen Gruppierungen stark exprimierter Proteine in diesem Klon auf Prozesse der Proteinbiosynthese abzielen. Eine höhere Menge an TRPV6 in BeWo-Zellen könnte demnach mit einer Intensivierung von Translationsprozessen einhergehen.

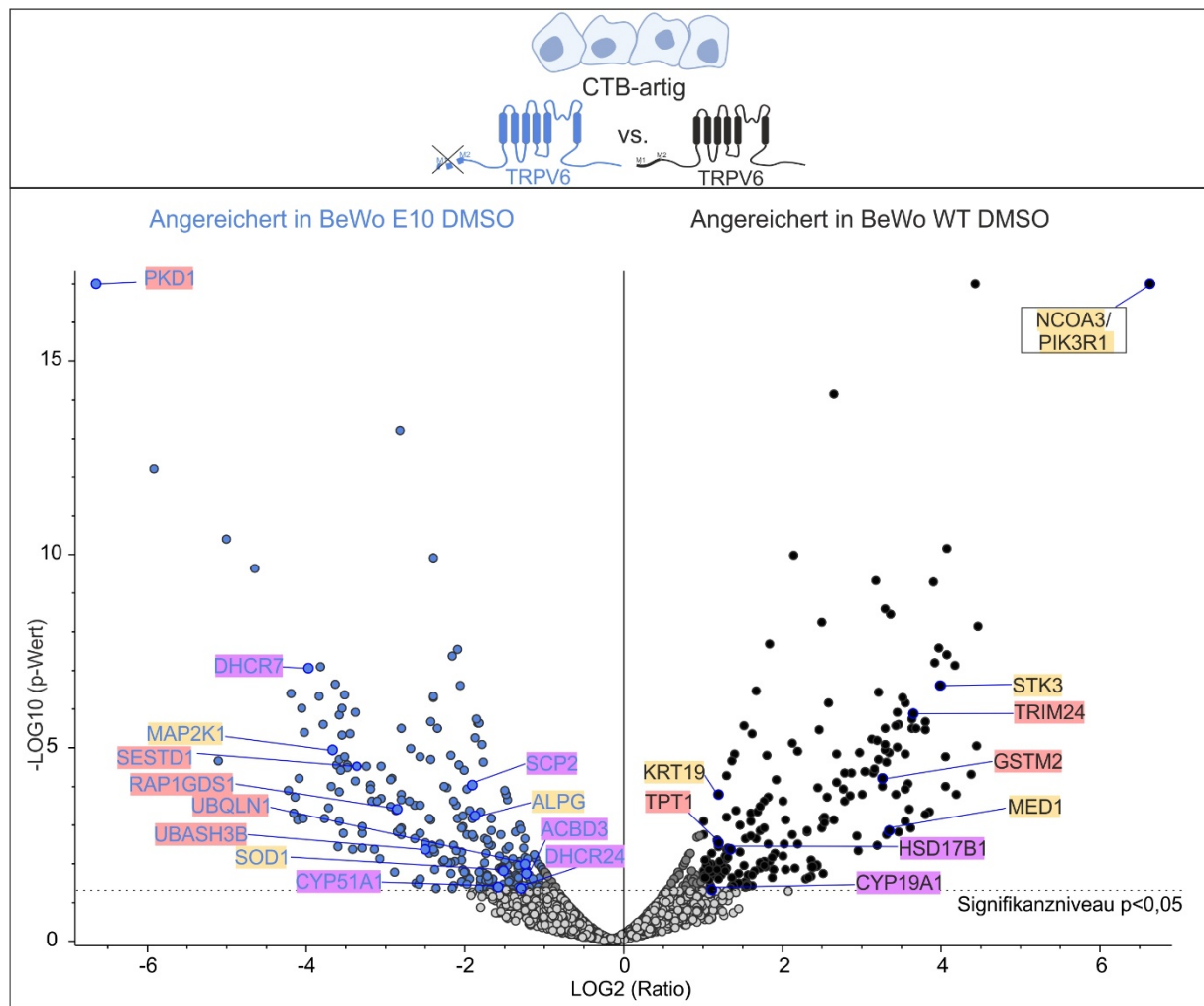


Abbildung 29: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus DMSO-behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-überexprimierenden E10 Zellen (links), dargestellt als Vulcano-Blot auf Basis eines ungepaarten t-Tests der proteinspezifischen Abundanz-Verhältnisse der Vorläuferionen. Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Maximaler p-Wert = $1,0e-17$, Maximale Abundanz ratio = 100, $n=3$; x-Achse = binärer Logarithmus (Abundanz WT/Abundanz D10); y-Achse = negativer dekadischer Logarithmus (P-Wert); blaue Datenpunkte = angereichert in BeWo E10 DMSO Lysaten, schwarze Datenpunkte = angereichert in BeWo-Wildtyp DMSO Lysaten, graue Datenpunkte = kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen BeWo E10 und Wildtyp-Lysaten. Hervorhebung von Proteinen des/der Calciumionen- Transfer/Homöostase (rot), der Plazentaentwicklung/ Schwangerschaftsrelevanter Funktion (gelb) und des/der Steroidhormon-/Cholesterol- Metabolismus/Synthese/Sekretion (lila)

Auch im Vergleich von BeWo-Zellen mit unterschiedlicher TRPV6-Expression lassen sich Proteine mit Funktionen in der Steroidhormonsynthese und -sekretion, der Calciumhomöostase sowie mit einem Einfluss auf schwangerschaftsrelevante Prozesse identifizieren, die in den jeweiligen Klonen signifikant unterschiedlich exprimiert sind (Abb. 29). Analog zur Beobachtung zur Expressionsdefizienz im Knockout zeigt sich auch gegenüber dem TRPV6-überexprimierenden Klon eine signifikant stärkere Aromatase-Expression im Wildtyp. Eine ausgeglichene TRPV6-Expression scheint somit wichtig für die Estradiol-

Synthese in der Trophoblastenzelllinie zu sein, wobei Abweichungen nach oben oder unten die Aromatase-Expression mindern. 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD17B1), ein weiteres Enzym der Estradiolsynthese [226], ist ebenfalls im BeWo-Zellwildtyp signifikant angereichert. Mehrere schwangerschaftsrelevante Proteine, darunter NCOA3 und MED1, die bereits in vorangegangenen Analysen (3.12.1.2) differentiell exprimiert waren, zeigen im Vergleich zwischen Wildtyp und TRPV6-überexprimierender Mutante E10 eine stärkere Expression im Wildtyp. Ergänzend sind auch der potenzielle Präeklampsiemarker PIK3R1 (Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha) [227], ein Regulator der Trophoblasten-Differenzierung STK3 (Serine/threonine-protein kinase 3) [228], und der trophoblastodermale Marker KRT19 (Keratin, type I cytoskeletal 19) im Wildtyp signifikant angereichert [229]. Mit TRIM24 (3.12.1.1) und GSTM2 (3.12.1.2) sind zwei Proteine der Calciumhomöostase, die bereits in vorherigen Vergleichsanalysen als differentiell exprimiert detektiert wurden, im Wildtyp gegenüber der TRPV6-überexprimierenden Mutante E10 signifikant angereichert. Ergänzend zeigt sich auch für das bislang nicht erfasste TPT1 (Translationally-controlled tumor protein), das am Calciumtransport in Trophoblasten beteiligt ist [230], eine erhöhte Expression im Wildtyp.

Auch in den Zelllysaten der TRPV6-überexprimierenden E10-Zelllinie lassen sich Proteine der drei genannten Funktionsgruppen angereichert detektieren. Als Proteine der Kategorie „Steroidhormonsynthese“ zeigen die bereits in vorherigen Vergleichsanalysen differentiell exprimierten Enzyme der Cholesterolsynthese DHCR7 und DHCR24 (3.12.1.1) sowie SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) [231], CYP51A1 (Lanosterol-14 α -Demethylase) [232] und ACBD3 (Golgi-residente Protein GCP60) [233] eine erhöhte Expression im E10-Zellklon. Ebenso sind die schwangerschaftsrelevanten Proteine ALPG (Alkaline Phosphatase-like Protein), MAP2K1 (Dual Specificity Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1) [234], und SOD1 (Superoxid-Dismutase [Cu-Zn]) [235] in der TRPV6-überexprimierenden Mutante E10 im Vergleich zum BeWo-Wildtyp signifikant stärker exprimiert. UBASH3B, RAP1GDS1 und SESTD1, Proteine der Calciumhomöostase, werden in beiden TRPV6-modulierten Zelllinien (D10 und E10) signifikant stärker exprimiert als im Wildtyp (3.11.1.1). Auch die calciumregulatorischen Proteine Polycystin 1 (PKD1) [236] und Ubiquilin-1 (UBQLN1) [237] sind in E10 angereichert. Damit unterscheiden sich die funktionellen Proteinprofile des DMSO-behandelten TRPV6-überexprimierenden Klons E10 und des Wildtyps (3.12.2.1, Abb. 28 und 29), wobei die Abgrenzung weniger deutlich ist als im Vergleich zwischen Wildtyp und TRPV6-Knockoutklon (3.12.1.1, Abb. 24 und 25).

3.12.2.2 Proteomanalyse von Synzytiotrophoblast -artigen TRPV6-überexprimierenden und BeWo-Wildtypzellen

Der Einfluss der FSK-Behandlung auf die Proteinexpression wurde auch in beiden Zelllinien untersucht, die TRPV6 in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren (2.2.1.5, 2.2.7) (Abb. 30). Analog zur Analyse des TRPV6-Knockoutklons (3.12.1.2) wird zudem geprüft, ob die in DMSO-behandelten Wildtyp- und E10-Zellen identifizierten Expressionsunterschiede auch nach FSK-induzierter Synzytialisierung bestehen bleiben (Abb. 31).

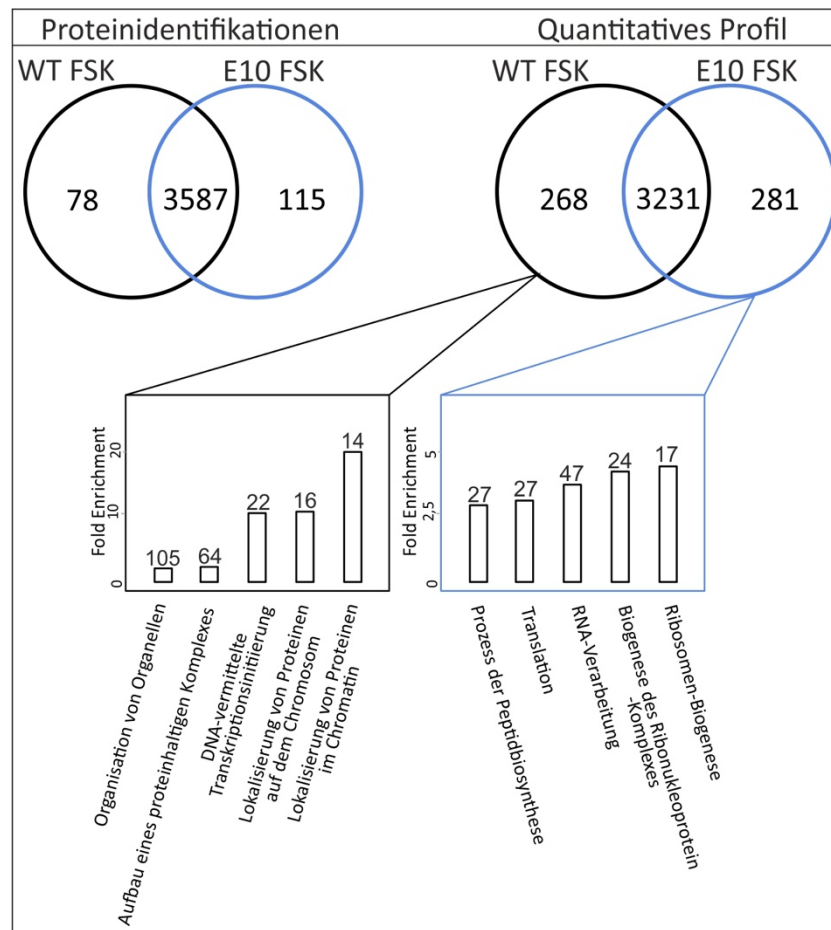


Abbildung 30: Übersicht der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von FSK-behandelten BeWo-Wildtyp und BeWo TRPV6-überexprimierenden E10 Zellen. Oben Venn-Diagramm identifizierter (links) und quantifizierter Proteine (rechts). Darunter „Gene Ontology-Biological Process“ Analyse von unterschiedlich exprimierten Proteinen (ShinyGO). Anzahl der angereicherten Gene die einem Signalweg angehören über Balken im Diagramm dargestellt

In der massenspektrometrischen Analyse der Zelllysate werden insgesamt 3780 Proteine identifiziert. Davon werden 78 Proteine ausschließlich im Wildtyp und 115 Proteine nur im TRPV6-überexprimierenden E10-Zellklon gebildet. Die quantitative Analyse zeigt zudem, dass 268 Proteine signifikant stärker im Wildtyp und 281 Proteine mehr im Klon E10 detektiert werden, während für 3231 Proteine keine unterschiedliche Expression vorliegt (Abb. 30). Die

allgemeine funktionelle Zuordnung der angereicherten Proteine zu biologischen Prozessen stimmt in der TRPV6-überexprimierenden E10-Zelllinie mit den Ergebnissen unter DMSO-Behandlung überein (Abb. 28). Auch in FSK-behandelten Synzytiotrophoblast-artigen E10 Zellen dominiert im Vergleich zum Wildtyp die Expression von Proteinen der Proteinbiosynthese. Im Wildtyp sind erneut Proteine variabler zellulärer Prozesse wie Proteinlokalisierung auf Chromosomen, Proteinkomplexaufbau sowie Transkription und die Organisation von Organellen, abundant.

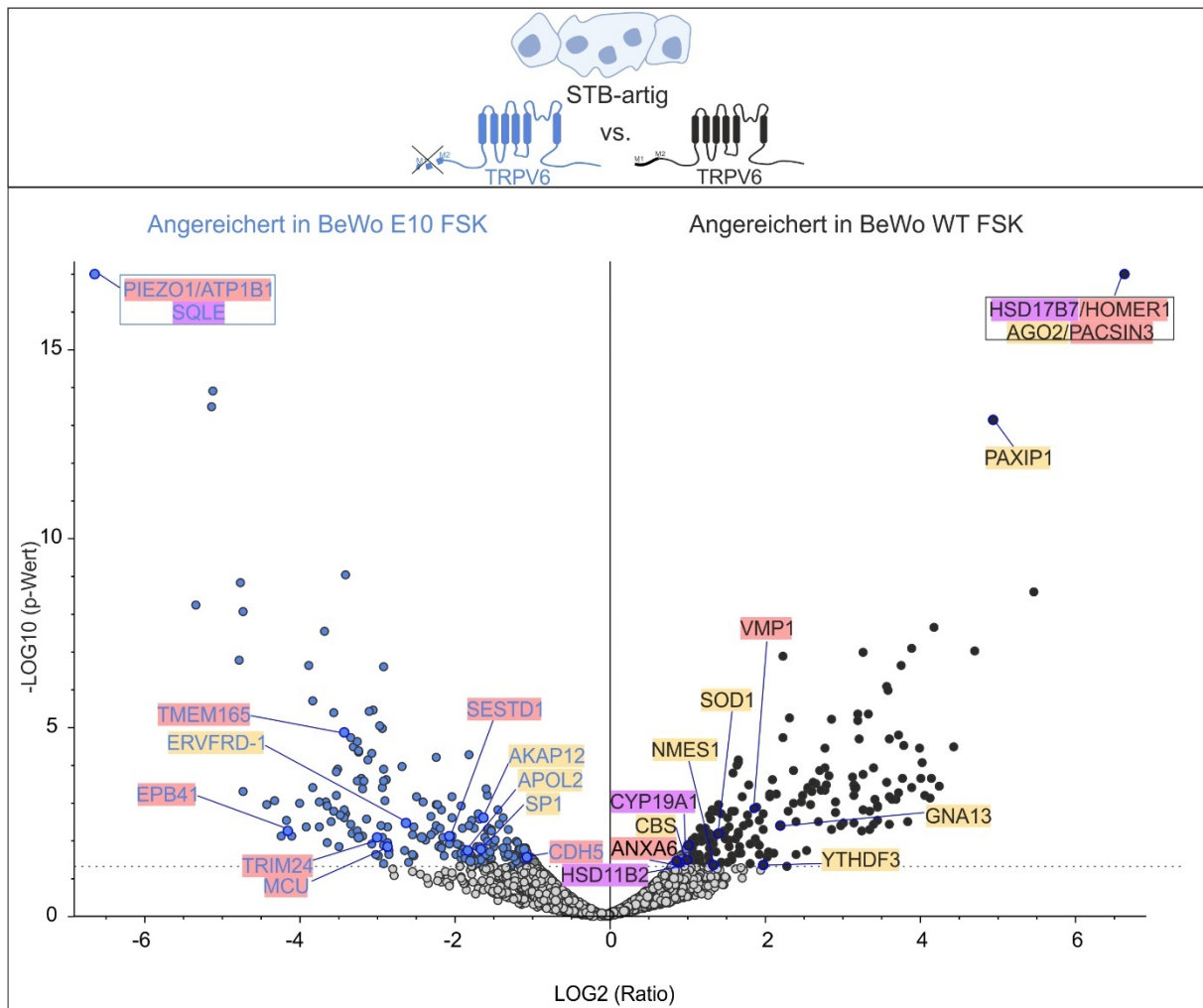


Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse von Lysaten aus FSK-behandelten BeWo-Wildtypzellen (rechts) und BeWo TRPV6-überexprimierenden Zellen E10 (links), dargestellt als Vulcano-Blot auf Basis eines ungepaarten t-Tests der proteinspezifischen Abundanz-Verhältnisse der Vorläuferionen. Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Maximaler p-Wert = $1,0e-17$, Maximale Abundance ratio = 100, $n=3$; x-Achse = binärer Logarithmus (Abundanz WT/Abundanz E10); y-Achse = negativer dekadischer Logarithmus (P-Wert); blaue Datenpunkte = angereichert in BeWo E10 FSK Lysaten, schwarze Datenpunkte = angereichert in BeWo-Wildtyp FSK Lysaten, graue Datenpunkte = kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen BeWo E10 und Wildtyp-Lysaten. Hervorhebung von Proteinen des Calciumionen-Transfer/Homöostase (rot), der Plazentaentwicklung/ Schwangerschaftsrelevanter Funktion (gelb) und des Steroidhormon-/Cholesterol- Metabolismus/Synthese/Sekretion (lila)

Mehrere Proteine der Calciumhomöostase (TPT1, UBSASH3B, UBQLN1), der Steroidhormon-Synthese und Sekretion (HSD17B1, CHCR7, CHCR24, SCP2, CYP51A1, ABCBD3) und relevante Proteine in der Schwangerschaft (MED1, KRT19, MAP2K1, ALPG) zeigen nach Behandlung mit FSK keine signifikant unterschiedliche Expression mehr zwischen der Wildtyp und der TRPV6-überexprimierenden Zelllinie E10. Andere Proteine (PKD1, GSTM2, RAP1GDS1, KDM5B, STK3) können nach der Zellfusion nicht mehr in der TRPV6-exprimierenden Zelllinien detektiert werden, sodass diese möglicherweise nur in Zytotrophoblasten gebildet werden.

Die Aromatase ist in allen Vergleichsanalysen mit Ausnahme der FSK-behandelten Wildtyp- und Knockoutzellen im TRPV6-Wildtyp stärker exprimiert, auch im Vergleich zum FSK-behandelten E10-Klon. Dies deutet darauf hin, dass eine Interaktion oder wechselseitige Beeinflussung der Proteinsynthese von TRPV6 und Aromatase bestehen könnte. HSD11B2 und HSD17B7 sind ebenfalls im FSK-behandelten Wildtyp gegenüber E10 signifikant angereichert, wie zuvor im Vergleich zum Knockout (3.12.1.2). Schwangerschaftsrelevante Proteine wie AGO2, PAXIP1 und CBS sind im BeWo-Wildtyp im Vergleich zu D10 und E10 durchgängig signifikant angereichert. SOD1, das unter DMSO-Bedingung eine höhere Expression in E10 zeigte (3.12.2.1), ist nach FSK-Behandlung im Wildtyp angereichert. Auch die mit Plazentadifferenzierung bzw. Trophoblastenmigration assoziierten Proteine GNA13 [238] und YTHDF3 [239] werden im Wildtyp mit höherer Abundanz detektiert als im TRPV6-überexprimierenden Klon E10. Die mit der Calciumhomöostase-assoziierten Proteine HOMER1 und VMP1 sind im Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Wildtyp durchgängig stärker exprimiert als in D10 und E10. Auch ANXA6 und PACSIN3 zeigen nach FSK-Behandlung ein entsprechendes Muster mit höherer Expression im Wildtyp.

In den TRPV6-überexprimierenden, Synzytiotrophoblast-artigen E10-Zellen werden auch mehrere Proteine der Calciumhomöostase verstärkt exprimiert, darunter TRIM24, PIEZO1, ATP1B1 (Na⁺/K⁺-ATPase-Untereinheit β 1) [240], TMEM165 (putative divalente Kationen/Protonen-Antiporter) [241] sowie SESTD1, EPB41 (Protein 4.1) [242], Cadherin 5 [243] und MCU (mitochondriales Calciumaufnahme-Protein) [244]. Auch die Squalen-Monooxygenase (SQLE), ein Schlüsselenzym der Steroidhormonsynthese, ist in E10 signifikant angereichert. Zudem zeigen in E10 verschiedene schwangerschaftsassoziierte Proteine eine höhere Abundanz als im Wildtyp, darunter AKAP12, APOL2 (Apolipoprotein L2) [245], Syncytin-2 [246] und SP1 (Transcription factor Sp1) [76].

Abschließend zeigen nur wenige Proteine ähnliche Expressionsunterschiede zwischen Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen beim Vergleich von Wildtyp

und TRPV6-Überexpressionsmutante. In der E10-Mutante sind Proteine der Calciumhomöostase, und drei bekannte Synzytialsierungsmarker stärker exprimiert. Im Wildtyp dominierten schwangerschaftsrelevante Proteine, besonders auffällig war hier erneut die höhere Expression der Aromatase.

3.12.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der vier Proteomanalysen von Zyto- und Synzytiotrophoblast-artigen Wildtypzellen und CRISPR/Cas9-Mutanten D10 und E10

In Anbetracht der signifikanten Expressionsunterschiede zahlreicher Proteine, die in mehreren Vergleichsanalysen identifiziert wurden, erfolgt eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der vier durchgeführten Analysen in tabellarischer Form. Diese Darstellung bietet einen systematischen Überblick über die Expressionsmuster der einzelnen Proteine, wobei eine funktionelle Klassifizierung bezüglich der Calciumhomöostase (Tab. 3), der Steroidhormonsynthese/sekretion (Tab. 4) und der Schwangerschaftsrelevanz (Tab. 5) vorgenommen wird (2.2.8).

Tabelle 3: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen der Calciumhomöostase und des Transfers. Tabellarische Darstellung der signifikant differenziell (Zweistichproben-t-Test mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$) exprimierten Proteine. Angabe des Klons in dem das Protein in der jeweiligen Vergleichsanalyse abundanter war, BeWo-Zellwildtyp in schwarz (WT), BeWo CRISPR/Cas9 TRPV6-Knockoutmutante D10 in rot (D10) und BeWo CRISPR/Cas9 TRPV6-überexprimierende Mutante E10 in blau. Kein signifikanter Unterschied in der jeweiligen Vergleichsanalyse: =, nicht in Vergleichsanalyse detektiert: n.d.

Genname	WT DMSO vs. D10 DMSO	WT FSK vs. D10 FSK	WT DMSO vs. E10 DMSO	WT FSK vs. E10 FSK
TRIM24	WT	=	WT	E10
S100A14	WT	n.d.	n.d.	n.d.
GRAMD2A	WT	n.d.	n.d.	n.d.
CD55	WT	WT	=	=
ITPR3	WT	=	=	=
MICU1	D10	n.d.	n.d.	n.d.
SESTD1	D10	=	E10	E10

SPG11	D10	=	n.d.	n.d.
ANXA6	D10	D10	=	WT
UBASH3B	D10	=	E10	=
LGALS3	D10	=	=	=
ITGAV	D10	D10	=	=
RAP1GDS1	D10	n.d.	E10	n.d.
CLN3	D10	n.d.	n.d.	n.d.
PDPK1	D10	n.d.	n.d.	n.d.
PLCG1	=	WT	n.d.	=
CAMK2G	=	WT	=	=
HOMER1	=	WT	=	WT
VMP1	=	WT	=	WT
TMEM165	=	=	=	E10
PACSIN3	=	D10	=	WT
GPR32	n.d.	D10	n.d.	=
DIAPH1	=	D10	=	=
ATP2B1	n.d.	D10	n.d.	n.d.
ATP2B3	n.d.	D10	n.d.	n.d.
GSTM2	=	D10	WT	n.d.
HTT	=	D10	E10	WT
TPT1	=	=	WT	=
MCU	=	=	=	E10
PKD1	n.d.	n.d.	WT	n.d.
CDH5	=	=	=	E10

UBQLN1	=	=	E10	=
PIEZO1	=	D10	=	E10
ATP1B1	n.d.	n.d.	=	E10

Mehrere Proteine der Calciumhomöostase und des Transfers werden ausschließlich oder signifikant angereichert im TRPV6-Knockoutklon nachgewiesen. Die Expressionsunterschiede werden auf Zytotrophoblast-artiger (MICU1, SPG11, LGALS3, CLN3, PDPK1), Synzytiotrophoblast-artiger (GPR32, DIAPH1, ATP2B1 und B3) sowie auf beiden Zellebenen (ITGAV) beobachtet. PIEZO1 wird in FSK-stimulierten TRPV6-Knockoutzellen sowie in der TRPV6-überexprimierenden Mutante E10 stärker exprimiert als im Wildtyp. Auch SESTD1 ist in DMSO- und FSK-behandelten D10- und E10-Zellen jeweils gegenüber dem entsprechenden Wildtyp signifikant angereichert. VMP1 zeigt hingegen eine höhere Expression im FSK-stimulierten Wildtyp im Vergleich zu beiden Mutanten. PACSIN3 ist jeweils in dem Klon abundanter, der im Vergleich weniger TRPV6 exprimiert.

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen der Steroidhormonsynthese und Sekretion. Legende siehe Tabelle 3

Genname	WT DMSO vs. D10 DMSO	WT FSK vs. D10 FSK	WT DMSO vs. E10 DMSO	WT FSK vs. E10 FSK
ANXA1	WT	D10	=	=
DHCR24	WT	n.d.	E10	=
HSD11B2	WT	WT	=	WT
CYP19A1	WT	=	WT	WT
GNAI1	WT	WT	=	=
AFP	WT	=	=	=
DHCR7	D10	=	E10	=
COMT	D10	=	=	n.d.
ESRRA	D10	n.d.	n.d.	=
FDX1	D10	=	=	=
STAT5B	n.d.	WT	n.d.	n.d.
AKR1B1	=	WT	=	=
STS	=	WT	=	=
INHA	n.d.	D10	n.d.	n.d.
DAB2	=	D10	=	n.d.
HSD17B1	=	=	WT	=
SCP2	=	=	E10	=
ACBD3	=	=	E10	=
CYP51A1	=	=	E10	=

HSD17B7	=	WT	n.d	WT
SQLE	=	n.d	=	E10

GNAI1 wird nur in Anwesenheit von TRPV6 exprimiert, zeigt jedoch keinen Unterschied zwischen Wildtyp und E10. Auch AKR1B1 und STS werden in Synzytiotrophoblast-artigen Zellen reduziert gebildet, wenn TRPV6 fehlt. DHCR24, SCP2, ACBD3 und CYP51A1 zeigen in Zytotrophoblast-artigen Zellen eine mit zunehmender TRPV6-Expression steigende Abundanz. HSD11B2 und HSD17B7 werden in FSK-behandelten Wildtypzellen stärker exprimiert als in D10 und E10. Auch CYP19A1 ist in drei von vier Vergleichsanalysen abundanter im Wildtyp. DHCR7 ist in beiden DMSO-behandelten CRISPR/Cas9-Mutanten höher exprimiert als im Wildtyp. COMT, ESRRA und FDX sind im Knockout in Zytotrophoblast-artigen, INHA und DAB2 in Synzytiotrophoblast-artigen Zellen angereichert.

Tabelle 5: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT DMSO vs. D10 DMSO, WT DMSO vs. E10 DMSO) und Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen (WT FSK vs. D10 FSK, WT FSK vs. E10 FSK). Auflistung von Proteinen die im Zusammenhang mit der Schwangerschaft erwähnt werden. Legende siehe Tabelle 3

Genname	WT DMSO vs. D10 DMSO	WT FSK vs. D10 FSK	WT DMSO vs. E10 DMSO	WT FSK vs. E10 FSK
GDF15	WT	WT	=	=
NR2F2	WT	n.d.	n.d.	n.d.
CBS	WT	WT	=	WT
MAGED2	WT	=	=	=
PAXIP1	=	WT	n.d.	WT
MBD3	=	WT	=	=
DNAJB6	=	WT	=	=
AGO2	=	WT	=	WT
BMPR2	n.d	D10	n.d.	n.d.
MED1	=	D10	WT	=

SP1	=	=	=	E10.
MAP3K4	=	D10	=	n.d.
DLX3	=	D10	n.d.	n.d.
NCOA3	D10	=	WT	=.
PIK3R1	=	n.d.	WT	=
STK3	=	=	WT	n.d.
KRT19	=	=	WT	=
MAP2K1	=	=	E10	=
ALPG	=	=	E10	=
SOD1	=	=	E10	WT
GNA13	=	=	=	WT
YTHDF3	=	=	=	WT
APOL	=	=	=	E10
ERVFRD-1	n.d.	n.d.	n.d.	E10
AKAP12	=	D10	=	E10
SDC1	WT	=	=	=
COX7C	=	D10	=	=

Eine erhöhte GDF15-Synthese scheint in Zyto- und Synzytiotrophoblast-artigen Zellen an das Vorhandensein von TRPV6 gekoppelt zu sein. Auch NR2F2 und MAGED2 zeigen eine TRPV6-abhängige Expression in Zytotrophoblast-artigen Zellen, jedoch ohne Zunahme bei Überexpression. CBS ist in drei von vier Vergleichsanalysen im Wildtyp stärker exprimiert. Gleiches gilt für PAXIP1 und AGO2 auf synzytiotrophoblastärer Ebene. MBD3 und DNAJB6 werden in Synzytiotrophoblast-artigen Zellen nur bei vorhandener TRPV6-Expression angereichert nachgewiesen, während NCOA3 in Zytotrophoblast-artigen Klonen jeweils stärker exprimiert wird, wenn weniger TRPV6 vorhanden ist. PIK3R1, STK3 und KRT19 sind im Wildtyp, MAP2K1 und ALPG hingegen in DMSO-behandelten E10-Zellen angereichert. GNA13 und YTHDF3 zeigen im fusionierten Wildtyp eine erhöhte Expression im Vergleich zur TRPV6-überexprimierenden Mutante E10, wohingegen APOL2 und ERVFRD-1 ein

gegenläufiges Expressionsprofil aufweisen. AKAP12 wird in fusionierten Zellen mehr in den beiden Mutanten gebildet, während BMPR2, MAP3K4 und DLX3 im FSK-behandelten Knockoutklon D10 signifikant erhöht sind.

4. Diskussion

4.1 Etablierung klonaler Chorionkarzinom-Zelllinien mit variierender TRPV6-Expression

Als hormonaktive und transportvermittelnde Schnittstelle zwischen Mutter und Fetus übernimmt der aus fusionierten Zytotrophoblasten gebildete Synzytiotrophoblast zentrale Aufgaben im Stoffaustausch während der Schwangerschaft [247]. Im Kontext der Nährstoffversorgung des Fetus hat sich gezeigt, dass der Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) Kanal, der in den plazentaren Trophoblasten exprimiert wird [248], eine wesentliche Rolle beim Calciumtransport spielt [52]. Dies wird unter anderem durch die Assoziation von Mutationen im *TRPV6*-Gen mit dem Krankheitsbild des transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus belegt [50, 53-55, 179]. Um die Funktion von TRPV6 in der Plazenta weiterführend zu charakterisieren, wurde der Einfluss eines TRPV6-Überschusses und -Defizits untersucht, die mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung in der BeWo-Zelllinie erzeugt wurden. Diese aus einem humanen Chorionkarzinom stammende Zelllinie weist wesentliche trophoblastenspezifische Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Synzytialisierung und Hormonproduktion [249] auf und zeigt zudem eine geringe endogene TRPV6-Expression, die jedoch unter der Expression in der Plazenta liegt [180]. Daher wurden drei BeWo-Zellklone im Rahmen dieser Arbeit auf funktionelle Unterschiede hin untersucht: die BeWo-Wildtypzelllinie sowie die daraus entstandenen Mutationszelllinien D10 und E10. Aufgrund der geringen endogenen Expression von TRPV6 war es notwendig, die TRPV6-Menge durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen TRPV6-Antikörper anzureichern (2.2.6.4). Die anschließende Detektion von TRPV6 mittels Western Blot (2.2.6.6) und massenspektrometrischer Analyse (2.2.7) bestätigte die Sequenzierungsdaten. Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde [179, 249], ließ sich im BeWo-Wildtyp nach Anreicherung durch Immunpräzipitation eine geringe Menge an TRPV6 nachweisen. Darüber hinaus wurden zwei klonale Zelllinien etabliert: D10 als TRPV6-Knockoutklon sowie E10 als überexprimierender Klon, der im Vergleich zum Wildtyp ein verkürztes TRPV6-Protein ohne N-Terminus bildet (3.2, 3.3). Auch nach Induktion der BeWo-Zell-Synzytialisierung mit Forskolin (FSK) zur Bildung von Synzytiotrophoblast-artigen BeWo-Zellen blieb das Quantifizierungsprofil unverändert, sodass nicht davon auszugehen ist, dass der Prozess der Synzytialisierung einen Einfluss auf die TRPV6-Expressionsmenge hat.

4.2 Einfluss differenzieller TRPV6 Expression auf die Morphologie und das Wachstum von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen

Die Plazenta ist ein invasiv wachsendes Organ, deren Funktionalität stark von einer adäquaten Zellproliferation abhängt. Daher wurde zunächst untersucht, ob eine Erhöhung oder der

Verlust der TRPV6-Expression in den Zellklonen einen Einfluss auf die Zellmorphologie hat. Zu diesem Zweck wurden vergleichbare Zellmengen pro Klon 24h lang in regulärem Zellkulturmedium inkubiert, anschließend mittels Pappenheim-Färbung behandelt und mikroskopisch analysiert (2.2.1.4). Dabei wurden die Zellmorphologie und die Konfluenz der verschiedenen Klone überprüft. Die TRPV6-Knockoutzellen (D10) wiesen eine höhere Konfluenz auf, was auf eine schnellere Proliferationsrate hindeutet, und erschienen kleiner im Vergleich zu den Zellen der TRPV6-exprimierenden Klone (WT und E10) (3.5). Um diese Beobachtungen quantitativ zu verifizieren, wurden die Klone mit DAPI gefärbt, um die Zellkerngrößen zu messen. Auch hier zeigte sich, dass die TRPV6-Knockoutzellen signifikant kleinere Zellkerne bildeten als die anderen BeWo-Zellklone (3.7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Knockout von TRPV6 einen Einfluss auf die Morphologie einzelner Organellen in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen haben könnte. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen im Mausmodell, in dem eine veränderte Morphologie sowohl muriner Trophoblasten als auch der murinen Plazenta selbst als Reaktion auf den TRPV6-Knockout festgestellt wurde [51].

Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der BeWo-Zellen in calciumreduziertem Medium zu einer verringerten Proliferationsrate und einer spindelförmigen Zellmorphologie als Reaktion auf die reduzierte extrazelluläre Calciumkonzentration [180]. Da jedoch neben TRPV6 auch andere Calciumtransporter und -kanäle, wie intrazelluläre Store-operated Channels (SOC) und Ca^{2+} -ATPasen, an der Calciumaufnahme und Homöostase in Trophoblasten beteiligt sind, könnte diese Beobachtung nicht ausschließlich auf eine Reduktion der TRPV6-gesteuerten Calciumaufnahme zurückzuführen sein. Diese Annahme wird durch Beobachtungen an murinen TRPV6-defizienten primären Trophoblasten gestützt, bei denen der Erhalt der Proliferationsfähigkeit auf eine funktionelle Kompensation der verringerten extrazellulären Calciumkonzentration hinweist [51]. Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung von BeWo TRPV6-Knockoutzellen und von BeWo-Zellen, die unter reduziertem extrazellulärem Calcium inkubiert wurden, müssen sich daher nicht zwangsläufig widersprechen.

4.3 Die TRPV6-Defizienz reduziert die intrazelluläre Calciumkonzentration in BeWo-Zellen

Um die relativen Unterschiede in den intrazellulären Calciumkonzentrationen zu bestimmen, wurde der Quotient der Fura-2 Fluoreszenz bei 340nm und 380nm berechnet, nachdem die verschiedenen Zellklone mit dem Calcium-sensitiven Fluorophor beladen und in einer calciumhaltigen Ringerlösung vermessen wurden (2.2.4). Die Ergebnisse zeigten, dass die Fura-2 Ratio im TRPV6-Knockoutklon D10 um 10% geringer war als im BeWo-Zellwildtyp und um 13% geringer als in der TRPV6-überexprimierenden Mutante E10. Die Messungen wurden

unter Verwendung einer Standard-Ringerlösung mit 1mM extrazellulärem Calcium durchgeführt (2.1.5), unter der typischerweise eine zytosolische Calcium-Ruhekonzentration im Bereich von etwa 50 bis 150nM vorliegt. Dieser Konzentrationsbereich entspricht dem linearen Anwendungsbereich der Fura-2 Ratio, sodass die beobachteten relativen Unterschiede als proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration interpretiert werden können, auch wenn keine absolute Kalibrierung durchgeführt wurde. Beide Unterschiede in der Calciumkonzentration im Vergleich zum Knockoutklon waren statistisch signifikant, während dies für den Vergleich zwischen den TRPV6-exprimierenden Klonen (WT und E10) nicht der Fall war (3.8). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der TRPV6-Knockout die basale Calciumkonzentration in BeWo-Zellen reduziert, während eine Überexpression des Calciumkanals keinen signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums bewirkt. Auch in diesem Fall korrelieren die Ergebnisse der TRPV6-Knockout BeWo-Zelllinie mit den Beobachtungen im murinen Modell, da auch primäre Trpv6-defiziente Maustrophoblasten ohne funktionelles Trpv6 eine verminderte Calciumaufnahme zeigen [52]. Angesichts der Rolle von TRPV6 in der Calciumhomöostase plazentarer Trophoblasten und der Tatsache, dass Mutationen in beiden Trpv6-Allelen bei Mäusen zu unzureichendem Embryowachstum, reduzierter Knochen-Calcifizierung und Dysplasien führen [52], sowie zu ähnlichen Knochenphänotypen beim Menschen mit TRPV6-Mutations-assoziiertem transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus [50], könnte dieser marginale Unterschied im endogenen Kontext potenziell pathophysiologische Relevanz besitzen.

4.4 TRPV6 hat keinen Einfluss auf die Synzytialisierungsfähigkeit von BeWo-Zellen

Die Inkubation von BeWo-Zellen mit FSK, einem Aktivator des Adenylatzyklase-PKA-Signalwegs, stellt eine etablierte Methode dar, um die Synzytialisierung und die damit verbundene Bildung von mehrkernigen, Synzytiotrophoblast-artigen Zellen zu induzieren [250, 251]. Die Visualisierung dieses Prozesses kann durch immunologische Färbung des Tight Junction-Proteins ZO-1 erfolgen. Dessen zunächst parazelluläre Lokalisation, die sich in einem kopfsteinpflasterartigen Zellmosaik äußert, verlagert sich infolge der Zellfusion in eine intrazelluläre Anordnung (3.6, Abb. 15). Diese Veränderungen kennzeichnen die Bildung von Synzytien, die durch den Verlust durchgängiger Zellgrenzen und die Bildung von Zellverbänden charakterisiert sind. Zur Quantifizierung der Zellfusion wurde der Fusionsindex ermittelt, indem die Anzahl der Zellkerne in den Synzytien im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne in den DMSO- und FSK-behandelten Zellklonen gezählt wurde (2.2.3.1). Der Vergleich der Fusionsindizes ergab, dass alle drei Zelllinien auf die FSK-Behandlung mit einem signifikanten Fusionsanstieg reagierten, was darauf hindeutet, dass die Synzytialisierung in allen drei Klonen induzierbar war. Bei dem Vergleich des Ausmaßes der

Zellfusion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klonen was impliziert, dass die Menge von TRPV6 in BeWo-Zellen keinen Einfluss auf deren Fähigkeit zur Synzytialisierung hat (3.6).

Um den allgemeinen Einfluss von Calcium auf die Synzytialisierung zu untersuchen, wurden BeWo-Wildtypzellen in einem Medium mit einer um ein Drittel reduzierten Calciumkonzentration inkubiert (2.2.1.2). Diese Zellen wurden dann mit solchen verglichen, die in einem regulären Medium inkubiert wurden, wobei der Fusionsindex auch hier als Maß für die Synzytialisierung herangezogen wurde. Es wurde daher der Einfluss von Veränderungen des extrazellulären Calciumlevels analysiert, absolute Konzentrationswerte miteinander verglichen und eine Abhängigkeit des Synzytialisierungsprozesses von Calcium in BeWo-Zellen festgestellt (3.1.1), die durch die massenspektrometrische Identifikation von Markerproteinen der Synzytialisierung, deren Expression sich in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration signifikant unterschied, bestätigt wurde (3.1.2) [180] (Abb. 32).

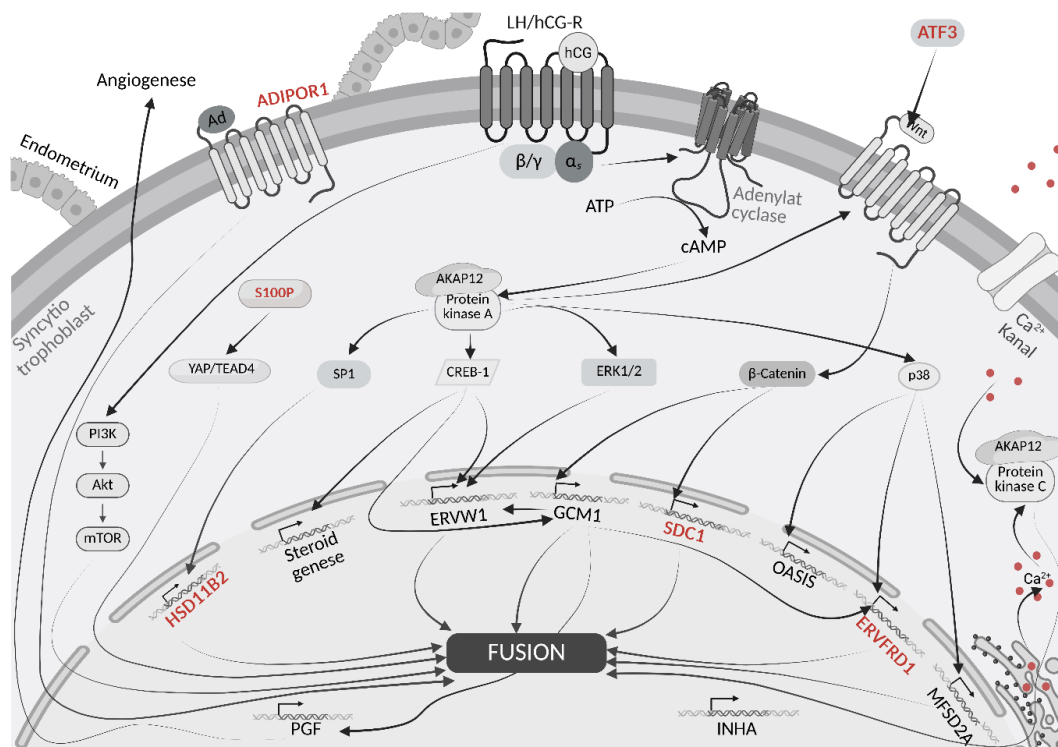


Abbildung 32: Modell möglicher Signalwege, die teilweise durch hCG stimuliert werden und die Synthese von Proteinen mit zellfusionsaktivierenden Eigenschaften induzieren, modifiziert nach Gehl et al. 2025. ADIPOR1= Adiponectin Rezeptor Protein 1, S100P= Protein S100-P, YAP= Transkriptionsaktivator YAP1, TEAD4= Transcriptions enhancer Faktor TEF-3, HSD11B2= 11-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2, PI3K= Phosphoinositid-3-Kinase, Akt= Proteinkinase, mTor= mechanistic target of rapamycin, LH/hCG-R= Luteinisierendes Hormon und humanes Choriongonadotropin Rezeptor, ATF3= Proteinaktivierender Transkriptionsfaktor 3, AKAP12= A-kinase anchor protein 12, SP1= Transkriptionsfaktor SP1, CREB1= Cyclic AMP-responsive element-Bindeprotein1, ERVW1= Syncytin-1, ERK= Extrazellulärsignal regulierte Kinase, GCM1= Chorionspezifischer Transkriptionsfaktor 1, SDC1= Syndecan 1, OASIS= Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 1, ERVFRD-1= Syncytin-2, p38=p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase, MFSD2A= Sodium-dependent lysophosphatidylcholine symporter 1, INHA= Inhibin alpha chain, PGF= Plazentarer Wachstumsfaktor. Rote Gennamen = calciumabhängig in Gehl et al. 2025 detektiert

Hierbei erfolgte jedoch keine Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentrationen in BeWo-Zellen, die in Medien mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen kultiviert wurden. Daher kann, im Gegensatz zum untersuchten TRPV6-Knockoutklon, nicht angenommen werden, dass auch in diesen Zellen die intrazelluläre Calciumkonzentration reduziert ist.

Im Vergleich zum BeWo-Zellwildtyp zeigte der TRPV6-Knockoutklon eine moderate Reduktion der Fura-2 Ratio um 10%, was auf eine entsprechend verringerte relative intrazelluläre Calciumkonzentration hinweist (Abb. 3.8). Das extrazelluläre Calciumlevel im Medium blieb dabei unverändert. Auf Proteomebene zeigte sich, dass der calciumabhängige Synzytialisierungsmarker HSD11B2 im Synzytiotrophoblast-artigen Wildtyp stärker exprimiert

wurde als im Knockout. Zudem wurde das calciumabhängig gebildete Synzytin-2 (ERVFRD-1) im TRPV6-überexprimierenden Klon E10 angereichert detektiert (3.1). Trotz differentieller Expression dieser calciumabhängigen Marker in den klonalen BeWo-Zelllinien zeigte sich kein Einfluss auf deren Fusionsfähigkeit, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass neben diesen beiden Markern zahlreiche weitere Proteine an der Synzytialisierung beteiligt sind (Vgl. Abschnitt 3.1.2 und Abb. 10A), die in den Zellklonen nicht differentiell exprimiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die geringe Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration, wie sie im TRPV6-Knockout detektiert wurde, keinen signifikanten Einfluss auf die Synzytialisierung hat.

Die Beobachtungen dieser Arbeit legen folglich nahe, dass der Synzytialisierungsprozess selbst von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängt, da eine Reduktion dieser um 63% (von 0,94mM auf 0,35mM) mit einer verminderten Zellfusion einhergeht. Im Gegensatz dazu zeigte der TRPV6-Knockout, der unter denselben extrazellulären Calciumbedingungen wie der Wildtyp inkubiert wurde, zwar eine signifikante Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration, doch scheint diese moderate Abnahme nicht ausreichend zu sein, um den Synzytialisierungsprozess der BeWo-Zellen messbar zu beeinträchtigen. Eine kompensatorische Hochregulation alternativer Calciumkanäle im Transmembrantransport könnte im Knockout dazu beitragen, eine für die Synzytialisierung ausreichende intrazelluläre Calciumverfügbarkeit aufrechtzuerhalten.

4.5 Beurteilung des Einflusses einer TRPV6-Überexpression auf die parazelluläre Permeabilität von BeWo-Zellen

Zur Untersuchung der Permeabilitätseigenschaften der BeWo-Zellklone wurde für die Bestimmung des parazellulären Transports TRITC-Dextran und des para- und transzelluläre Transports FITC-Albumin als fluorochrome Referenzsubstanzen verwendet und der Permeabilitätsfaktor bestimmt (2.2.1.6). Dabei wurde ein reduzierter parazellulärer Transfer von Dextran über die Monoschicht der TRPV6-überexprimierenden E10-Zellen im Vergleich zum niedrig exprimierenden Wildtyp und dem TRPV6-Knockout festgestellt (3.9). Frühere Untersuchungen an BeWo-Zellen haben gezeigt, dass die Serinprotease HTRA4 bei niedrigen extrazellulären Calciumkonzentrationen verstärkt exprimiert wird [252]. In HUVEC-Zellen führte diese Überexpression zu einer erhöhten Degradation von Zellkontakt-assoziierten Proteinen, wie Cadherinen und Cateninen [253, 254]. Im Zusammenhang mit Trpv6 zeigte der Knockout des Kanals in murinen Plazenten eine verstärkte Bildung einer weiteren Serinprotease HTRA1, die für die Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix verantwortlich ist [51]. Diese Ergebnisse deuten auf einen potenziellen Einfluss von TRPV6

auf plazentare Proteasen hin, was wiederum die Bildung der extrazellulären Matrix, die Zellintegrität der Plazenta und damit einhergehend die Permeabilitätseigenschaften von BeWo-Zellen beeinflussen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden morphologische Unterschiede zwischen dem TRPV6-Knockoutklon D10 und dem BeWo-Wildtyp festgestellt, was eine differenzielle Ausbildung der extrazellulären Matrix und der Zellintegrität nicht ausschließt. Allerdings ergab die Proteomanalyse keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression genannter Proteasen oder Zell-Zell-Kontakt Proteine, und auch der trans- und parazelluläre Transport zeigte keine Abweichungen. Die E10-Mutante wies tatsächlich Unterschiede in der parazellulären Transportfähigkeit im Gegensatz zum Wildtyp auf, jedoch konnten hier weder morphologische Unterschiede noch eine differenzielle Expression von Tight Junction-Proteinen oder den für deren Degradation verantwortlichen Serinproteasen festgestellt werden. Diese Analysen erklären daher nicht die Unterschiede im parazellulären Transport. Es ist möglich, dass diese Ergebnisse auf die Komplexität und Variabilität des methodischen Arbeitsablaufs oder auf klonale Effekte im Rahmen der CRISPR/Cas9-Genomeditierung zurückzuführen sind. Folglich lässt sich im Rahmen dieser Arbeit schlussfolgern, dass die beobachteten Unterschiede in der Permeabilität nicht zwangsläufig mit der Expressionsmenge des TRPV6-Kanals korrelieren.

4.6 Der TRPV6-Knockout und Knockdown reduziert die Sekretion von hCG, Progesteron und Estradiol von Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen

In der Plazenta übernehmen die Synzytiotrophoblasten eine entscheidende Rolle, indem sie nicht nur als feto-maternale Kontaktzellschicht fungieren, sondern auch als endokrine Einheit agieren [59, 255]. Sie produzieren unter anderem das humane Choriogonadotropin (hCG) sowie die Steroidhormone Progesteron und Estradiol, wobei die Konzentrationen dieser Hormone während der Schwangerschaft variieren, da sie unterschiedliche, gestationsaltersabhängige Signalwege aktivieren. Die Steroidhormonsekretion kann durch den lipophilen Charakter der Hormone durch passive Diffusion und möglicherweise durch vesikulären Transport erfolgen [256, 257], während hCG die Trophoblasten durch calciumabhängige Exozytose verlässt [258, 259]. Im Rahmen eines hormonellen Regelkreises kann hCG zudem die Steroidhormonsynthese über den G-Protein gekoppelten LH-hCG Rezeptor aktivierten Adenylatzyklase/PKA/CREB-1-Signalweg induzieren [75, 260] (Abb.32). Vor diesem Hintergrund sollte der Einfluss des TRPV6-Knockouts auf die Sekretion dieser drei Hormone untersucht werden sollte.

Analog zum Vorgehen zur Untersuchung des Synzytialisierungsprozesses in BeWo-Zellen wurde zunächst überprüft ob alle Zellklone auf die Inkubation mit FSK, neben der Bildung von Synzytiotrophoblast-artigen Zellen, auch mit dem charakteristischen Anstieg von

schwangerschaftsrelevanten Hormonen reagieren [180, 261-263]. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass alle untersuchten BeWo-Zellklone auch in dieser funktionellen Charakterisierung signifikant auf FSK reagierten. Dies äußerte sich in einer erhöhten Sekretion von hCG und Progesteron im Überstand der Zellkultur. Diese Befunde bestätigen daher, dass alle drei Klone in der Lage sind, auf den Syzytialisierungsstimulus mit einer gesteigerten Produktion von Glykoprotein- und Steroidhormonen im Vergleich zu nicht-synzytialisierten Zellen des jeweiligen Klons zu reagieren. Die Estradiol-Konzentration stieg nach FSK-Behandlung im klonalen Vergleich jedoch nur im TRPV6-Knockoutklon D10 signifikant an (Abb.19, unten). Da jedoch in einem unabhängigen Experiment mit unterschiedlich calciuminkubierten BeWo-Wildtypzellen ein solcher Anstieg für Estradiol dokumentiert wurde (3.1.1, Abb. 9E) [180], könnte das Ausbleiben eines vergleichbaren Anstiegs im klonalen Hormonbestimmungsexperiment darauf zurückzuführen sein, dass Estradiol am Ende der Steroidhormonsynthese-Kaskade steht und seine Konzentration daher besonders anfällig für experimentelle Schwankungen ist.

Beim inter-klonalen Vergleich gleichartig behandelter Zellen zeigten sich jedoch Sekretionsunterschiede: Die DMSO-behandelten TRPV6-Knockoutzellen D10 wiesen eine Konzentration im Zellkulturüberstand von hCG, Progesteron und Estradiol auf, die mindestens 50% geringer war als die der Wildtypzellen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei BeWo-Zellen beobachtet, die durch siRNA-Transfektion eine signifikant reduzierte TRPV6-Expression aufwiesen. Die Ermittlung der TRPV6-reduktionsbedingten Störung der Hormonsekretionsfähigkeit von BeWo-Zellen war demnach unter Verwendung unterschiedlicher TRPV6-Suppressionsmethoden reproduzierbar. Ein Mangel oder das Fehlen von TRPV6 könnte demnach mit einer Dysfunktion der trophoblastischen Hormonsekretion einhergehen. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass hCG sowohl calciumabhängig gebildet (3.1.1) [180] als auch sekretiert (3.1.1.) [180, 258, 259] wird, sodass die Beobachtung einer verminderten TRPV6-Knockout-bedingten hCG-Sekretion, möglicherweise ein Resultat der marginal reduzierten intrazellulären Calciumkonzentration im Knockout und einer damit einhergehenden reduzierten Synthese und Exozytose ist. Obwohl die reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration im ZO-1 Immunfärbungsversuch keinen Einfluss auf die Synzytialisierungsfähigkeit hatte, könnten parallele intrazelluläre Signalwege, wie die des hormonellen Regelkreises, empfindlicher auf Veränderungen in der Calciumhomöostase reagieren. Die Sekretion und Synthese von Progesteron und Estradiol zeigten unter Reduktion der extrazellulären Calciumkonzentration keine Calciumabhängigkeit (3.1.1, Abb.9 D/E), wurden im klonalen Vergleich jedoch im geringeren Ausmaß im Zellkulturüberstand des TRPV6-Knockoutklon D10 detektiert (Abb. 21). Denkbar ist daher

entweder eine Beeinträchtigung intrazellulärer Calcium-Transferprozesse im TRPV6-Knockoutklon oder ein bislang nicht näher charakterisierter calciumunabhängiger Einfluss von TRPV6 auf die Synthese oder Sekretion der betreffenden Steroidhormone. Der Mangel an diesen Hormonen kann gravierende Konsequenzen für den Verlauf der Schwangerschaft haben. Niedrige Progesteron- und hCG-Spiegel sind in der Frühschwangerschaft mit höheren Fehlgeburtsraten assoziiert [264, 265], Estrogenmangel wird mit dem Auftreten von ektopischen Schwangerschaften [266, 267] und allen voran mit Präeklampsie in Verbindung gebracht, der weltweit häufigsten Ursachen für mütterliche und fetale Sterblichkeit [111]. Das Krankheitsbild der Präeklampsie ist durch placentare Hypoxie, eine Verringerung der uteroplazentaren Perfusion, einen progressiven Anstieg des Blutdrucks und durch signifikante Proteinurie (>300 mg/24h) gekennzeichnet [268]. Angesichts der bedeutenden Funktion von Estradiol bei der Sicherstellung der placentaren Durchblutung [269] erscheint ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Estradiolmangel und der Entwicklung einer Präeklampsie plausibel. Der mögliche Einfluss des TRPV6-Mangels auf die Synthese bzw. Sekretion der genannten schwangerschaftsrelevanten Hormone könnte somit mit diesen Erkrankungen in Verbindung stehen. Allerdings führte die erhöhte Expression von TRPV6, wie sie in den BeWo-E10-Zellen beobachtet wurde, nicht zu einem Anstieg der Steroidhormone im Zellkulturüberstand im Vergleich zum BeWo-Zellwildtyp. Der Einfluss von TRPV6 auf die Hormonsekretion könnte demnach möglicherweise eine Sättigungsgrenze erreichen. Der Hormonkonzentrationsvergleich in Zellkulturständen von Synzytiotrophoblast-artigen Zellklonen ergab, dass der TRPV6-Knockoutklon stets stärker auf die Aktivierung der Adenylatzyklase mit FSK reagierte, da die zuvor beobachteten Defizite beim Vergleich der DMSO behandelten Zytotrophoblast-artigen Zellen durch FSK-Inkubation der Zellen vollständig kompensiert werden konnten, sodass die Konzentrationen im Zellkulturüberstand nahezu gleich in allen stimulierten BeWo-Zellklonen waren. Die Unterschiede, die zwischen den unbehandelten BeWo-Zellen identifiziert wurden, entfielen daher nach FSK-Inkubation. Das könnte darin begründet liegen, dass mit der Zugabe von FSK in zelluläre Signalwege eingegriffen wird, die potenziell ebenfalls an der Steroidhormonsynthese und Sekretion beteiligt sind, sodass die identifizierte reduzierte Hormonsekretion im Knockout dadurch möglicherweise kompensiert wurde. Um die Schlussfolgerungen aus den Hormonkonzentrationsbestimmungen auf intrazellulärer Ebene zu validieren, wurde daher eine Proteomanalyse der entsprechend behandelten BeWo-Zelllysate durchgeführt. Diese Analyse verfolgte das Ziel zu prüfen, ob die beobachteten Unterschiede, die möglicherweise mit der TRPV6-Expression zusammenhängen, nicht ausschließlich auf einer reduzierten Hormonsekretion beruhen, sondern unter Umständen auch durch eine verminderte Synthese

der an der Hormonsynthese beteiligten Enzyme, oder im Fall von hCG durch eine gestörte Calciumhomöostase, mitverursacht sein könnten.

4.7 Einfluss des TRPV6-Knockouts auf die Expression von Proteinen der Calciumhomöostase in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen

In der Zytotrophoblast-artigen BeWo TRPV6-Knockoutmutante D10, wurden mehrere Proteine der Calciumhomöostase (MICU1, SESTD1, SPG11, ANXA6, UBASH3B, LGALS3, ITGAV, RAP1GDS1, CLN3, PDPK1) signifikant angereichert detektiert (3.11.1.1). Der mitochondriale Calciumsensor MICU1 [191] kann bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Zytosol die Pore des MCU-Kanals schließen, damit die mitochondriale Calciumaufnahme verhindern und die zytosolische Calciumkonzentration damit erhöhen [192] und das im Knockoutklon abundante SESTD1 gilt als Regulator der TRP-C Kanalaktivität [193]. Die Abwesenheit von Spatacsin (SPG11) stimuliert, in Abhängigkeit des Cholesterolgehalts der Plasmamembran, die Interaktion des Calciumsensor STIM1 mit dem Plasmamembran-Calciumkanal Orai1, was zum Import von extrazellulärem Calcium führt [194]. Das Calcium-Bindeprotein Annexin A6 (ANXA6) reduziert, wenn es an der Plasmamembran lokalisiert vorliegt, den Ca^{2+} -Einstrom und moduliert so ebenfalls den speichergesteuerten Calcium-Eintrag (SOCE) [195]. Die Aktivierung des SOCE wird durch einen Abfall der Calciumkonzentration im Lumen des endoplasmatischen Retikulums ausgelöst, der infolge der IP_3R -vermittelten Freisetzung von Calciumionen in das Zytosol entsteht. Die nachgeschaltete STIM1-induzierten Mechanismen leiten den Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum ein und füllen so die intrazellulären Speicher wieder auf [270, 271]. Dieser Mechanismus nimmt daher eine essenzielle Rolle in der Calciumhomöostase ein. Auch UBASH3B, der laut der Gene Ontology-Datenbanken ein potenzieller Mediator der Freisetzung von gebundenen Calciumionen in das Zytosol ist und Galnectin-3 (LGALS3), das den Ca^{2+} -Einstrom in verschiedenen Zelltypen moduliert [196] indem es z.B. in β -Zellen die spannungsgesteuerte Calciumkanal Auxiliary Subunit Gamma 1 (CACNG1) bindet [272], wurden in der TRPV6-Knockoutmutante D10 signifikant mehr gebildet. Darüber hinaus zeigten RAP1GDS1, ein GTPasen regulierender Faktor der die Calciumkonzentration im ER negativ und die in Mitochondrien positiv beeinflusst [197, 273-277] und als Reaktion auf Veränderungen in der Calciumkonzentration exprimiert werden kann, Battenin (CLN3P), dessen Fehlen mit einer Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase einhergeht [278, 279] sowie PDPK1, das den Ca^{2+} -Eintritt und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanälen reguliert [280] und die Freisetzung von gebundenen Calciumionen in das Zytosol positiv beeinflusst [198], eine stärkere Expression im TRPV6-Knockoutklon.

TRPV6 konnte bisher endogen nicht in der Plasmamembran lokalisiert und TRPV6-Ströme lediglich im Überexpressionsexperimenten gemessen werden, wenn beispielweise HEK293

Zellen zuvor in Ca^{2+} -freiem Medium inkubiert wurden [135, 281-283]. Jedoch wurde TRPV6 in der Literatur als ein entscheidender Faktor für den feto-maternalen Calciumtransport identifiziert [50, 54, 284-286]. Zudem deuten die Ergebnisse der Proteomanalyse darauf hin, dass der Knockout- von TRPV6 einen Einfluss auf den intrazellulären Calciumhaushalt in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen hat, da zum einen weniger basales zytosolisches Calcium in Calcium-Imaging-Experimente mit Fura-2 gemessen wurde, und der TRPV6-Knockout zudem zur kompensatorischen Hochregulation zahlreicher Proteine führte, die entweder das zytosolische Calciumlevel erhöhen oder am Transmembrantransfer von Calcium in intrazelluläre Organelle beteiligt sind. Die Aktivierung der Trophoblasten ist eng mit der Generierung von Calciumionen-Transienten verknüpft [287, 288]. Vor diesem Hintergrund könnte die beobachtete Reaktion auf den TRPV6-Knockout als Versuch eines zellulären Kompensationsmechanismus interpretiert werden, der darauf abzielt, die Trophoblast-ähnlichen Zellfunktionen und -merkmale aufrechtzuerhalten.

Auch nach Induktion der Synzytialisierung mittels FSK-bedingter Aktivierung der Adenylatzyklase änderte sich das Expressionsprofil von Proteinen der Calciumhomöostase (3.11.1.2). Abgesehen von ANXA6 zeigten die hochregulierten Proteine, die in DMSO-behandelten TRPV6-Knockoutzellen identifiziert wurden, nach der Zellfusion keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr und wurden durch andere differenziell gebildete Proteine der Calciumhomöostase ersetzt: 1) Neben der Kanalporenbildenden-Untereinheit des nicht-spezifischen Kationen Piezo Kanals (PIEZO1) [289], 2) dem Modulator der subzellulären TRPV4 Calciumkanallokalisation PACSIN3 [290], 3) dem G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR32, der laut Uniprot die zytosolische Calciumkonzentration positiv regulieren könnte, 4) dem primär in Kardiomyozyten als Regulator von Calciumkanälen des Ryanodin-Rezeptors bekannte GSTM2 [216], 5) DIAPH, das mit Polycystin 2 interagiert und sich so positiv auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung auswirken kann [217] und 6) dem ITP3R1 beeinflussenden Huntingtin [220] wurden auch 7) die Plasmamembran-Calcium-transportierenden ATPase -1 und 8) -3 nach Synzytialisierung stärker im TRPV6-Knockout gebildet. Die Anreicherung dieser regulatorischen Proteine der Calciumhomöostase könnte die Aufrechterhaltung der Synzytialisierungsfähigkeit durch potenzielle Generierung von Calcium Transienten im TRPV6-Knockout erklären, da neben dem calciumunabhängigen Synzytialisierungsmarker AKAP12 auch der calciumabhängige Marker COX7C (3.1) [180] stärker im Knockout gebildet wurde. Ob die nach FSK-Behandlung beobachteten kompensatorischen Hochregulationen modulierender Proteine der Calciumhomöostase tatsächlich zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration im TRPV6-Knockout geführt haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht systematisch untersucht. Folglich

kann der Erhalt calciumabhängiger trophoblastärer Funktionen wie der Synzytialisierung und der Hormonsynthese nach FSK Behandlung infolge dieser molekularen Anpassungsmechanismen lediglich hypothetisch angenommen werden.

4.8 Einfluss des TRPV6-Knockouts auf die Expression von Proteinen der Steroidhormonsynthese in Trophoblast-artigen BeWo-Zellen

Das Fehlen von TRPV6 führte nicht nur zu einer Modifikation des Expressionsprofils von Proteinen, die an der Calciumhomöostase beteiligt sind, sondern hatte auch signifikante Auswirkungen auf die Synthese von Proteinen, die für die Steroidhormonsynthese verantwortlich sind (3.12.1.1). Letztere stellt eine der zentralen Funktionen der plazentaren Trophoblasten dar und ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und die Unterstützung der fetalen Entwicklung. Die Enzyme der Steroidhormonsynthese und des Metabolismus DHCR7, FDX1 und COMT zeigten eine höhere Expression in Zytotrophoblast-artigen Zellen, die kein TRPV6 exprimierten. Der enzymatische Mechanismus von DHCR7 katalysiert die Reduktion des Vitamin-D3-Vorläufers 7-Dehydrocholesterol (7DHC) zu Cholesterol, dem zentralen Ausgangsstoff für die Steroidhormonsynthese. Die erhöhte Expression von DHCR7 in Zytotrophoblast-artigen Zellen könnte als Reaktion auf eine verminderte Sekretion von Steroidhormonen im TRPV6-Knockoutklon hochreguliert worden sein, um den Mangel an Steroidhormonen auszugleichen. Eine verstärkte Katalyse von 7DHC zu Cholesterol könnte jedoch potenziell nachteilige Auswirkungen auf die Synthese von Vitamin D3 haben. Auch Vitamin D3 und seine aktiven Metabolite erfüllen relevante Funktionen in der Plazenta, darunter die Induktion der Invasion extravillärer Trophoblasten sowie die Regulation der Hormonsynthese [291-293], sodass sich die Reduktion der Synthese nachteilig auf die embryonale Entwicklung auswirken würde. Auch das mitochondriale Adrenodoxin (FDX1), das die Elektronen von der Adrenodoxin Reduktase auf CYP11A1 transferiert und damit ein Teil der Pregnenolonsynthese ist [203], wurde in Zytotrophoblast-artigen TRPV6-Knockoutzellen hochreguliert, was ebenfalls kompensatorische Gründe haben könnte. Das würde implizieren, dass zwar größere Mengen des Progesteronvorläufers gebildet werden, da die Steroidhormonkonzentrationen im Zellkulturüberstand jedoch reduziert sind, scheint die Katalyse auf dieser Stufe im TRPV6-Knockout zu stagnieren. Zur Validierung dieser Hypothese wäre im Rahmen weiterführender Untersuchungen eine quantitative Analyse der Konzentration steroidogener Vorläufermetabolite im Zellkulturüberstand erforderlich. Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) katalysiert die Inaktivierung von Catecholestrogenen, darunter 2-Hydroxyestron und 4-Hydroxy-17 β -Estradiol. Es ist jedoch bekannt, dass erhöhte Estradiolkonzentrationen einen suppressiven Effekt auf die Genexpression von COMT ausüben können [294, 295]. In Anbetracht der Tatsache, dass im TRPV6-Knockoutklon die

Estradiolkonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert war, könnte das die erhöhte Expression des Estradiol-metabolisierenden Enzyms COMT erklären. Wie zuvor für die Proteine der Calciumhomöostase, die im TRPV6-Knockout angereichert waren, geschlussfolgert, führte das Fehlen von TRPV6 im DMSO-behandelten Klon D10 potenziell zum kompensatorischen Anstieg von Enzymen der Steroidhormon-Vorläufersynthese. Die Ergebnisse der Quantifizierung von Steroidhormonen im Zellkulturüberstand von Zytotrophoblast-artigen TRPV6-Knockout- und Wildtypzellen zeigte jedoch, dass das Defizit der Hormonbildung bzw. Sekretion in der Knockoutmutante D10 dadurch nicht ausgeglichen werden konnte.

Zudem zeigten mehrere Proteine, die an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt sind und mit schwangerschaftsassozierten Funktionen in Verbindung stehen im TRPV6-Knockoutklon D10, eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp (3.12.1.1). Diese unzureichende Proteinproduktion in TRPV6-defizienten Zytotrophoblast-artigen Zellen könnte potenziell die hormonelle Homöostase und die damit verbundenen physiologischen Prozesse während der Schwangerschaft beeinträchtigen. Zu den identifizierten Proteinen der Steroidhormonsynthese, die im TRPV6-Knockout signifikant weniger gebildet wurden als im Wildtyp zählten DHCR24, CYP19A1, HSD11B2, ANXA1, GNAI1 und AFP. In diesem Zusammenhang ist Annexin A1 (ANXA1) zu nennen, das eine regulatorische Rolle bei der Sekretion von Steroidhormonen spielt [296, 297]. Darüber hinaus beeinflussen GNAI1-Untereinheiten über die PKA/ERK1/2-Signalkaskade die Expression des Transkriptionsfaktors SREBP2, welcher wiederum als zentraler Regulator der de-novo-Cholesterinsynthese fungiert, indem er die Transkription von HMGCR und weiteren Genen der Cholesterinbiosynthese- und aufnahme steuert [186]. Beide Proteine könnten somit indirekt an der Regulation der hormonellen Steroidgenese beteiligt sein.

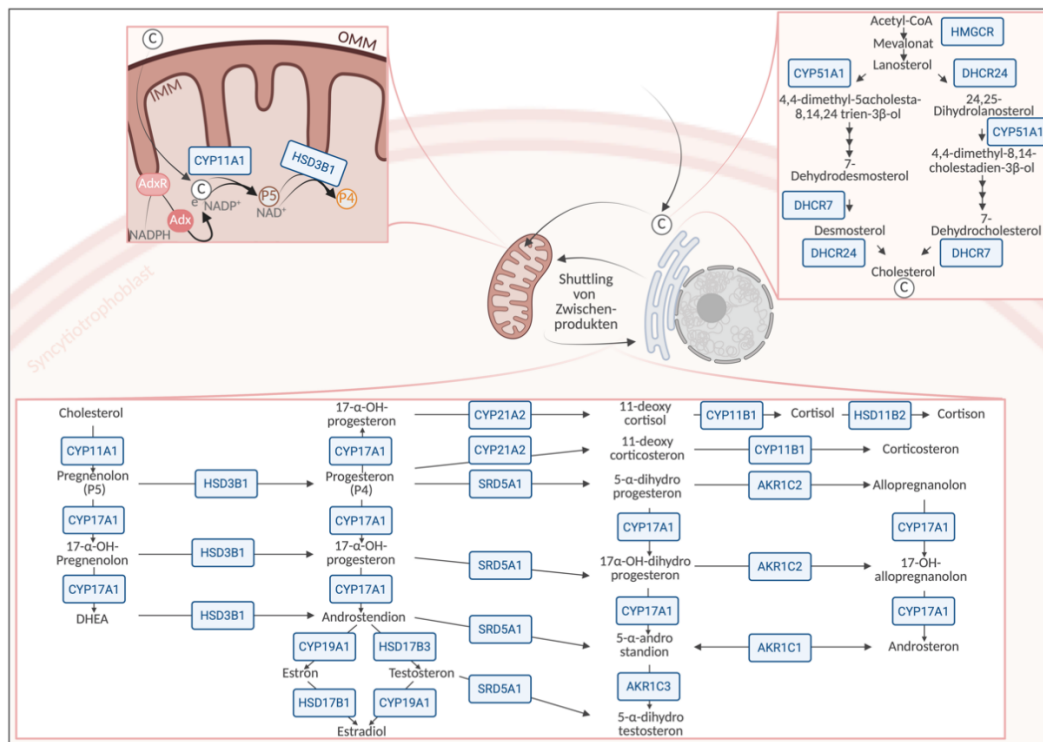


Abbildung 33: Modell der an der Synthese von Cholesterol und Steroidhormonen beteiligten Proteine, modifiziert nach Gehl et al. 2025. HMGCR= HMG-CoA Reduktase, DHCR24= Delta(24)-sterol Reduktase, CYP51A1= Lanosterol 14-alpha Demethylase, DHCR7= 7-dehydrocholesterol Reduktase, CYP11A1= mitochondriales Cholesterol side-chain cleavage Enzym, HSD3B1= 3 beta-hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta 5-->4-Isomerase Typ 1, CYP17A1= Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 Lyase, CYP19A1= Aromatase, HSD17B1/3= 17-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1/3, CYP21A2= Steroid 21-Hydroxylase, SRD5A1= 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1, AKR1C1/2/3= Aldo-keto Reduktase Familie 1 Member C1/2/3, CYP11B1= mitochondriales Cytochrom P450 11B1, HSD11B2= 11-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2, P5= Pregnenolon, P4= Progesteron

Zwar ist das von Lipoprotein-Rezeptoren stammende Cholesterol die Hauptquelle des Steroidhormon-Vorläufers, jedoch kann auch eine de-novo Cholesterol Synthese stattfinden [87, 88] (Abb. 33). Die hieran beteiligte DHCR24 wurde im Vergleich zur ebenfalls an der Cholesterol-Generierung beteiligten CHDR7, stärker in Zytotrophoblast-artigen Wildtypzellen detektiert. Beide Enzyme katalysieren den letzten Schritt der Cholesterolbildung (Abb. 33 rechts), im Fall von DHCR24 ausgehend von Desmosterol und von DHCR7 ausgehend von 7-Dehydrocholesterol. Da im BeWo-Zellwildtyp mehr DHCR24 gebildet wurde, könnte mehr der Vitamin-D3 Vorstufe 7-Dehydrocholesterol vorliegen, während im TRPV6-Knockout mehr Desmosterol zu erwarten ist. Auf Ebene der Bildung des Steroidvorläufers scheint TRPV6 daher einen geringen Einfluss zu haben da beide Wege, die zum Cholesterol führen, der links

dargestellte Bloch Signalweg und der rechte Kandutsch-Russell Signalweg, beide Dehydroxysterol Reduktasen benötigen.

Dem entgegen stehen zwei Enzyme der terminalen Steroidhormonsynthese: die Monooxygenase Aromatase, die die Umwandlung von C19-Androgenen zu C18-Androgenen wie Estron und Estradiol katalysiert [181-183] und die Cortisol-metabolisierende 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2), die signifikant weniger im TRPV6-Knockoutklon detektiert wurden. Die Tatsache, dass es sich bei den betroffenen enzymatischen Reaktionen um terminale Schritte der Steroidhormonbiosynthese handelt, namentlich die Umwandlung zu biologisch aktivem Estradiol sowie zu inaktivem Cortison, legt nahe, dass eine TRPV6-abhängige Suppression der entsprechenden Enzyme funktionelle Relevanz besitzen und zu einer verminderten katalytischen Aktivität mit potenziell pathophysiologischen Konsequenzen führen könnte.

Frühere Studien zeigten bereits, dass das Produkt der Aromatase-Reaktion, Estradiol, die Expression von Trpv6 auf Transkriptom-Ebene in murinen Modellen moduliert [117, 298, 299]. In dieser Arbeit wird diese Wechselwirkung umgekehrt aufgegriffen, da in TRPV6-defizienten Zytotrophoblast-artigen BeWo-Zellen sowohl die Aromataseexpression als auch die Estradiolkonzentration im Zellkulturüberstand signifikant erniedrigt war. Die Befunde legen daher nahe, dass neben der bekannten Regulation der TRPV6-Expression durch Estradiol auch eine wechselseitige Beeinflussung im Sinne einer TRPV6-abhängigen Modulation der Aromatase-Expression bzw. -Aktivität besteht. Vor dem Hintergrund der bekannten Rolle von TRPV6 und Estradiol in der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase [50, 51, 300-305] deutet diese Beobachtung darauf hin, dass eine TRPV6-abhängige Regulation der Steroidgenese auch zur integrativen Kontrolle der feto-maternalen Barrierefunktion beitragen könnte. Diese Annahme wird durch die signifikante Anreicherung von Proteinen, die an der Calciumhomöostase beteiligt sind, im TRPV6-Knockoutklon mit niedriger Aromatase-Expression, belegt. Störungen der Calciumhomöostase und des transzellulären Calciumeinstroms stellen zudem zentrale pathophysiologische Merkmale des transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus dar, einer Erkrankung, die in direktem Zusammenhang mit einem TRPV6-defizienten Calciumtransport steht und sich durch eine unzureichende fetale Knochenmineralisierung auszeichnet. Vor dem Hintergrund der bekannten Rolle von Estradiol als osteoprotektives Hormon, erscheint eine kombinierte Defizienz der TRPV6- und Aromatase-Expression besonders relevant. Zwei zentrale Modulatoren der calciumabhängigen Mineralstoffhomöostase sind simultan betroffen und könnten daher synergistisch zur Entstehung calciumbedingter fetaler Skelettdysplasien beitragen. Darüber

hinaus ist eine Defizienz der Aromatase mit dem Auftreten von früh einsetzender Präeklampsie ab der 24. Schwangerschaftswoche assoziiert. Dies legt nahe, dass TRPV6 über die verminderte Aromataseexpression auch eine Rolle in der Pathogenese dieser Schwangerschaftskomplikation spielen könnte.

Neben der Aromatase wurde auch das terminale Enzym des Cortisol-Metabolismus HSD11B2 signifikant reduziert im TRPV6-Knockoutklon exprimiert. Zusammen mit seinem Gegenspieler HSD11B1 regulieren sie das feto-maternale Glukokortikoid-Gleichgewicht, indem HSD11B1 die Umwandlung von inaktivem Cortison und 11-Dehydrocorticosteron in aktives Cortisol bzw. Corticosteron und HSD11B2 die entgegengesetzte Bildung der inaktiven Glukokortikoid-Metabolite katalysiert [306]. Die plazentare Bildung von HSD11B2 findet primär in den Synzytiotrophoblasten statt, um den Fetus an dieser Grenzschicht vor einer übermäßigen Cortisol- oder Corticosteron-Exposition zu schützen [76, 307] und damit Schwangerschaftskomplikationen wie eine intrauterine Wachstumsrestriktion [308] und niedriges fetales Geburtsgewicht [307] zu verhindern.

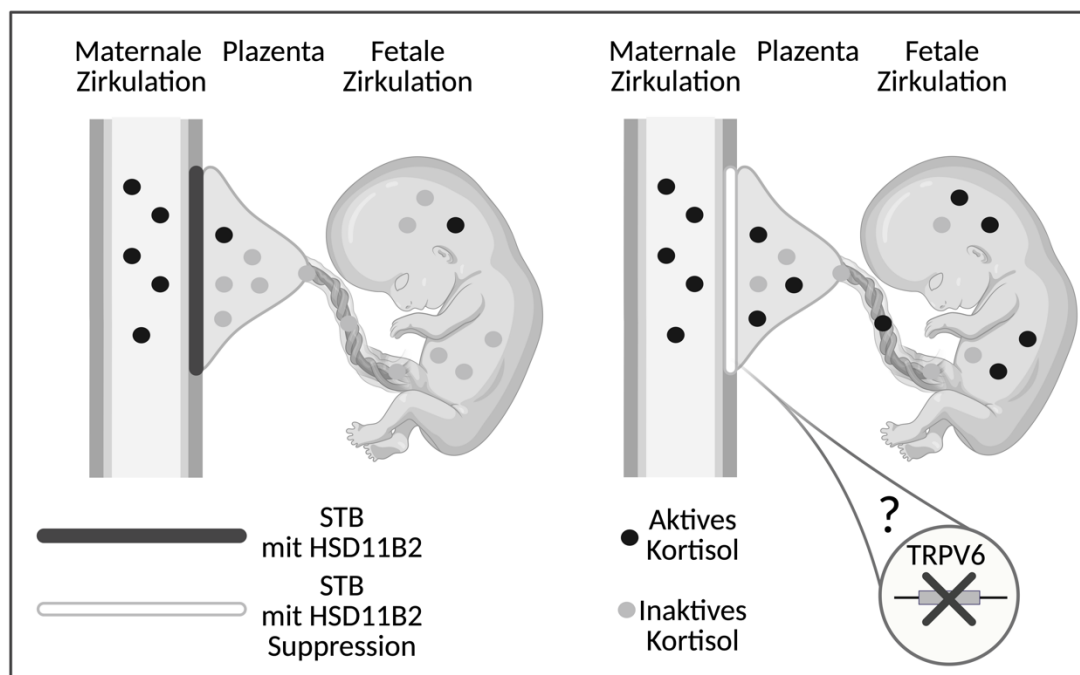


Abbildung 34: Schematische Darstellung der feto-maternalen Glukokortikoidhomöostase, Abbildung angelehnt an Seckl et al 2007 [309] , STB= Synzytiotrophoblasten, HSD11B2= 11-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2

Mehrere Studien, die sich mit der Fragestellung befassen, ob Cortisol einen direkten Effekt auf die Parathormonbildung (PTH) und Sekretion hat, lieferten heterogenen Ergebnissen. Ältere Studien beschreiben eine direkte Induktion der PTH-Sekretion durch Glukokorticoide in Ratten [310]. Ergänzend dazu berichten klinische Studien an erkrankten Personen mit

chronischem Hypercortisolismus, dass ein Glukokortikoidüberschuss mit einer verstärkten PTH-Antwort auf eine experimentell induzierte Hypocalcämie einhergeht. Laut Autoren könnte das einen möglichen Pathomechanismus für den osteoporotischen Phänotyp dieser Erkrankung darstellen [311]. Auf molekularer Ebene konzentrieren sich die verfügbaren Daten jedoch überwiegend auf den reziproken Zusammenhang, der Stimulation der Cortisolsekretion durch das PTH und PTH-related Peptide [312]. Beide Hormone, PTH und Cortisol, sind jedoch integrale Komponenten des Regelkreises der Calciumhomöostase und hohe Konzentrationen beider Hormone gehen mit Knochenphänotypischen Komplikationen einher. Cortisol hemmt die Proliferation von Osteoblasten [313], induziert den RANKL zur Induktion der Osteoklastenbildung und fördert dadurch den Knochenabbau [314]. Zudem beschleunigen hohe Cortisolmengen die Parathormon-induzierte Osteoklasten-Differenzierung und -Bildung, indem sie die RANKL-Produktion hochreguliert und die OPG-Expression herunterreguliert [313]. Um die Hypothese einer reduzierten Aktivität des Enzyms HSD11B2 infolge des TRPV6-Knockouts zu untermauern, ist es jedoch erforderlich, eine differenzierte Analyse der Cortisol- und Cortison-Spiegel in den Überständen der Zellmodelle durchzuführen. Aufgrund technischer Limitationen war diese Quantifizierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu realisieren. Zudem sollte auch die PTH-Konzentration überprüft werden, um einen möglichen TRPV6-bedingten Zusammenhang zwischen der HSD11B2-Defizienz und dem transienten neonatalen Hyperparathyreodismus zu ermitteln.

Auch nach Induktion der Synzytialisierung durch FSK-Inkubation der Zellen zeigte HSD11B2 weiterhin eine signifikant stärkere Expression im BeWo-Zellwildtyp, sodass sich die Vermutung, dass TRPV6 an der Bildung des Enzyms der fetomaternalen Glukokortikoid-Barriere beteiligt ist auf die Synzytiotrophoblastschicht übertragen lässt (3.12.1.2). Die anderen Enzyme der Steroidhormonsynthese die zuvor im TRPV6-Knockout oder BeWo-Wildtyp signifikant angereichert detektiert wurden, wiesen jedoch nach FSK-Behandlung keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr auf, was sich mit der Beobachtung deckt, dass nach Induktion der Synzytialisierung auch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede der erfassten Hormone mehr im Zellkulturüberstand gemessen wurden. Demnach scheint eine Aktivierung der Adenylatzyklase die meisten Proteinexpressions-Defizienzen im TRPV6-Knockout zu kompensieren. Die Induktion der Steroidgenese in Trophoblasten könnte durch mehrere parallel verlaufende Signalwege vermittelt werden, darunter ein Signalweg, der mit der Aktivierung der Adenylatzyklase assoziiert ist, sowie ein weiterer, der mit der TRPV6-Signalübertragung in Verbindung steht. Dabei sind regulatorische Feedbackmechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Hormonhomöostase beitragen, nicht auszuschließen. Die signifikante Reduktion der Synthese von HSD11B2 im TRPV6-Knockoutklon, selbst nach der

Aktivierung der Adenylatzyklase, könnte daran liegen, dass HSD11B2 als calciumabhängiger Marker für die Synzytialisierung fungiert (3.1) [180]. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Bildung von HSD11B2 durch andere Transkriptionsfaktoren induziert wird, als die der anderen Steroidhormonenzyme und TRPV6 einen differenziellen Einfluss auf diese Faktoren hat. Neben HSD11B2 zeigten weitere klassische Proteine der Steroidhormonsynthese wie die Steryl-sulfatase, die die Umwandlung von sulfatierten Steroidvorläufern in ihre freie Steroidform katalysiert [315], die 3-keto-steroid Reduktase/17-beta-hydroxysteroid Dehydrogenase 7 (HSD17B7) und die Oxidoreduktase AKR1B1 eine stärkere Expression im Wildtyp. Diese Expressionsänderungen hatten jedoch im Rahmen der erfassten Parameter keinen messbaren Einfluss auf die Synthese von Steroidhormonen.

4.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung des Calciumkanals TRPV6 innerhalb der feto-maternalen Barriere mithilfe des etablierten BeWo Trophoblasten-Modells zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei genetisch modifizierte Zelllinien verwendet: ein Knockoutklon ohne TRPV6-Expression sowie ein Klon mit TRPV6-Überexpression. Der funktionelle Vergleich dieser Mutanten mit dem Wildtyp ergab, dass die Fähigkeit zur Synzytialisierung unabhängig von TRPV6 zu sein scheint. Es wurden jedoch mehrere signifikante funktionelle Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockoutzellen festgestellt: Das Fehlen von TRPV6 führte zu einer veränderten Zellmorphologie, einer signifikant reduzierten intrazellulären Calciumkonzentration sowie zu einer verminderten Synthese und Sekretion von Glykoprotein- und steroidalen Hormonen. Viele der funktionellen Defizite konnten durch die pharmakologische Aktivierung der Adenylatzyklase durch FSK partiell kompensiert werden. Dies deutet auf die Beteiligung multipler, möglicherweise paralleler, Signaltransduktionswege bei der Regulation trophoblastärer Funktionen hin. Alternativ könnte TRPV6 selbst „upstream“ in der cAMP-Signalkaskade agieren.

Im Kontext klinischer Relevanz ist insbesondere die Assoziation eines TRPV6-Mangels mit dem transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus von Bedeutung, einem Krankheitsbild, das durch gestörte Knochenmineralisierung und reduzierten plazentaren Calciumtransport charakterisiert ist. Die in dieser Arbeit nachgewiesene reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration in TRPV6-defizienten Zellen könnte ein pathophysiologisches Korrelat dieser klinischen Manifestation darstellen. Ergänzend hierzu zeigte sich ein verminderter Gehalt des Enzyms HSD11B2, das als zentrale Komponente der feto-maternalen Glukokortikoidbarriere gilt. Da auch für HSD11B2 eine Rolle in der ossären Entwicklung diskutiert wird, erscheint eine potenzielle synergistische Wirkung beider Defizite denkbar. Ein weiterer relevanter Befund dieser Arbeit betrifft die beobachtete Reduktion von Aromatase-

Expression und Estradiol-Sekretion im Zytotrophoblast-artigen TRPV6-Knockout. Da eine reduzierte Estradiolbiosynthese mit der Pathogenese der Präeklampsie in Verbindung gebracht wird, könnte TRPV6 auch als modulierender Faktor in der Entstehung dieser Schwangerschaftserkrankung fungieren. Allerdings bedarf diese Hypothese einer weiterführenden Validierung in primären Trophoblastenmodellen und vergleichender Untersuchung von Gewebebiopsien gesunder und an Präeklampsie erkrankter Patientinnen.

Die Überexpression von TRPV6 führte weder zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration noch zu einer gesteigerten Hormonsynthese. Dies legt nahe, dass eine basal-physiologische Expression von TRPV6 essenziell für die Calciumhomöostase und die sekretorische Funktion trophoblastärer Zellen ist, jedoch mögliche Rückkopplungs- oder Sättigungsmechanismen eine Überkompensation verhindern könnten. Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher auf die Klärung der genauen Rolle von TRPV6 innerhalb zellulärer Signalkaskaden konzentrieren und insbesondere den funktionellen Einfluss der TRPV6-abhängigen Calciumregulation auf hormonelle, metabolische und strukturelle Prozesse in der Plazenta weiter differenzieren.

5. Literatur

1. Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN: **Human placental development and function.** *Semin Cell Dev Biol* 2022, **131**:66-77.
2. Moore KL, & Persaud, T. V. N: **Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik** In., edn.: Urban & Fische; 2007.
3. Gardner DK, Schoolcraft WB: **Culture and transfer of human blastocysts.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999, **11**(3):307-311.
4. Niakan KK, Eggan K: **Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse.** *Dev Biol* 2013, **375**(1):54-64.
5. Turco MY, Moffett A: **Development of the human placenta.** *Development* 2019, **146**(22).
6. Schlafke S, Enders AC: **Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation.** *Biol Reprod* 1975, **12**(1):41-65.
7. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG: **Growth and function of the normal human placenta.** *Thromb Res* 2004, **114**(5-6):397-407.
8. Gauster M, Moser G, Wernitznig S, Kupper N, Huppertz B: **Early human trophoblast development: from morphology to function.** *Cell Mol Life Sci* 2022, **79**(6):345.
9. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG: **Mechanisms of syncytial fusion: a review.** *Placenta* 2002, **23 Suppl A**:S107-113.
10. Lyden TW, Ng AK, Rote NS: **Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment.** *Placenta* 1993, **14**(2):177-186.
11. Adler RR, Ng AK, Rote NS: **Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR.** *Biol Reprod* 1995, **53**(4):905-910.
12. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B: **Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8.** *Cell Death Differ* 2004, **11**(1):90-98.
13. Gauster M, Siwetz M, Orendi K, Moser G, Desoye G, Huppertz B: **Caspases rather than calpains mediate remodelling of the fodrin skeleton during human placental trophoblast fusion.** *Cell Death Differ* 2010, **17**(2):336-345.
14. Pidoux G, Gerbaud P, Gnidehou S, Grynberg M, Geneau G, Guibourdenche J, Carette D, Cronier L, Evain-Brion D, Malassine A *et al*: **ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, **298**(6):C1517-1526.
15. Gerbaud P, Pidoux G: **Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion.** *Placenta* 2015, **36 Suppl 1**:S35-42.
16. Frendo JL, Cronier L, Bertin G, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D, Malassine A: **Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 16):3413-3421.
17. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P: **Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta.** *Histochem Cell Biol* 1998, **110**(5):495-508.
18. Chernomordik LV, Kozlov MM: **Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps.** *Cell* 2005, **123**(3):375-382.

19. Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F: **Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(10):3566-3574.
20. Knerr I, Schubert SW, Wich C, Amann K, Aigner T, Vogler T, Jung R, Dotsch J, Rascher W, Hashemolhosseini S: **Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions.** *FEBS Lett* 2005, **579**(18):3991-3998.
21. Huppertz B: **Orthologie der Plazenta.** In: *Pathologie.* edn. Edited by Klöppel G, Kreipe, H., Remmele, W., Dietel, M. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
22. M. Barthe TF, J. Guibourdenche, V. Tsatsaris, E. Lecarpentier: **La placenta humana.** *Ginecología-Obstetricia* 2025, **61**(1):1-21.
23. Stangl GI: **Ernährung der Schwangeren und pränatale Entwicklung des Kindes.** In: *Ernährung - Physiologische und Praktische Grundlagen.* edn. Edited by Föller M, Stangl, G.I. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2021.
24. Engel N, Schreiber, J.U. : **Plazentaanatomie und -physiologie mit uteroplazentarem Kreislauf.** In: *Die geburtshilfliche Anästhesie.* edn. Edited by Kranke P. Berlin, Heidelberg: Springer; 2017.
25. Huppertz B: **The anatomy of the normal placenta.** *J Clin Pathol* 2008, **61**(12):1296-1302.
26. Huppertz B SE: **Die Plazenta.** In., edn. Berlin Heidelberg: Springer; 2018.
27. Sands JM: **Molecular mechanisms of urea transport.** *J Membr Biol* 2003, **191**(3):149-163.
28. Pascolo L, Ferneti C, Garcia-Mediavilla MV, Ostrow JD, Tiribelli C: **Mechanisms for the transport of unconjugated bilirubin in human trophoblastic BeWo cells.** *FEBS Lett* 2001, **495**(1-2):94-99.
29. Baumann MU, Deborde S, Illsley NP: **Placental glucose transfer and fetal growth.** *Endocrine* 2002, **19**(1):13-22.
30. Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V: **Characterization of a sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipoate in human placental choriocarcinoma cells.** *Placenta* 1997, **18**(7):527-533.
31. Jansson T: **Amino acid transporters in the human placenta.** *Pediatr Res* 2001, **49**(2):141-147.
32. King JC: **Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes.** *Annu Rev Nutr* 2006, **26**:271-291.
33. Duttaroy AK: **Transport of fatty acids across the human placenta: a review.** *Prog Lipid Res* 2009, **48**(1):52-61.
34. Herrera E: **Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn.** *Endocrine* 2002, **19**(1):43-55.
35. Woollett LA: **Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation.** *Placenta* 2011, **32 Suppl 2**(0 2):S218-221.
36. Wittmaack FM, Gafvels ME, Bronner M, Matsuo H, McCrae KR, Tomaszewski JE, Robinson SL, Strickland DK, Strauss JF, 3rd: **Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport.** *Endocrinology* 1995, **136**(1):340-348.

37. Furuhashi M, Seo H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y, Matsui N: **Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy.** *Mol Endocrinol* 1989, **3**(8):1252-1256.
38. Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B, Sattler W, Malle E: **Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells.** *Placenta* 2003, **24**(2-3):131-143.
39. Stefulj J, Panzenboeck U, Becker T, Hirschmugl B, Schweinzer C, Lang I, Marsche G, Sadjak A, Lang U, Desoye G *et al*: **Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1.** *Circ Res* 2009, **104**(5):600-608.
40. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M: **Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface.** *Rev Reprod* 1999, **4**(2):81-89.
41. Schneider H, Miller RK: **Receptor-mediated uptake and transport of macromolecules in the human placenta.** *Int J Dev Biol* 2010, **54**(2-3):367-375.
42. Shennan DB, Davis B, Boyd CA: **Chloride transport in human placental microvillus membrane vesicles. I. Evidence for anion exchange.** *Pflugers Arch* 1986, **406**(1):60-64.
43. Riquelme G, Stutzin A, Barros LF, Liberona JL: **A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes.** *Am J Obstet Gynecol* 1995, **173**(3 Pt 1):733-738.
44. Seligman PA, Schleicher RB, Allen RH: **Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta.** *J Biol Chem* 1979, **254**(20):9943-9946.
45. Wada HG, Hass PE, Sussman HH: **Transferrin receptor in human placental brush border membranes. Studies on the binding of transferrin to placental membrane vesicles and the identification of a placental brush border glycoprotein with high affinity for transferrin.** *J Biol Chem* 1979, **254**(24):12629-12635.
46. Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC: **Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **293**(3):F643-654.
47. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM *et al*: **LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability.** *Nature* 2001, **411**(6837):590-595.
48. De Clercq K, Perez-Garcia V, Van Bree R, Pollastro F, Peeraer K, Voets T, Vriens J: **Mapping the expression of transient receptor potential channels across murine placental development.** *Cell Mol Life Sci* 2021, **78**(11):4993-5014.
49. Chubanov V, Ferioli S, Wisnowsky A, Simmons DG, Leitzinger C, Einer C, Jonas W, Shymkiv Y, Bartsch H, Braun A *et al*: **Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival.** *Elife* 2016, **5**.
50. Suzuki Y, Chitayat D, Sawada H, Deardorff MA, McLaughlin HM, Begtrup A, Millar K, Harrington J, Chong K, Roifman M *et al*: **TRPV6 Variants Interfere with Maternal-Fetal Calcium Transport through the Placenta and Cause Transient Neonatal Hyperparathyroidism.** *Am J Hum Genet* 2018, **102**(6):1104-1114.
51. Winter M, Weissgerber P, Klein K, Lux F, Yildiz D, Wissenbach U, Philipp SE, Meyer MR, Flockerzi V, Fecher-Trost C: **Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) Proteins Control the Extracellular Matrix Structure of the Placental Labyrinth.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(24).

52. Fecher-Trost C, Lux F, Busch KM, Raza A, Winter M, Hielscher F, Belkacemi T, van der Eerden B, Boehm U, Freichel M *et al*: **Maternal Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (Trpv6) Is Involved In Offspring Bone Development.** *J Bone Miner Res* 2019, **34**(4):699-710.
53. Kumar C, Vani, S., Deshmukh, N.N. *et al*: **Novel TRPV6 variant linked with transient neonatal hyperparathyroidism.** *Egypt J Med Hum Genet* 2024, **25**(72).
54. Burren CP, Caswell R, Castle B, Welch CR, Hilliard TN, Smithson SF, Ellard S: **TRPV6 compound heterozygous variants result in impaired placental calcium transport and severe undermineralization and dysplasia of the fetal skeleton.** *Am J Med Genet A* 2018, **176**(9):1950-1955.
55. Yamashita S, Mizumoto H, Sawada H, Suzuki Y, Hata D: **TRPV6 Gene Mutation in a Dizygous Twin With Transient Neonatal Hyperparathyroidism.** *J Endocr Soc* 2019, **3**(3):602-606.
56. Clarson LH, Roberts VH, Hamark B, Elliott AC, Powell T: **Store-operated Ca²⁺ entry in first trimester and term human placenta.** *J Physiol* 2003, **550**(Pt 2):515-528.
57. Moreau R, Daoud G, Masse A, Simoneau L, Lafond J: **Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta.** *Mol Reprod Dev* 2003, **65**(3):283-288.
58. Moreau R, Simoneau L, Lafond J: **Calcium fluxes in human trophoblast (BeWo) cells: calcium channels, calcium-ATPase, and sodium-calcium exchanger expression.** *Mol Reprod Dev* 2003, **64**(2):189-198.
59. Jameson JL, Hollenberg AN: **Regulation of chorionic gonadotropin gene expression.** *Endocr Rev* 1993, **14**(2):203-221.
60. Tal R, Taylor HS: **Endocrinology of Pregnancy.** In: *Endotext.* edn. Edited by Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K *et al*. South Dartmouth (MA); 2000.
61. Jaffe RB, Lee PA, Midgley AR, Jr.: **Serum gonadotropins before, at the inception of, and following human pregnancy.** *J Clin Endocrinol Metab* 1969, **29**(9):1281-1283.
62. Benveniste R, Scommegha A: **Human chorionic gonadotropin alpha-subunit in pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* 1981, **141**(8):952-961.
63. Dr. Jennifer White DMD, and Harris. In: *Comparative Endocrinology* edn.: pwallis.
64. Del Canto F, Sierralta W, Kohen P, Munoz A, Strauss JF, 3rd, Devoto L: **Features of natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist-induced corpus luteum regression and effects of in vivo human chorionic gonadotropin.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**(11):4436-4443.
65. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K: **Luteal-phase endocrinology.** *Reprod Biomed Online* 2009, **19 Suppl 4**:4314.
66. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW: **Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.** *Physiol Rev* 2000, **80**(1):1-29.
67. Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, Tagliasacchi D, Pignatti E, Simoni M: **LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46682.

68. Gupta C, Chapekar T, Chhabra Y, Singh P, Sinha S, Luthra K: **Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells.** *Indian J Med Res* 2012, **135**(3):331-340.
69. Bahl OP: **Human chorionic gonadotropin, its receptor and mechanism of action.** *Fed Proc* 1977, **36**(8):2119-2127.
70. Banerjee S, Smallwood A, Chambers AE, Papageorgiou A, Loosfelt H, Spencer K, Campbell S, Nicolaides K: **A link between high serum levels of human chorionic gonadotrophin and chorionic expression of its mature functional receptor (LHCGR) in Down's syndrome pregnancies.** *Reprod Biol Endocrinol* 2005, **3**:25.
71. Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR: **Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* 1972, **112**(8):1095-1100.
72. Tulchinsky D, Hobel CJ: **Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* 1973, **117**(7):884-893.
73. Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J: **Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts.** *Endocrinology* 1993, **132**(3):1387-1395.
74. Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D: **Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro.** *J Cell Sci* 1998, **111** (Pt 7):995-1004.
75. Smitz J, Platteau P: **Influence of human chorionic gonadotrophin during ovarian stimulation: an overview.** *Reprod Biol Endocrinol* 2020, **18**(1):80.
76. Zhu P, Wang W, Zuo R, Sun K: **Mechanisms for establishment of the placental glucocorticoid barrier, a guard for life.** *Cell Mol Life Sci* 2019, **76**(1):13-26.
77. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT: **Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(11):5290-5296.
78. Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P *et al*: **Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium.** *FASEB J* 2006, **20**(14):2630-2632.
79. Akoum A, Metz CN, Morin M: **Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**(5):2904-2910.
80. Matsuura T, Sugimura M, Iwaki T, Ohashi R, Kanayama N, Nishihira J: **Anti-macrophage inhibitory factor antibody inhibits PMSG-hCG-induced follicular growth and ovulation in mice.** *J Assist Reprod Genet* 2002, **19**(12):591-595.
81. Wan H, Versnel MA, Cheung WY, Leenen PJ, Khan NA, Benner R, Kiekens RC: **Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function.** *J Leukoc Biol* 2007, **82**(4):926-933.
82. Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL: **The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua.** *J Clin Endocrinol Metab* 1990, **70**(2):421-430.
83. Zuo J, Lei ZM, Rao CV: **Human myometrial chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in preterm and term deliveries.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **79**(3):907-911.

84. Eta E, Ambrus G, Rao CV: **Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotropin.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **79**(6):1582-1586.
85. Doheny HC, Houlihan DD, Ravikumar N, Smith TJ, Morrison JJ: **Human chorionic gonadotrophin relaxation of human pregnant myometrium and activation of the BKCa channel.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(9):4310-4315.
86. Soldin OP, Guo T, Weiderpass E, Tractenberg RE, Hilakivi-Clarke L, Soldin SJ: **Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry.** *Fertil Steril* 2005, **84**(3):701-710.
87. Shi W, Swan KF, Lear SR, O'Neil JS, Erickson SK, Henson MC: **Regulation of pathways determining cholesterol availability in the baboon placenta with advancing gestation.** *Biol Reprod* 1999, **61**(6):1499-1505.
88. Pecks U, Bornemann V, Klein A, Segger L, Maass N, Alkatout I, Eckmann-Scholz C, Elessawy M, Lutjohann D: **Estimating fetal cholesterol synthesis rates by cord blood analysis in intrauterine growth restriction and normally grown fetuses.** *Lipids Health Dis* 2019, **18**(1):185.
89. Yanez MJ, Leiva A: **Human Placental Intracellular Cholesterol Transport: A Focus on Lysosomal and Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress.** *Antioxidants (Basel)* 2022, **11**(3).
90. Matthew C. Lorence BAM, John M. Trant, J. Ian Mason: **Human 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ Isomerase from Placenta: Expression in Nonsteroidogenic Cells of a Protein that Catalyzes the Dehydrogenation/Isomerization of C21 and C19 Steroids.** *Endocrinology* 1990, **126**(5):2493–2498.
91. Costa MA: **The endocrine function of human placenta: an overview.** *Reprod Biomed Online* 2016, **32**(1):14-43.
92. Partsch CJ, Sippell WG, MacKenzie IZ, Aynsley-Green A: **The steroid hormonal milieu of the undisturbed human fetus and mother at 16-20 weeks gestation.** *J Clin Endocrinol Metab* 1991, **73**(5):969-974.
93. Bazer FW, Roberts RM, Thatcher WW: **Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development.** *J Anim Sci* 1979, **49** Suppl 2:35-45.
94. Sun J, Walker AJ, Dean B, van den Buuse M, Gogos A: **Progesterone: The neglected hormone in schizophrenia? A focus on progesterone-dopamine interactions.** *Psychoneuroendocrinology* 2016, **74**:126-140.
95. Jerome F. Strauss SA: **Placental Production of Peptide, Steroid, and Lipid Hormones.** In: *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology.* edn. Edited by Christopher S. Kovacs CLD: Academic Press; 2020: 685-706.
96. Wetendorf M, DeMayo FJ: **The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network.** *Mol Cell Endocrinol* 2012, **357**(1-2):108-118.
97. Putnam CD, Brann DW, Kolbeck RC, Mahesh VB: **Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acidA receptor systems.** *Biol Reprod* 1991, **45**(2):266-272.
98. Kunzel J, Geisler K, Maltaris T, Muller A, Hoffmann I, Schneider H, Beckmann MW, Dittrich R, Oppelt PG: **Effects of interactions between progesterone and prostaglandin on uterine contractility in a perfused swine uterus model.** *In Vivo* 2014, **28**(4):467-475.

99. Siiteri PK, Febres F, Clemens LE, Chang RJ, Gondos B, Stites D: **Progesterone and maintenance of pregnancy: is progesterone nature's immunosuppressant?** *Ann N Y Acad Sci* 1977, **286**:384-397.
100. Moriyama I, Sugawa T: **Progesterone facilitates implantation of xenogenic cultured cells in hamster uterus.** *Nat New Biol* 1972, **236**(66):150-152.
101. Siiteri PK, Stites DP: **Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy.** *Biol Reprod* 1982, **26**(1):1-14.
102. Loganath A, Peh KL, Wong PC: **Evidence for the biosynthesis of DHEA from cholesterol by first-trimester human placental tissue: source of androgens.** *Horm Metab Res* 2002, **34**(3):116-120.
103. Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR: **Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, **87**(2-3):181-189.
104. Escobar JC, Patel SS, Beshay VE, Suzuki T, Carr BR: **The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(5):1385-1392.
105. Noyola-Martinez N, Halhali A, Barrera D: **Steroid hormones and pregnancy.** *Gynecol Endocrinol* 2019, **35**(5):376-384.
106. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I: **Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:1027.
107. Pasqualini JR: **Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, **97**(5):401-415.
108. Albrecht ED, Aberdeen GW, Pepe GJ: **The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* 2000, **182**(2):432-438.
109. Albrecht ED, Robb VA, Pepe GJ: **Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(11):5803-5809.
110. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN: **Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(20):10972-10977.
111. Berkane N, Liere P, Oudinet JP, Hertig A, Lefevre G, Pluchino N, Schumacher M, Chabbert-Buffet N: **From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens.** *Endocr Rev* 2017, **38**(2):123-144.
112. Pepe GJ, Burch MG, Albrecht ED: **Estrogen regulates 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 localization in placental syncytiotrophoblast in the second half of primate pregnancy.** *Endocrinology* 2001, **142**(10):4496-4503.
113. Pepe GJ, Albrecht ED: **Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy.** *Steroids* 1999, **64**(9):624-627.
114. Sun K, Yang K, Challis JR: **Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts.** *Biol Reprod* 1998, **58**(6):1379-1384.

115. Baggia S, Albrecht ED, Pepe GJ: **Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the baboon placenta by estrogen.** *Endocrinology* 1990, **126**(5):2742-2748.
116. Banciu A, Banciu DD, Mustaciosu CC, Radu M, Cretoiu D, Xiao J, Cretoiu SM, Suciu N, Radu BM: **Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(5).
117. Lee BM, Lee GS, Jung EM, Choi KC, Jeung EB: **Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents.** *Reprod Biol Endocrinol* 2009, **7**:49.
118. Chibbar R, Wong S, Miller FD, Mitchell BF: **Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human chorio-decidua.** *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**(2):567-572.
119. Blesson CS, Buttner E, Masironi B, Sahlin L: **Prostaglandin receptors EP and FP are regulated by estradiol and progesterone in the uterus of ovariectomized rats.** *Reprod Biol Endocrinol* 2012, **10**:3.
120. Pattillo RA, Gey GO: **The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro.** *Cancer Res* 1968, **28**(7):1231-1236.
121. Kohler PO, Bridson WE: **Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma.** *J Clin Endocrinol Metab* 1971, **32**(5):683-687.
122. Pattillo RA, Ruckert, A.C., Hussa, R.O., Bernstein, R., Delfs, E: **he JAR cell line: Continuous human multihormone production and controls.** *In Vitro* 1971(6):398–405.
123. Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R: **Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells.** *Hum Reprod* 2006, **21**(1):193-201.
124. Spekker E, Kortesi T, Vecsei L: **TRP Channels: Recent Development in Translational Research and Potential Therapeutic Targets in Migraine.** *Int J Mol Sci* 2022, **24**(1).
125. Cosens DJ, Manning A: **Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant.** *Nature* 1969, **224**(5216):285-287.
126. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G: **Rescue of the Drosophila phototransduction mutation *trp* by germline transformation.** *Science* 1985, **230**(4729):1040-1043.
127. Montell C, Rubin GM: **Molecular characterization of the Drosophila *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction.** *Neuron* 1989, **2**(4):1313-1323.
128. Wong F, Schaefer EL, Roop BC, LaMendola JN, Johnson-Seaton D, Shao D: **Proper function of the Drosophila *trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult.** *Neuron* 1989, **3**(1):81-94.
129. Minke B, Selinger Z: **The inositol-lipid pathway is necessary for light excitation in fly photoreceptors.** *Soc Gen Physiol Ser* 1992, **47**:201-217.
130. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C: **TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(21):9652-9656.
131. Clapham DE: **TRP channels as cellular sensors.** *Nature* 2003, **426**(6966):517-524.

132. Flockerzi V, Nilius B: **TRPs: truly remarkable proteins**. *Handb Exp Pharmacol* 2014, **222**:1-12.
133. Zhang M, Ma Y, Ye X, Zhang N, Pan L, Wang B: **TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases**. *Signal Transduct Target Ther* 2023, **8**(1):261.
134. Wissenbach U, Boddling M, Freichel M, Flockerzi V: **Trp12, a novel Trp related protein from kidney**. *FEBS Lett* 2000, **485**(2-3):127-134.
135. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V: **Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer**. *J Biol Chem* 2001, **276**(22):19461-19468.
136. Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V: **Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4**. *J Biol Chem* 2003, **278**(33):30813-30820.
137. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B: **The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels**. *Nature* 2004, **430**(7001):748-754.
138. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW: **Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis**. *Cancer Res* 1998, **58**(7):1515-1520.
139. Stayner C, Zhou J: **Polycystin channels and kidney disease**. *Trends Pharmacol Sci* 2001, **22**(11):543-546.
140. Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A, Raas-Rothschild A, Glusman G, Lancet D, Bach G: **Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV**. *Nat Genet* 2000, **26**(1):118-123.
141. Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G: **Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolipidosis type IV**. *Am J Hum Genet* 2000, **67**(5):1110-1120.
142. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW *et al*: **ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures**. *Cell* 2003, **112**(6):819-829.
143. Walker RG, Willingham AT, Zuker CS: **A Drosophila mechanosensory transduction channel**. *Science* 2000, **287**(5461):2229-2234.
144. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: **The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway**. *Nature* 1997, **389**(6653):816-824.
145. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D: **A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat**. *Nature* 1999, **398**(6726):436-441.
146. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA: **Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption**. *J Biol Chem* 1999, **274**(32):22739-22746.
147. Muller D, Hoenderop JG, Merks GF, van Os CH, Bindels RJ: **Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel**. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **275**(1):47-52.

148. Akey JM, Swanson WJ, Madeoy J, Eberle M, Shriver MD: **TRPV6 exhibits unusual patterns of polymorphism and divergence in worldwide populations.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**(13):2106-2113.
149. Kessler T, Wissenbach U, Grobholz R, Flockerzi V: **TRPV6 alleles do not influence prostate cancer progression.** *BMC Cancer* 2009, **9**:380.
150. Fecher-Trost C, Wissenbach U, Beck A, Schalkowsky P, Stoerger C, Doerr J, Dembek A, Simon-Thomas M, Weber A, Wollenberg P *et al*: **The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG.** *J Biol Chem* 2013, **288**(23):16629-16644.
151. Wolske K, Fecher-Trost C, Wesely C, Lohr H, Philipp S, Belkacemi A, Pacheco G, Wissenbach U: **Why endogenous TRPV6 currents are not detectable-what can we learn from bats?** *Cell Calcium* 2020, **92**:102302.
152. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L: **trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry.** *Cell* 1996, **85**(5):661-671.
153. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM: **Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1.** *J Biol Chem* 2001, **276**(30):28613-28619.
154. Tsuruda PR, Julius D, Minor DL, Jr.: **Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel.** *Neuron* 2006, **51**(2):201-212.
155. Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY: **Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy.** *J Biol Chem* 2011, **286**(44):38168-38176.
156. Duan J, Li J, Zeng B, Chen GL, Peng X, Zhang Y, Wang J, Clapham DE, Li Z, Zhang J: **Structure of the mouse TRPC4 ion channel.** *Nat Commun* 2018, **9**(1):3102.
157. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y: **Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy.** *Nature* 2013, **504**(7478):107-112.
158. Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee SY: **Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8.** *Science* 2018, **359**(6372):237-241.
159. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D: **Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms.** *Nature* 2015, **525**(7570):552.
160. Zhou X, Li M, Su D, Jia Q, Li H, Li X, Yang J: **Cryo-EM structures of the human endolysosomal TRPML3 channel in three distinct states.** *Nat Struct Mol Biol* 2017, **24**(12):1146-1154.
161. Shen PS, Yang X, DeCaen PG, Liu X, Bulkley D, Clapham DE, Cao E: **The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs.** *Cell* 2016, **167**(3):763-773 e711.
162. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R: **The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity.** *Neuron* 2007, **54**(6):905-918.
163. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE: **An introduction to TRP channels.** *Annu Rev Physiol* 2006, **68**:619-647.
164. Saotome K, Singh AK, Yelshanskaya MV, Sobolevsky AI: **Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6.** *Nature* 2016, **534**(7608):506-511.

165. McGoldrick LL, Singh AK, Saotome K, Yelshanskaya MV, Twomey EC, Grassucci RA, Sobolevsky AI: **Opening of the human epithelial calcium channel TRPV6.** *Nature* 2018, **553**(7687):233-237.
166. Singh AK, Saotome K, McGoldrick LL, Sobolevsky AI: **Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB.** *Nat Commun* 2018, **9**(1):2465.
167. Stumpf T, Zhang Q, Hirnet D, Lewandrowski U, Sickmann A, Wissenbach U, Dorr J, Lohr C, Deitmer JW, Fecher-Trost C: **The human TRPV6 channel protein is associated with cyclophilin B in human placenta.** *J Biol Chem* 2008, **283**(26):18086-18098.
168. Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR: **CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **282**(3):729-734.
169. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H: **Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression.** *Oncogene* 2003, **22**(49):7858-7861.
170. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V: **TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**(4):1359-1363.
171. Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP: **The role of TRPV6 in breast carcinogenesis.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(2):271-279.
172. Yue L, Peng JB, Hediger MA, Clapham DE: **CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel.** *Nature* 2001, **410**(6829):705-709.
173. Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R, Nilius B: **CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties.** *J Biol Chem* 2001, **276**(51):47767-47770.
174. Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V, Trost C: **Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(6):3600-3605.
175. Derler I, Hofbauer M, Kahr H, Fritsch R, Muik M, Kepplinger K, Hack ME, Moritz S, Schindl R, Groschner K *et al*: **Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation.** *J Physiol* 2006, **577**(Pt 1):31-44.
176. Singh AK, McGoldrick LL, Twomey EC, Sobolevsky AI: **Mechanism of calmodulin inactivation of the calcium-selective TRP channel TRPV6.** *Sci Adv* 2018, **4**(8):eaau6088.
177. Masamune A, Kotani H, Sorgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, Masson E, Nakano E, Kakuta Y, Niihori T *et al*: **Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis.** *Gastroenterology* 2020, **158**(6):1626-1641 e1628.
178. Oracz G, Zarod M, Ewers M, Laumen H, Gambin T, Kaminski P, Grabowska I, Drozak A, Kwiatkowski S, Wertheim-Tysarowska K *et al*: **Loss of function TRPV6 variants are associated with chronic pancreatitis in nonalcoholic early-onset Polish and German patients.** *Pancreatology* 2021, **21**(8):1434-1442.
179. Fecher-Trost C, Wolske K, Wesely C, Lohr H, Klawitter DS, Weissgerber P, Gradhand E, Burren CP, Mason AE, Winter M *et al*: **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* 2021, **22**(23).
180. Gehl AL, Klawitter D, Wissenbach U, Cole M, Wesely C, Lohr H, Weissgerber P, Sota A, Meyer MR, Fecher-Trost C: **The proteomic landscape of trophoblasts unravels calcium-dependent syncytialization processes and beta-chorionic gonadotropin (ss-hCG) production.** *Reprod Biol Endocrinol* 2025, **23**(1):33.
 181. Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER: **Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**(23):8948-8952.
 182. Baravalle R, Di Nardo G, Bandino A, Barone I, Catalano S, Ando S, Gilardi G: **Impact of R264C and R264H polymorphisms in human aromatase function.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017, **167**:23-32.
 183. Karahoda R, Kallol S, Groessl M, Ontsouka E, Anderle P, Fluck C, Staud F, Albrecht C: **Revisiting Steroidogenic Pathways in the Human Placenta and Primary Human Trophoblast Cells.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**(4).
 184. Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Kubota N, Kobayashi EH, Shibata S, Oike A, Hori T, Kikutake C, Hamada H *et al*: **The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells.** *Nat Commun* 2022, **13**(1):3071.
 185. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ: **Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis.** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(4):685-694.
 186. Hu X, Chen F, Jia L, Long A, Peng Y, Li X, Huang J, Wei X, Fang X, Gao Z *et al*: **A gut-derived hormone regulates cholesterol metabolism.** *Cell* 2024, **187**(7):1685-1700 e1618.
 187. Laghmani K, Beck BB, Yang SS, Seaayfan E, Wenzel A, Reusch B, Vitzthum H, Priem D, Demaretz S, Bergmann K *et al*: **Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations.** *N Engl J Med* 2016, **374**(19):1853-1863.
 188. Besprozvannaya M, Dickson E, Li H, Ginburg KS, Bers DM, Auwerx J, Nunnari J: **GRAM domain proteins specialize functionally distinct ER-PM contact sites in human cells.** *Elife* 2018, **7**.
 189. Lund-Johansen F, Olweus J, Symington FW, Arli A, Thompson JS, Vilella R, Skubitz K, Horejsi V: **Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens.** *Eur J Immunol* 1993, **23**(11):2782-2791.
 190. Yamamoto-Hino M, Sugiyama T, Hikichi K, Mattei MG, Hasegawa K, Sekine S, Sakurada K, Miyawaki A, Furuichi T, Hasegawa M *et al*: **Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.** *Recept Channels* 1994, **2**(1):9-22.
 191. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK: **MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake.** *Nature* 2010, **467**(7313):291-296.

192. Fan M, Zhang J, Tsai CW, Orlando BJ, Rodriguez M, Xu Y, Liao M, Tsai MF, Feng L: **Structure and mechanism of the mitochondrial Ca(2+) uniporter holocomplex.** *Nature* 2020, **582**(7810):129-133.
193. Miehe S, Bieberstein A, Arnould I, Ihdene O, Rutten H, Strubing C: **The phospholipid-binding protein SESTD1 is a novel regulator of the transient receptor potential channels TRPC4 and TRPC5.** *J Biol Chem* 2010, **285**(16):12426-12434.
194. Boutry M, Pierga A, Matusiak R, Branchu J, Houllégatte M, Ibrahim Y, Balse E, El Hachimi KH, Brice A, Stevanin G *et al*: **Loss of spatacsin impairs cholesterol trafficking and calcium homeostasis.** *Commun Biol* 2019, **2**:380.
195. Monastyrskaya K, Babiyshuk EB, Hostettler A, Wood P, Grewal T, Draeger A: **Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca2+ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton.** *J Biol Chem* 2009, **284**(25):17227-17242.
196. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT: **Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.** *J Immunol* 2000, **165**(4):2156-2164.
197. Hsieh YF, Liu GY, Lee YJ, Yang JJ, Sandor K, Sarang Z, Bononi A, Pinton P, Tretter L, Szondy Z *et al*: **Transglutaminase 2 contributes to apoptosis induction in Jurkat T cells by modulating Ca2+ homeostasis via cross-linking RAP1GDS1.** *PLoS One* 2013, **8**(12):e81516.
198. Raimondi C, Chikh A, Wheeler AP, Maffucci T, Falasca M: **A novel regulatory mechanism links PLCgamma1 to PDK1.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 13):3153-3163.
199. Chen X, Liu Z, Xu J: **The cooperative function of nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1) and NCOA3 in placental development and embryo survival.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(10):1917-1934.
200. Wagner M, Koslowski M, Paret C, Schmidt M, Tureci O, Sahin U: **NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor alpha-mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells.** *BMC Cancer* 2013, **13**:570.
201. Moebius FF, Fitzky BU, Lee JN, Paik YK, Glossmann H: **Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(4):1899-1902.
202. Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF: **Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms.** *Cancer Res* 2001, **61**(18):6716-6722.
203. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R: **Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(26):11775-11780.
204. Bao L, Tessier C, Prigent-Tessier A, Li F, Buzzio OL, Callegari EA, Horseman ND, Gibori G: **Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy.** *Endocrinology* 2007, **148**(5):2326-2334.
205. Kusama K, Bai R, Imakawa K: **Regulation of human trophoblast cell syncytialization by transcription factors STAT5B and NR4A3.** *J Cell Biochem* 2018, **119**(6):4918-4927.
206. Penning TM: **The aldo-keto reductases (AKRs): Overview.** *Chem Biol Interact* 2015, **234**:236-246.

207. Alperin ES, Shapiro LJ: **Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein.** *J Biol Chem* 1997, **272**(33):20756-20763.
208. Harkonen P, Torn S, Kurkela R, Porvari K, Pulkka A, Lindfors A, Isomaa V, Vihko P: **Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(2):705-712.
209. Kumar A, Lualdi M, Loncarek J, Cho YW, Lee JE, Ge K, Kuehn MR: **Loss of function of mouse Pax-Interacting Protein 1-associated glutamate rich protein 1a (Pagr1a) leads to reduced Bmp2 expression and defects in chorion and amnion development.** *Dev Dyn* 2014, **243**(7):937-947.
210. Yang M, Chen Y, Chen L, Wang K, Pan T, Liu X, Xu W: **miR-15b-AGO2 play a critical role in HTR8/SVneo invasion and in a model of angiogenesis defects related to inflammation.** *Placenta* 2016, **41**:62-73.
211. Chin ER: **The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis.** *Proc Nutr Soc* 2004, **63**(2):279-286.
212. Zhao YG, Chen Y, Miao G, Zhao H, Qu W, Li D, Wang Z, Liu N, Li L, Chen S *et al*: **The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation.** *Mol Cell* 2017, **67**(6):974-989 e976.
213. Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S *et al*: **Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors.** *Cell* 2003, **114**(6):777-789.
214. Goretzki B, Glogowski NA, Diehl E, Duchardt-Ferner E, Hacker C, Gaudet R, Hellmich UA: **Structural Basis of TRPV4 N Terminus Interaction with Syndapin/PACSIN1-3 and PIP(2).** *Structure* 2018, **26**(12):1583-1593 e1585.
215. Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, Sachs F: **Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels.** *PLoS One* 2015, **10**(5):e0125503.
216. Abdellatif Y, Liu D, Gallant EM, Gage PW, Board PG, Dulhunty AF: **The Mu class glutathione transferase is abundant in striated muscle and is an isoform-specific regulator of ryanodine receptor calcium channels.** *Cell Calcium* 2007, **41**(5):429-440.
217. Rundle DR, Gorbsky G, Tsiokas L: **PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles.** *J Biol Chem* 2004, **279**(28):29728-29739.
218. Rahimi MJ, Urban N, Wegler M, Sticht H, Schaefer M, Popp B, Gaunitz F, Morleo M, Nigro V, Maitz S *et al*: **De novo variants in ATP2B1 lead to neurodevelopmental delay.** *Am J Hum Genet* 2022, **109**(5):944-952.
219. Cali T, Lopreiato R, Shimony J, Vineyard M, Frizzarin M, Zanni G, Zanotti G, Brini M, Shinawi M, Carafoli E: **A Novel Mutation in Isoform 3 of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Impairs Cellular Ca²⁺ Homeostasis in a Patient with Cerebellar Ataxia and Laminin Subunit 1alpha Mutations.** *J Biol Chem* 2015, **290**(26):16132-16141.
220. Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, Hayden MR, Bezprozvanny I: **Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence**

- neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 2003, **39**(2):227-239.
221. Tao W, Moore R, Smith ER, Xu XX: **Hormonal induction and roles of Disabled-2 in lactation and involution.** *PLoS One* 2014, **9**(10):e110737.
 222. Nagashima T, Li Q, Clementi C, Lydon JP, DeMayo FJ, Matzuk MM: **BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance.** *J Clin Invest* 2013, **123**(6):2539-2550.
 223. Landles C, Chalk S, Steel JH, Rosewell I, Spencer-Dene B, Lalani el N, Parker MG: **The thyroid hormone receptor-associated protein TRAP220 is required at distinct embryonic stages in placental, cardiac, and hepatic development.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(12):2418-2435.
 224. Perry CH, Mullins NA, Sweileh RBA, Shendy NAM, Roberto PA, Broadhurst AL, Nelson HA, Miranda-Carboni GA, Abell AN: **MAP3K4 promotes fetal and placental growth by controlling the receptor tyrosine kinases IGF1R/IR and Akt signaling pathway.** *J Biol Chem* 2022, **298**(9):102310.
 225. Shimizu T, Oike A, Kobayashi EH, Sekiya A, Kobayashi N, Shibata S, Hamada H, Saito M, Yaegashi N, Suyama M *et al*: **CRISPR screening in human trophoblast stem cells reveals both shared and distinct aspects of human and mouse placental development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023, **120**(51):e2311372120.
 226. Puranen T, Poutanen M, Ghosh D, Vihko P, Vihko R: **Characterization of structural and functional properties of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 using recombinant enzymes and site-directed mutagenesis.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**(1):77-86.
 227. Wang X, He A, Yip KC, Liu X, Li R: **Diagnostic signature and immune characteristic of aging-related genes from placentas in Preeclampsia.** *Clin Exp Hypertens* 2022:1-8.
 228. Du X, Dong Y, Shi H, Li J, Kong S, Shi D, Sun LV, Xu T, Deng K, Tao W: **Mst1 and mst2 are essential regulators of trophoblast differentiation and placenta morphogenesis.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e90701.
 229. He N, Lim SJ, Moreira de Mello JC, Navarro I, Bialecka M, Salvatori DCF, van der Westerlaken LAJ, Pereira LV, Chuva de Sousa Lopes SM: **At Term, XmO and XpO Mouse Placentas Show Differences in Glucose Metabolism in the Trophoctoderm-Derived Outer Zone.** *Front Cell Dev Biol* 2017, **5**:63.
 230. Arcuri F, Papa S, Meini A, Carducci A, Romagnoli R, Bianchi L, Riparbelli MG, Sanchez JC, Palmi M, Tosi P *et al*: **The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells.** *Biol Reprod* 2005, **73**(4):745-751.
 231. Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, Nervi F: **Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts.** *J Biol Chem* 1995, **270**(32):18723-18726.
 232. Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR: **The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols.** *Arch Biochem Biophys* 1996, **329**(1):73-81.
 233. Liu J, Matyakhina L, Han Z, Sandrini F, Bei T, Stratakis CA, Papadopoulos V: **Molecular cloning, chromosomal localization of human peripheral-type benzodiazepine receptor and PKA regulatory subunit type 1A (PRKAR1A)-**

- associated protein PAP7, and studies in PRKAR1A mutant cells and tissues. *FASEB J* 2003, **17**(9):1189-1191.
234. Nadeau V, Guillemette S, Belanger LF, Jacob O, Roy S, Charron J: **Map2k1 and Map2k2 genes contribute to the normal development of syncytiotrophoblasts during placentation.** *Development* 2009, **136**(8):1363-1374.
 235. Frendo JL, Therond P, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D: **Implication of copper zinc superoxide dismutase (SOD-1) in human placenta development.** *Ann N Y Acad Sci* 2002, **973**:297-301.
 236. Kim S, Nie H, Nesin V, Tran U, Outeda P, Bai CX, Keeling J, Maskey D, Watnick T, Wessely O *et al*: **The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling.** *Nat Cell Biol* 2016, **18**(7):752-764.
 237. Lee JE, Jeon IS, Han NE, Song HJ, Kim EG, Choi JW, Song KD, Lee HK, Choi JK: **Ubiquitin 1 interacts with Orai1 to regulate calcium mobilization.** *Mol Cells* 2013, **35**(1):41-46.
 238. Trollmann R, Rehrauer H, Schneider C, Krischke G, Huemmler N, Keller S, Rascher W, Gassmann M: **Late-gestational systemic hypoxia leads to a similar early gene response in mouse placenta and developing brain.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, **299**(6):R1489-1499.
 239. Zheng Q, Gan H, Yang F, Yao Y, Hao F, Hong L, Jin L: **Cytoplasmic m(1)A reader YTHDF3 inhibits trophoblast invasion by downregulation of m(1)A-methylated IGF1R.** *Cell Discov* 2020, **6**:12.
 240. Chen Y, Cai T, Yang C, Turner DA, Giovannucci DR, Xie Z: **Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated calcium release by the Na/K-ATPase in cultured renal epithelial cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(2):1128-1136.
 241. Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, Race V, Bammens R, Morelle W, Rosnoblet C, Legrand D *et al*: **TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation.** *Am J Hum Genet* 2012, **91**(1):15-26.
 242. Liu C, Weng H, Chen L, Yang S, Wang H, Debnath G, Guo X, Wu L, Mohandas N, An X: **Impaired intestinal calcium absorption in protein 4.1R-deficient mice due to altered expression of plasma membrane calcium ATPase 1b (PMCA1b).** *J Biol Chem* 2013, **288**(16):11407-11415.
 243. Komarova YA, Huang F, Geyer M, Daneshjou N, Garcia A, Idalino L, Kreutz B, Mehta D, Malik AB: **VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions.** *Mol Cell* 2012, **48**(6):914-925.
 244. Choi S, Quan X, Bang S, Yoo H, Kim J, Park J, Park KS, Chung J: **Mitochondrial calcium uniporter in Drosophila transfers calcium between the endoplasmic reticulum and mitochondria in oxidative stress-induced cell death.** *J Biol Chem* 2017, **292**(35):14473-14485.
 245. Page NM, Butlin DJ, Lomthaisong K, Lowry PJ: **The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution.** *Genomics* 2001, **74**(1):71-78.
 246. Blaise S, de Parseval N, Benit L, Heidmann T: **Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(22):13013-13018.

247. Simpson ER, MacDonald PC: **Endocrine physiology of the placenta.** *Annu Rev Physiol* 1981, **43**:163-188.
248. Moreau R, Daoud G, Bernatchez R, Simoneau L, Masse A, Lafond J: **Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1564**(2):325-332.
249. Miura S, Sato K, Kato-Negishi M, Teshima T, Takeuchi S: **Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6.** *Nat Commun* 2015, **6**:8871.
250. Dubey R, Malhotra SS, Gupta SK: **Forskolin-mediated BeWo cell fusion involves down-regulation of miR-92a-1-5p that targets dysferlin and protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha.** *Am J Reprod Immunol* 2018, **79**(6):e12834.
251. Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz AL: **Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro.** *Exp Cell Res* 1990, **186**(2):306-316.
252. Klawitter D: **Expression und Analyse von TRPV6 in humanen Trophoblastenzelllinien.** In: Edited by Saarlandes Ud; 2023.
253. Singh H, Zhao M, Chen Q, Wang Y, Li Y, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S, Nie G: **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* 2015, **100**(7):E936-945.
254. Tseng E, Yee Teoh SS, Wang Y, Nie G: **Elevated protease HtrA4 in the maternal circulation of preeclampsia may contribute to endothelial barrier disruption by cleaving key junctional protein VE-cadherin.** *Placenta* 2019, **76**:51-53.
255. Villee DB: **Development of endocrine function in the human placenta and fetus (second of two parts).** *N Engl J Med* 1969, **281**(10):533-541.
256. Raven PH JG: **Biology.** In: *The Endocrine System.* edn.: Dubuque: McGraw-Hill; 2002: 1125–1146.
257. Yamanaka N, Marques G, O'Connor MB: **Vesicle-Mediated Steroid Hormone Secretion in Drosophila melanogaster.** *Cell* 2015, **163**(4):907-919.
258. Meuris S, Polliotti B, Robyn C, Lebrun P: **Ca²⁺ entry through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels stimulates the release of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen by placental explants.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1220**(2):101-106.
259. Williams JL, Fyfe GK, Sibley CP, Baker PN, Greenwood SL: **K⁺ channel inhibition modulates the biochemical and morphological differentiation of human placental cytotrophoblast cells in vitro.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, **295**(4):R1204-1213.
260. Palaniappan M, Menon KM: **Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-mediated activation of mTORC1 signaling is required for androgen synthesis by theca-interstitial cells.** *Mol Endocrinol* 2012, **26**(10):1732-1742.
261. Kato Y, Braunstein GD: **Discordant secretion of placental protein hormones in differentiating trophoblasts in vitro.** *J Clin Endocrinol Metab* 1989, **68**(4):814-820.
262. Rogers LM, Huggins M, Doster RS, Omega JI, Gaddy JA, Eastman A, Aronoff DM: **Impact of Metabolic Stress on BeWo Syncytiotrophoblast Function.** *Chembiochem* 2023, **24**(24):e202300410.
263. Rat P, Leproux P, Fouyet S, Olivier E: **Forskolin Induces Endocrine Disturbance in Human JEG-3 Placental Cells.** *Toxics* 2022, **10**(7).

264. Bataa M, Abdelmessih E, Hanna F: **Exploring Progesterone Deficiency in First-Trimester Miscarriage and the Impact of Hormone Therapy on Foetal Development: A Scoping Review.** *Children (Basel)* 2024, **11**(4).
265. Morley LC, Simpson N, Tang T: **Human chorionic gonadotrophin (hCG) for preventing miscarriage.** *Cochrane Database Syst Rev* 2013, **2013**(1):CD008611.
266. Fernandez H, Bouyer J, Coste J, Job-Spira N: **The hidden side of ectopic pregnancy: the hormonal factor.** *Hum Reprod* 1996, **11**(2):243-244.
267. Shao R, Feng Y, Zou S, Weijdegard B, Wu G, Brannstrom M, Billig H: **The role of estrogen in the pathophysiology of tubal ectopic pregnancy.** *Am J Transl Res* 2012, **4**(3):269-278.
268. Dimitriadis E, Rolnik DL, Zhou W, Estrada-Gutierrez G, Koga K, Francisco RPV, Whitehead C, Hyett J, da Silva Costa F, Nicolaides K *et al*: **Pre-eclampsia.** *Nat Rev Dis Primers* 2023, **9**(1):8.
269. Dickson WM, Bosc MJ, Locatelli A: **Effect of estrogen and progesterone on uterine blood flow of castrate sows.** *Am J Physiol* 1969, **217**(5):1431-1434.
270. Parekh AB, Putney JW, Jr.: **Store-operated calcium channels.** *Physiol Rev* 2005, **85**(2):757-810.
271. Smyth JT, Hwang SY, Tomita T, DeHaven WI, Mercer JC, Putney JW: **Activation and regulation of store-operated calcium entry.** *J Cell Mol Med* 2010, **14**(10):2337-2349.
272. Jiang Q, Zhao Q, Chen Y, Ma C, Peng X, Wu X, Liu X, Wang R, Hou S, Kong L *et al*: **Galectin-3 impairs calcium transients and beta-cell function.** *Nat Commun* 2024, **15**(1):3682.
273. Vikis HG, Stewart S, Guan KL: **SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms.** *Oncogene* 2002, **21**(15):2425-2432.
274. Kikuchi A, Kaibuchi K, Hori Y, Nonaka H, Sakoda T, Kawamura M, Mizuno T, Takai Y: **Molecular cloning of the human cDNA for a stimulatory GDP/GTP exchange protein for c-Ki-ras p21 and smg p21.** *Oncogene* 1992, **7**(2):289-293.
275. Berg TJ, Gastonguay AJ, Lorimer EL, Kuhnmuench JR, Li R, Fields AP, Williams CL: **Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization.** *J Biol Chem* 2010, **285**(46):35255-35266.
276. Hamel B, Monaghan-Benson E, Rojas RJ, Temple BR, Marston DJ, Burrridge K, Sondek J: **SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC.** *J Biol Chem* 2011, **286**(14):12141-12148.
277. Shimizu H, Toma-Fukai S, Saijo S, Shimizu N, Kontani K, Katada T, Shimizu T: **Structure-based analysis of the guanine nucleotide exchange factor SmgGDS reveals armadillo-repeat motifs and key regions for activity and GTPase binding.** *J Biol Chem* 2017, **292**(32):13441-13448.
278. An Haack K, Narayan SB, Li H, Warnock A, Tan L, Bennett MJ: **Screening for calcium channel modulators in CLN3 siRNA knock down SH-SY5Y neuroblastoma cells reveals a significant decrease of intracellular calcium levels by selected L-type calcium channel blockers.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1810**(2):186-191.
279. Chandrachud U, Walker MW, Simas AM, Heetveld S, Petcherski A, Klein M, Oh H, Wolf P, Zhao WN, Norton S *et al*: **Unbiased Cell-based Screening in a Neuronal Cell Model of Batten Disease Highlights an Interaction between Ca²⁺ Homeostasis, Autophagy, and CLN3 Protein Function.** *J Biol Chem* 2015, **290**(23):14361-14380.

280. Shumilina E, Zemtsova IM, Heise N, Schmid E, Eichenmuller M, Tyan L, Rexhepaj R, Lang F: **Phosphoinositide-dependent kinase PDK1 in the regulation of Ca²⁺ entry into mast cells.** *Cell Physiol Biochem* 2010, **26**(4-5):699-706.
281. Nilius B, Prenen J, Hoenderop JG, Vennekens R, Hoefs S, Weidema AF, Droogmans G, Bindels RJ: **Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3.** *J Biol Chem* 2002, **277**(34):30852-30858.
282. Voets T, Janssens A, Prenen J, Droogmans G, Nilius B: **Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6.** *J Gen Physiol* 2003, **121**(3):245-260.
283. Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B: **Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel.** *J Biol Chem* 2004, **279**(15):15223-15230.
284. Almidani E, Elsidawi W, Almohamedi A, Bin Ahmed I, Alfadhel A: **Case Report of Transient Neonatal Hyperparathyroidism: Medically Free Mother.** *Cureus* 2020, **12**(2):e7000.
285. Mason AE, Grier D, Smithson SF, Burren CP, Gradhand E: **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* 2020, **21**(1):64.
286. Nett V, Erhardt N, Wyatt A, Wissenbach U: **Human TRPV6-pathies caused by gene mutations.** *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2021, **1865**(6):129873.
287. Wang J, Mayernik L, Schultz JF, Armant DR: **Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts.** *Development* 2000, **127**(1):33-44.
288. Niger C, Malassine A, Cronier L: **Calcium channels activated by endothelin-1 in human trophoblast.** *J Physiol* 2004, **561**(Pt 2):449-458.
289. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Russo R, De Falco L, Vallefuoco F, Esposito MR, Vandrope DH, Shmukler BE *et al*: **Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1.** *Blood* 2013, **121**(19):3925-3935, S3921-3912.
290. Garcia-Elias A, Mrkonjic S, Pardo-Pastor C, Inada H, Hellmich UA, Rubio-Moscardo F, Plata C, Gaudet R, Vicente R, Valverde MA: **Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(23):9553-9558.
291. Stephanou A, Ross R, Handwerger S: **Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.** *Endocrinology* 1994, **135**(6):2651-2656.
292. Barrera D, Avila E, Hernandez G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, Diaz L: **Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, **103**(3-5):529-532.
293. Barrera D, Chirinos M, Garcia-Becerra R: **[Mechanism of regulation of synthesis and secretion of human chorionic gonadotropin (hCG) during pregnancy].** *Rev Invest Clin* 2008, **60**(2):124-132.
294. Xie T, Ho SL, Ramsden D: **Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription.** *Mol Pharmacol* 1999, **56**(1):31-38.

295. Jiang H, Xie T, Ramsden DB, Ho SL: **Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol.** *Neuropharmacology* 2003, **45**(7):1011-1018.
296. John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC: **Annexin 1 and the regulation of endocrine function.** *Trends Endocrinol Metab* 2004, **15**(3):103-109.
297. McArthur S, Yazid S, Christian H, Sirha R, Flower R, Buckingham J, Solito E: **Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization.** *FASEB J* 2009, **23**(11):4000-4010.
298. Nie X, Jin H, Wen G, Xu J, An J, Liu X, Xie R, Tuo B: **Estrogen Regulates Duodenal Calcium Absorption Through Differential Role of Estrogen Receptor on Calcium Transport Proteins.** *Dig Dis Sci* 2020, **65**(12):3502-3513.
299. Lee GS, Jeung EB: **Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293**(1):E132-138.
300. Stenhouse C, Halloran KM, Newton MG, Gaddy D, Suva LJ, Bazer FW: **Novel mineral regulatory pathways in ovine pregnancy: II. Calcium-binding proteins, calcium transporters, and vitamin D signaling.** *Biol Reprod* 2021, **105**(1):232-243.
301. Kovacs CS: **Bone development and mineral homeostasis in the fetus and neonate: roles of the calciotropic and phosphotropic hormones.** *Physiol Rev* 2014, **94**(4):1143-1218.
302. Nabeshima Y, Imura H: **alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis.** *Am J Nephrol* 2008, **28**(3):455-464.
303. Khalil R, Kim NR, Jardi F, Vanderschueren D, Claessens F, Decallonne B: **Sex steroids and the kidney: role in renal calcium and phosphate handling.** *Mol Cell Endocrinol* 2018, **465**:61-72.
304. Karki T, Rajakyla EK, Acheva A, Tojkander S: **TRPV6 calcium channel directs homeostasis of the mammary epithelial sheets and controls epithelial mesenchymal transition.** *Sci Rep* 2020, **10**(1):14683.
305. Khattar V, Wang L, Peng JB: **Calcium selective channel TRPV6: Structure, function, and implications in health and disease.** *Gene* 2022, **817**:146192.
306. Sandeep TC, Walker BR: **Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases.** *Trends Endocrinol Metab* 2001, **12**(10):446-453.
307. Togher KL, Togher KL, O'Keeffe MM, O'Keeffe MM, Khashan AS, Khashan AS, Gutierrez H, Gutierrez H, Kenny LC, Kenny LC *et al*: **Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development.** *Epigenetics* 2014, **9**(6):816-822.
308. Dy J, Guan H, Sampath-Kumar R, Richardson BS, Yang K: **Placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is reduced in pregnancies complicated with idiopathic intrauterine growth Restriction: evidence that this is associated with an attenuated ratio of cortisone to cortisol in the umbilical artery.** *Placenta* 2008, **29**(2):193-200.
309. Seckl JR, Holmes MC: **Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007, **3**(6):479-488.

310. Au WY: **Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture.** *Science* 1976, **193**(4257):1015-1017.
311. Lanna CM, Paula FJ, Montenegro RM, Jr., Moreira AC, Foss MC: **Parathyroid hormone secretion in chronic human endogenous hypercortisolism.** *Braz J Med Biol Res* 2002, **35**(2):229-236.
312. Mazzocchi G, Aragona F, Malendowicz LK, Nussdorfer GG: **PTH and PTH-related peptide enhance steroid secretion from human adrenocortical cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **280**(2):E209-213.
313. Conaway HH, Henning P, Lie A, Tuckermann J, Lerner UH: **Glucocorticoids employ the monomeric glucocorticoid receptor to potentiate vitamin D(3) and parathyroid hormone-induced osteoclastogenesis.** *FASEB J* 2019, **33**(12):14394-14409.
314. Swanson C, Lorentzon M, Conaway HH, Lerner UH: **Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones.** *Endocrinology* 2006, **147**(7):3613-3622.
315. Matsumoto J, Ariyoshi N, Ishii I, Kitada M: **Functional characterization of seven single-nucleotide polymorphisms of the steroid sulfatase gene found in a Japanese population.** *J Hum Genet* 2013, **58**(5):267-272.