



Charakterisierung der N-terminal verlängerten Isoform des humanen TRPV6-Ionenkanals in einem Überexpressionsmodell

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Anett Pomowski

aus

Elsterwerda

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
2. Referentin: Prof. Dr. Petra Kioschis-Schneider
Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	2
Abstract.....	4
1 Einleitung	6
1.1 Die Familie der Transient Rezeptor Potential (TRP) Ionenkanäle.....	6
1.2 Die TRPV-Unterfamilie.....	9
1.3 Der TRPV6-Ionenkanal.....	10
1.3.1 Lokalisation und Expression des TRPV6-Ionenkanals	10
1.3.2 Proteinstruktur	14
1.3.3 Regulation des TRPV6-Ionenkanals	19
1.3.4 Der TRPV6-Ionenkanal in der Pathologie	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Materialien	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.3 Proteinanalytische Methoden	42
2.4 Zellbiologische Methoden	44
2.5 Bildanalyse	58
2.6 Statistische Datenanalyse.....	63
3 Ergebnisse	65
3.1 Etablierung von Zelllinien mit induzierbarer Expression des humanen TRPV6-Ionenkanals	65
3.2 Identifizierung von Zellklonen mit regulierter hTRPV6 Expression.....	67
3.3 Charakterisierung der generierten CHO-TetOne-hTRPV6 Zelllinien.....	71
3.3.1 Nachweis der hTRPV6-mCherry Expression mittels Westernblot.....	72
3.3.2 Subzelluläre Lokalisation der kurzen und langen hTRPV6-mCherry-Isoformen ...	73
3.3.3 Heterologe hTRPV6-Expression: konzentrations- und zeitabhängige Induktion mit Doxzyklin.....	74
3.3.4 Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf die Morphologie und die Vitalität der rekombinanten Zellen	77
3.3.5 Einfluss der hTRPV6-Expression auf das Wachstumsverhalten.....	79
3.4 Fluorometrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in den hTRPV6-Zellmodellen	81
3.4.1 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von hTRPV6-Überexpression und Thapsigargin-Behandlung.....	82

3.4.2	Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Thapsigargin-Konzentration und -Behandlungsdauer.....	87
3.4.3	Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in den TRPV6-Zelllinien in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_e$	90
3.4.4	hTRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in Abhängigkeit des extrazellulären pH-Wertes	94
3.5	Analyse hTRPV6-mCherry positiver, intrazellulärer Vesikel	98
3.5.1	Lokalisationsanalyse der Isoformen des hTRPV6-mCherry-Ionenkanals mittels endosomaler Markerproteine	99
3.5.2	Vergleichende Analyse der Größe, Anzahl und Lokalisation der TRPV6-mCherry-positiven Vesikel	101
3.5.3	Einfluss der $[Ca^{2+}]_e$ auf TRPV6-mCherry-positive Vesikel.....	104
3.5.4	Einfluss einer Thapsigargin-vermittelten Ca^{2+} -Speicherentleerung auf TRPV6-mCherry enthaltende Vesikel	107
3.5.5	Einfluss des pH_e auf die hTRPV6-mCherry-positiven Vesikel.....	110
3.6	Einfluss der hTRPV6-Überexpression hinsichtlich Migration und Invasion in den Zellmodellen	113
3.6.1	Die Überexpression von hTRPV6 in den Zellmodellen aktiviert den NFAT Signalweg	113
3.6.2	Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf das Migrationspotenzial der TRPV6-Zelllinien	115
3.6.3	Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf das Invasionspotenzial der TRPV6-Zelllinien	120
3.7	Pharmakologische Inhibition der hTRPV6-Isoformen	122
4	Diskussion	126
4.1	CHO-K1 Überexpressionsmodell mit Tet-On regulierbarer hTRPV6-Expression.....	128
4.2	Vergleichende Funktionsanalysen der hTRPV6-Isoformen im Überexpressionsmodell	131
4.2.1	Der Einfluss der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher auf die Aktivität der hTRPV6-Isoformen	131
4.2.2	Einfluss der extrazellulären Parameter $[Ca^{2+}]_e$ und pH_e auf den hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom	136
4.2.3	Vergleichende Analysen der subzellulären Lokalisation und Vesikelverteilung der hTRPV6-Isoformen	138
4.3	NFAT-Aktivierung, Migration und Invasion bei hTRPV6-Überexpression	142
4.4	Vergleich von IC_{50} -Werten der Inhibitoren Ruthenium Red, La^{3+} , 2-APB und SOR-C13 in den hTRPV6-Zellen	146
5	Schlussfolgerung.....	150
6	Literaturverzeichnis.....	152

7 Anhang 163

Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
$[Ca^{2+}]_e$	extrazelluläre Calciumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
Dox	Doxyzyklin
EK	Einzelklon
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
pH _e	extrazellulärer pH-Wert
RR	Ruthenium Red
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (engl.: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Calcium ATPase)
SOCC	speichergesteuerter Calcium-Kanal (engl.: store-operated calcium channel)
SOCE	speichergesteuerter Calcium-Einstrom (engl.: store-operated calcium entry)
Stabw	Standardabweichung
Tet	Tetrazyklin
TRP	Transient Rezeptor Potential
TRPV6	Transient Rezeptor Potential Vanilloid Kanal 6
ULA	Ultra Low Attachment
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: untranslated region)
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Superfamilie der Transient Receptor Potential (TRP)-Ionenkanäle ist eine große Gruppe von Kationenkanälen, die in einer Vielzahl fundamentaler physiologischer Prozesse involviert sind. Innerhalb der TRP-Familie weist der TRPV6- (Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Member 6), neben dem TRPV5-Ionenkanal, die größte Selektivität für Ca^{2+} auf ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$). Der TRPV6-Ionenkanal ist in apikalen Membranen von Ca^{2+} -transportierenden Epithelien verschiedener Gewebe unterschiedlich stark exprimiert und spielt in der Aufnahme von Calcium-Ionen eine wichtige Rolle. Eine veränderte TRPV6-Expression ist mit einer Reihe verschiedener Erkrankungen, einschließlich zahlreicher Tumorarten, assoziiert.

Die Translation des humanen TRPV6-Proteins wird an einem nicht-kanonischen ACG-Startcodon initiiert, das 120 Nukleotide stromaufwärts, im gleichen Leseraster des ersten kanonischen AUG-Startcodons liegt. Das resultierende humane full-length TRPV6-Protein besteht aus 765 Aminosäuren (NM_018646). Das zunächst annotierte Protein mit 725 Aminosäuren stellt somit eine N-terminale Deletionsvariante dar. Die Sequenz der zusätzlichen 40 Aminosäuren weist keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinsequenzen auf. Die heterologe Expression des full-length TRPV6-Proteins als auch der Deletionsvariante führte in Säugetier-Zelllinien zu funktionellen Ionenkanälen. Mit der vorliegenden Dissertation wurde das Ziel verfolgt, die Ionenkanal-Eigenschaften des humanen full-length TRPV6-Proteins und der TRPV6-Deletionsvariante in lebenden Zellen vergleichend zu analysieren und dadurch Hinweise auf mögliche Funktionen der zusätzlichen 40 N-terminalen Aminosäuren zu erhalten. Dazu wurden TetOn-regulierbare, stabile Zelllinien entwickelt, die das humane full-length TRPV6-Protein bzw. die TRPV6-Deletionsvariante als Fusionsprotein mit einem C-terminalen mCherry-Fluoreszenztag exprimierten. Durch die stabile, regulierbare Expression in CHO-K1-Zellen konnte eine bessere Vergleichbarkeit der Daten erzielt werden. Das TRPV6-mCherry-Fusionsprotein erlaubte die Quantifizierung der hTRPV6-Überexpression parallel zum Calcium-Imaging als auch subzelluläre Lokalisationsstudien. Bei gleicher Doxyzyklin-Induktion war die Deletionsvariante 3-fach höher exprimiert als das full-length TRPV6-Protein. Beide Varianten der TRPV6-Ionenkanäle waren in den Überexpressionsmodellen funktionell aktiv.

Die Bestimmung der Aktivität der in den stabilen Zelllinien exprimierten humanen TRPV6-Ionenkanäle bzw. der deletierten Ionenkanalvariante erfolgte durch nicht-ratiometrische Bestimmung der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Für die Analysen wurde ein Flusskammermodell etabliert. Die Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in den Zellmodellen in Abhängigkeit von der durch Doxyzyklin-induzierten TRPV6-Expressionshöhe und einer

Thapsigargin-Behandlung zur Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher sowie abhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$), des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) und von TRPV6-Antagonisten durchgeführt. Die resultierenden, durch TRPV6-vermittelten Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnten durch Calcium-Imaging sehr gut aufgelöst und verglichen werden. Durch die internen Kontrollen war es möglich, Ca^{2+} -Einströme, die nicht durch TRPV6-Ionenkanäle vermittelt wurden, zu quantifizieren. Aus den vergleichenden Analysen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte abgeleitet werden, dass die humanen full-length TRPV6-Ionenkanäle nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_e$ und pH_e schneller und stärker inhibiert werden als die TRPV6-Deletionsvariante. Bei der pharmakologischen Testung der Zellen mit den Antagonisten Ruthenium Red, La^{3+} , 2-APB und SOR-C13 waren die IC_{50} -Werte für den TRPV6-spezifischen Peptid-Inhibitor SOR-C13 auffallend unterschiedlich: in den Zellen mit Expression der TRPV6-Deletionsvariante war der IC_{50} -Wert 71-fach niedriger als in Zellen mit Expression der full-length TRPV6-Ionenkanäle.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Überexpression der TRPV6-Ionenkanäle auf Ca^{2+} -abhängige zellphysiologische, einschließlich pathophysiologischer Prozesse, wie Vesikeltransport, Proliferation, Migration, Invasion und Aktivierung des NFAT-Signalwegs untersucht. Bei der Analyse des Vesikeltransportes ergaben sich erste Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der beiden TRPV6-Varianten. Die TRPV6-Deletionsvariante war stärker mit Rab7 kolokalisiert, während das full-length TRPV6-Protein eine stärkere Kolokalisation mit Rab11 aufwies.

Die Analyse einer TRPV6-vermittelten Aktivierung des NFAT-Signalweges erfolgte auf der Basis eines Luciferase-Assays. Beide TRPV6-Varianten aktivierten den NFAT-Signalweg, allerdings war die NFAT-Aktivierung durch die Deletionsvariante im Vergleich zum full-length TRPV6 2-fach höher. Die Überexpression der beiden TRPV6-Varianten führte weiterhin zu einer 1,4-fach erhöhten Migrationsgeschwindigkeit der Zellen.

In Zusammenfassung aller gezeigten Resultate konnten signifikante, funktionelle Unterschiede zwischen der TRPV6 Deletionsvariante und dem full-length TRPV6-Ionenkanal ermittelt werden, die anzeigen, dass die zusätzlichen 40 Aminosäuren der verlängerten N-terminalen Region einen Einfluss auf die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Ionenkanals sowie auf die NFAT-Aktivierung haben. Darüber hinaus weisen die IC_{50} -Werte für den SOR-C13 Inhibitor darauf hin, dass der full-length TRPV6-Ionenkanal im Vergleich zur Deletionsvariante möglicherweise eine unterschiedliche Konformation einnimmt, die die Bindung des Peptid-Inhibitors erschwert.

Abstract

The superfamily of transient receptor potential (TRP) ion channels constitute a large group of cation channels contributing to a variety of fundamental physiological processes. Within the TRP family, the TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Member 6) and its close homolog TRPV5 are unique among all TRP channels because of their high selectivity for Ca^{2+} over monovalent cations ($P_{\text{Ca}} / P_{\text{Na}} > 100$). TRPV6 is known to be expressed in the apical membrane of Ca^{2+} -transporting epithelial tissues in various amounts and plays an important role in the absorption of calcium ions. Aberrant expression of TRPV6 channels results in various diseases, including numerous types of cancer.

Translation initiation for the human TRPV6 protein occurs at a non-canonical ACG start codon located 120 nucleotides upstream in an overlapping reading frame of the first canonical AUG start codon. The resulting human full-length TRPV6 protein consists of 765 amino acids (NM_018646). The originally annotated protein with 725 amino acids in length thus represents an N-terminal deletion variant. The additional 40 amino acids shared no similarity to any known protein sequence. Heterologous expression of full-length TRPV6 as well as the deletion variant resulted in functional ion channels in mammalian cell lines.

The aim of the work described in this thesis was to compare the ion channel properties of the human full-length TRPV6 protein with those of the TRPV6 deletion variant in living cells in order to elucidate possible functions of the additional 40 N-terminal amino acids. Thus, a stable expression system was developed to express a C-terminal tagged human TRPV6-mCherry fusion protein. Using stable expression of TRPV6 variants in CHO-K1 cell lines increases reproducibility and comparability of data, as it eliminates the variation associated with repeated transient transfection. The expression of a chimera that consists of a fluorescent mCherry conjugated with TRPV6 provided the ability to quantify hTRPV6 expression simultaneously to calcium imaging as well as to perform subcellular localisation studies.

Following induction with equal doxycycline concentrations, cells expressing the TRPV6 deletion variant showed a threefold higher expression than the full-length TRPV6 protein. The expression of functional TRPV6 channels for both variants were proven. Non-ratiometric calcium imaging was used to determine activity of the expressed TRPV6 ion channel variants. A flow chamber model was established for the analysis. Changes in intracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were imaged in response to doxycycline induction and thapsigargin treatment depleting Ca^{2+} stores in the ER, as well as in response to extracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$), extracellular pH (pH_e), and TRPV6-antagonists, respectively. The resulting changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediated by TRPV6 could be

very well resolved and compared. Internal controls allowed to discriminate and quantify Ca^{2+} influx not mediated by TRPV6 ion channels. Comparative analysis of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ revealed differences between the two TRPV6 variants. Increases of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_e$ und pH_e inhibited the Ca^{2+} -influx mediated by the full-length TRPV6 ion channel faster and more strongly than those of the TRPV6 deletion variant.

Extracellular application of channel blockers Ruthenium Red, La^{3+} , 2-APB and SOR-C13 revealed substantial differences of the TRPV6-specific peptide inhibitor SOR-C13: The IC_{50} value was 71-fold lower in cells expressing the TRPV6 deletion variant compared to cells expressing the full-length TRPV6 ion channel.

In addition, influences in Ca^{2+} -sensitive physiological, including pathophysiological cellular processes like vesicle trafficking, proliferation, migration, invasion and activation of the NFAT pathway upon overexpression of ion channel variants were investigated. The results represent preliminary findings that overexpression of the TRPV6 ion channels variants might modulate vesicle trafficking in the cell model. The TRPV6 deletion variant colocalized with Rab7, whereas the the full-length TRPV6 protein more frequently colocalized with Rab11.

To determine whether the overexpression of TRPV6 ion channels activates downstream NFAT pathway an NFAT-specific luciferase assay was performed. Activation of TRPV6 expression in the cell models induced a 4-fold increase mediated by the TRPV6 deletion variant and a 2-fold increase mediated by the full-length TRPV6 ion channel, respectively. Furthermore, the overexpression of the TRPV6 ion channel induced a 1.4-fold increase of migration rate.

In summary, the results indicate significant differences between the TRPV6 deletion variant and the full-length TRPV6 ion channel indicating the functional influence of the 40 amino acids extended N-terminal region on the overall TRPV6 ion channel function. This includes the Ca^{2+} -mediated inactivation of the ion channel as well as the NFAT activation. Furthermore, the different potencies of SOR-C13 on inhibiting the TRPV6 deletion variant and the full-length TRPV6 ion channel, respectively, may reflect a different conformation of the full-length TRPV6 ion channel thereby leading to limited binding capacities of the TRPV6-specific inhibitor.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Transient Rezeptor Potential (TRP) Ionenkanäle

Der TRPV6-Ionenkanal gehört zur Transient Rezeptor Potential (TRP)-Familie. Der erste TRP-Ionenkanal wurde im Jahr 1989 in Photorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und kloniert (Cosens & Manning, 1969). In den Photorezeptorzellen ist der TRP-Ionenkanal in die Phototransduktion involviert und führt durch einen Phospholipase C (PLC)-abhängigen Calcium (Ca^{2+})-Einstrom zu einem langanhaltenden Rezeptorpotenzial. Eine Mutation im *trp-locus* führte dazu, dass die Photorezeptoren der betroffenen Fliegen mit einem kurzen, „transienten“ Potenzial auf einen längeren, intensiven Lichtreiz reagierten. Dieses Verhalten führte zur Bezeichnung *transient receptor potential* (Minke, 2010; Pan *et al.*, 2011). Vor der Entdeckung des TRP-Ionenkanals waren zwei Hauptklassen von Ca^{2+} -permeablen Kanälen bekannt: Spannungsabhängige und ligandengesteuerte Ionenkanäle. Die TRP-Superfamilie gehört keiner der beiden Klassen an und repräsentiert somit eine neue Klasse von Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen (Minke, 2010).

Seit der Entdeckung des TRP-Gens in *Drosophila* wurde eine große Anzahl weiterer Mitglieder der TRP-Familie vor allem aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien identifiziert (Pan *et al.*, 2011). Heutzutage sind insgesamt 28 Mitglieder der TRP-Familie in Säugetieren bekannt, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie in sechs Unterfamilien unterteilt werden können: TRPC (canonical oder classic), TRPV (vanilloid), TRPA (ankyrin), TRPM (melastatin), TRPP

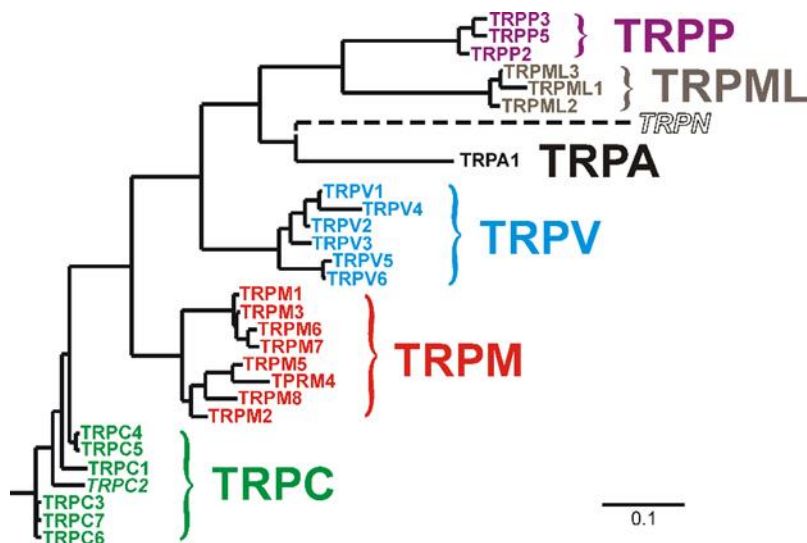


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der TRP-Familie in Säugetieren. Basierend auf Sequenzhomologien werden insgesamt 28 Mitglieder der TRP-Familie in sechs Unterfamilien unterteilt. Innerhalb der jeweiligen Unterfamilien bestehen sehr ähnliche Sequenzcharakteristika, welche zwischen den einzelnen Familien deutlich geringer sind (verändert nach Nilius *et al.*, 2005).

(polycystin) und TRPML (mucolipin) (Abbildung 1). Die TRP-Unterfamilien TRPC, TRPV, TRPA und TRPM teilen wesentliche Sequenzhomologien in der Transmembrandomäne und weisen die stärkste Homologie zum *Drosophila* TRP-Ionenkanal auf. Zu den TRP-Unterfamilien TRPP und TRPML sind sie nur entfernt verwandt (Gees *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011; Venkatachalam & Montell, 2007).

Die Mitglieder der TRP-Superfamilie weisen alle eine gleiche Grundstruktur auf. Sie sind aus sechs Transmembransegmenten, einer Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Segment und einem intrazellulären N- und C-Terminus aufgebaut (Abbildung 2). Unterschiede zwischen den Mitgliedern der einzelnen Unterfamilien beruhen auf der Länge der cytosolischen Enden sowie den darin enthaltenen strukturellen und funktionellen Domänen (Gees *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011; Clapham *et al.*, 2001). Diese N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen sind der Schlüssel für die funktionell wichtigen Interaktionen mit anderen Proteinen (Madej & Ziegler, 2018). Um funktionelle Ionenkanäle zu bilden, lagern sich jeweils vier TRP-Kanäle symmetrisch um eine Porenachse an und bilden somit ein Homotetramer. (Pan *et al.*, 2011; Clapham, 2003; Singh *et al.*, 2017). Nahe miteinander verwandte TRP-Ionenkanäle, wie beispielsweise der TRPV5- und TRPV6-Kanal, sind zudem in der Lage Heteromultimere zu bilden (Venkatachalam & Montell, 2007).

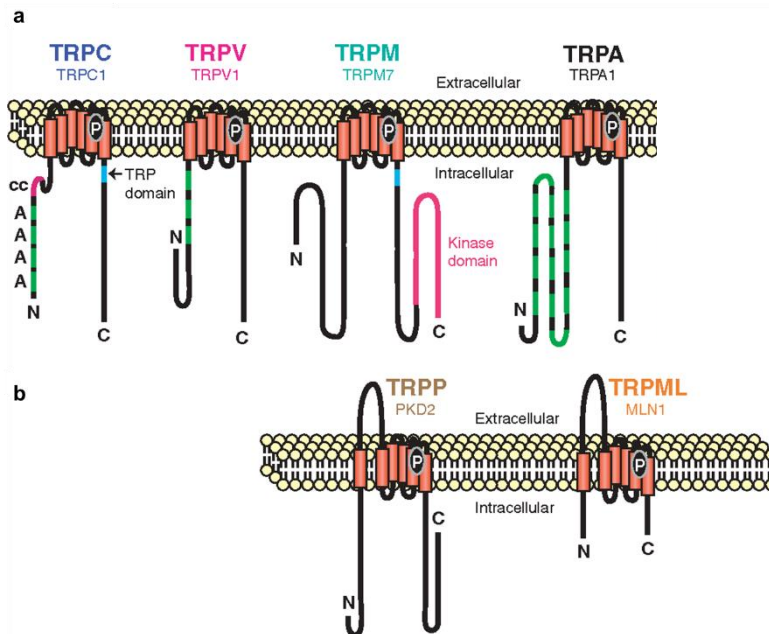


Abbildung 2: Domänenstruktur der TRP-Superfamilie. Es befinden sich vier Unterfamilien in Gruppe 1 (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA) (a) und zwei Unterfamilien in Gruppe 2 (TRPP, TRPML) (b). Alle Unterfamilien sind aus sechs Transmembransegmenten mit einer für Kationen permeablen Pore zwischen dem fünften und sechsten Segment aufgebaut. Vier solcher Untereinheiten assemblieren zu einem Homo- oder Heteromer um einen funktionsfähigen TRP-Ionenkanal zu bilden. Domänenstrukturen: Ankyrin Repeat (A), Transmembrandomäne (TM), coiled coil domain (cc), TRP-Domäne (nur in TRPC-, TRPN- und TRPM-Kanälen), Proteinkinasedomäne (nur in TRPM7), großer extrazellulärer Loop zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 (in TRPP- und TRPML-Kanälen) (verändert nach Montell, 2005).

TRP-Ionenkanäle sind an sensorischen Wahrnehmungen, wie beispielsweise Temperatur, Druck, pH, Spannung, Osmolarität, Geruch, Geschmack, mechanischer Stress, Licht und Schmerz beteiligt (Hoenderop *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2017). Die Ionenkanäle können weiterhin durch intra- und extrazelluläre Botenstoffe aktiviert werden. Dazu zählen Lipide sowie deren Abbauprodukte, Sphingolipide, ATP, organische Phosphate, mono- und divalente Kationen sowie Menthol oder Spinnentoxine (Numata *et al.*, 2011). Die Mitglieder der TRP-Familie unterscheiden sich dabei sehr stark in ihrer Sensitivität und ihrem Aktivierungsmechanismus (Hoenderop *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2011). Während die TRPV-Ionenkanäle 1-4 durch Hitze aktiviert werden können, weist der TRPV6-Ionenkanal keine Thermo-Sensitivität, sondern eine konstitutive Aktivität auf, welche durch Patch-Clamp Versuche in HEK293-Zellen mit heterologer TRPV6-Expression nachgewiesen werden konnte (Vennekens *et al.*, 2000; Clapham, 2003). Die konstitutive Aktivität wird dabei folgendermaßen definiert: Der TRPV6-Ionenkanal ist bei physiologischen Membranpotenzialen in Abwesenheit eines bekannten Stimulus aktiv, was wiederum bedeutet, dass der beobachtete Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Kanal allein durch den Ca^{2+} -Gradienten zwischen dem intra- und extrazellulärem Raum (intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) = 100nM, extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) = 1mM) verursacht wird (Vennekens *et al.*, 2000; Lehen'kyi *et al.*, 2007).

Aufgrund ihrer multimodalen Aktivierbarkeit sind TRP-Ionenkanäle in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie der Sekretion von Flüssigkeiten, Elektrolyten und Hormonen (Gees *et al.*, 2010; Minke, 2010; Venkatachalam & Montell, 2007). Veränderungen der normalen physiologischen Funktion von TRP-Ionenkanälen wurden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht (Pan *et al.*, 2011). Mutationen im TRPML1-Gen führen zu Mucopolidose Typ IV, während eine Gain-of-function-Mutation im TRPC6-Gen im Falle einer Fokal segmentalen Glomerulosklerose detektiert wurde (Kim, 2014). Im Gegensatz dazu wurde die Überexpression von TRP-Ionenkanälen mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. In hepatozellulären Karzinomen konnte eine erhöhte TRPV2 mRNA- und Proteinexpression detektiert werden. In Darmkrebs, Prostatakrebs und speziellen Subtypen von Brustkrebs wurde hingegen eine Überexpression des TRPV6-Ionenkanals nachgewiesen (Liberati *et al.*, 2013). Aufgrund ihrer Bedeutung für die Zellphysiologie und Pathologie werden TRP-Kanäle als Zielmoleküle für die Diagnose sowie die Biomarker- und Wirkstoffentwicklung diskutiert (Venkatachalam & Montell, 2007).

1.2 Die TRPV-Unterfamilie

Der humane TRPV6-Ionenkanal ist der Transient Rezeptor Potential Vanilloid (TRPV)-Unterfamilie zugeordnet, welche insgesamt aus sechs Mitgliedern besteht: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 und TRPV6 (Venkatachalam & Montell, 2007). Namensgebend für die TRPV-Familie war der erste klonierte Vertreter dieser Familie, der TRPV1-Ionenkanal, der unter anderem durch das Vanilloid Capsaicin sowie weitere endogene Vanilloid-Substanzen aktiviert wird (Caterina *et al.*, 1997; Montell *et al.*, 2002; Gees *et al.*, 2010). Die Mitglieder der TRPV-Unterfamilie besitzen den für TRP-Ionenkanäle typischen Aufbau, bestehend aus sechs Transmembrandomänen, einer Porenregion sowie einem cytosolisch lokalisierten N- und C-Terminus. In der N-terminalen Domäne weisen TRPV-Ionenkanäle drei bis sechs Ankyrin-Repeats auf, die als Ankyrin-Repeat-Domäne zusammengefasst werden. Im Vergleich zu den klassischen TRP-Ionenkanälen (TRPC) fehlt den Mitgliedern der TRPV-Unterfamilie jedoch die C-terminal von der Transmembrandomäne TM6 gelegene TRP-Box (Venkatachalam & Montell, 2007).

Bei den Mitgliedern TRPV1-TRPV4 handelt es sich um temperatursensitive, Ca^{2+} -permeable, nicht-selektive Ionenkanäle. Der TRPV5- und der zu 75% homologe TRPV6-Ionenkanal grenzen sich sowohl durch ihre hohe Ca^{2+} -Selektivität ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$) als auch durch ihre Thermoinsensitivität und konstitutive Aktivität von den anderen Mitgliedern der TRPV-Unterfamilie ab (Owsianik *et al.*, 2006; Venkatachalam & Montell, 2007). Der TRPV5- und der TRPV6-Ionenkanal werden von zwei nebeneinander gelegenen Genen kodiert und sind wahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden (Müller *et al.*, 2000).

TRPV-Ionenkanäle werden sowohl in sensorischen als auch nicht-sensorischen Zellen von niederen und höheren Organismen exprimiert. So findet man TRPV-Ionenkanäle beispielsweise im Gehirn, sensorischen Neuronen, Lunge, Niere, Darm, Herz, Plazenta, Prostata und Pankreas (O'Neil & Heller, 2005).

Die TRPV-Ionenkanäle zeichnen sich durch multimodale Aktivierungsmechanismen aus und sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt. Für den TRPV1-Ionenkanal wurde die Beteiligung an der Regulierung der Körpertemperatur durch die Verwendung eines TRPV1-spezifischen Antagonisten nachgewiesen (Gavva *et al.*, 2007; Gavva *et al.*, 2008). Der TRPV2-Ionenkanal, dessen Expression in MIN-Zellen und primären β -Zellen der Maus nachgewiesen wurde, ist an der Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase beteiligt. Für diesen Ionenkanal konnte gezeigt werden, dass er infolge der Stimulation mit Insulin an die Plasmamembran wandert und, dass eine Inhibierung des TRPV2-Ionenkanals zu einer reduzierten Glucose-induzierten Insulinsekretion führt (Philippaert & Vennekens, 2015). Im Wundheilungsprozess ist der in

Keratinocyten exprimierte TRPV3-Ionenkanal involviert. Im Zuge dessen führt die Aktivierung des TRPV3-Ionenkanals zu einer verstärkten Migration von Keratinocyten und somit zu einer verbesserten Wundheilung (Sulk & Steinhoff, 2015). Dysfunktionen von TRPV-Ionenkanälen sind daher mit verschiedenen Krankheitsbildern korreliert, unter anderem mit der Tumorentstehung und -progression. Für den TRPV4-Ionenkanal wird zum Beispiel eine potentielle Rolle in der Angiogenese diskutiert, da infolge der Inhibierung des Ionenkanals eine verlangsamte Migration von Brustkrebs-Endothelzellen beobachtet werden konnte (Azimi *et al.*, 2014). Eine Expression der TRPV-Ionenkanäle 1, 2 und 4 konnte zudem in Glioblastoma nachgewiesen werden. Dabei korreliert die Expression des TRPV1-Ionenkanals umgekehrt mit dem „Glioma-Grading“. Durch die Untersuchung von „single-nucleotide polymorphisms“ (SNPs) konnte weiterhin gezeigt werden, dass zwei genspezifische TRPV3 SNPs mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko korrelieren (Liberati *et al.*, 2013). Im Falle des TRPV6-Ionenkanals wurde eine Überexpression in Prostata-, Darm-, Brust- und Eierstockkrebs nachgewiesen (Prevarskaya *et al.*, 2010).

Zusammenfassend werden TRPV-Ionenkanäle aufgrund ihrer Bedeutung in Tumorerkrankungen zunehmend als diagnostische Marker für die Prognose einer Tumorentwicklung, zur Einstufung der Aggressivität eines Tumors sowie als potentielle pharmakologische Zielstrukturen diskutiert (Liberati *et al.*, 2013). Für eine umfassende klinische und pharmakologische Nutzung der TRPV-Ionenkanäle muss jedoch zunächst die physiologische Rolle der TRPV-Kanäle in Normalgewebe sowie in Tumorgewebe aufgeklärt werden (Liberati *et al.*, 2013).

1.3 Der TRPV6-Ionenkanal

1.3.1 Lokalisation und Expression des TRPV6-Ionenkanals

Der TRPV6-Ionenkanal gehört zu der Vanilloid-Unterfamilie der TRP-Ionenkanäle und ist auch unter den Namen ECaC2, CaTL und CaT1 (Calcium-Transport-Protein Subtyp 1) bekannt (Gunthorpe *et al.*, 2002). Das humane *TRPV6*-Gen ist auf Chromosom 7q33-34 lokalisiert. Es besteht aus 15 Exons, wobei der 5'-UTR im ersten und der 3'-UTR im letzten Exon liegt.

1.3.1.1 Translationsstart

Sequenzanalysen des *TRPV6*-Gens in Säugetieren, Fischen und Amphibien haben gezeigt, dass der 5'-UTR stromaufwärts des ersten AUG-Startcodons innerhalb der Säugetiere sehr stark konserviert ist (Abbildung 3). Die Sequenzidentität ist dabei innerhalb der ersten 40 Aminosäuren

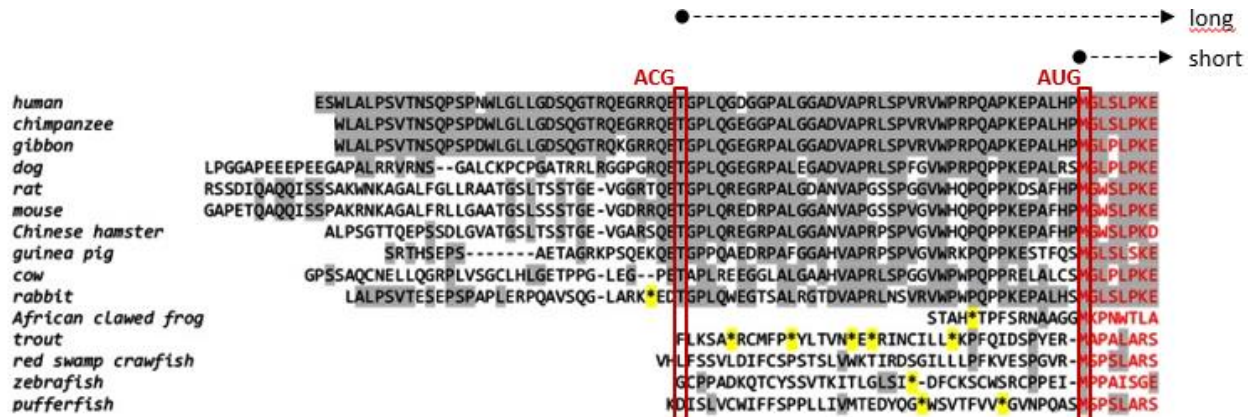


Abbildung 3: Multiple Sequenzalignments des translatierten 5'UTR des TRPV6-Ionenkanals in unterschiedlichen Organismen. Aminosäuren, die mit der menschlichen Sequenz übereinstimmen, sind grau hinterlegt. Der annotierte N-Terminus ist in Rot dargestellt. Stopcodons sind mit einem – markiert. Die ACG-Startseite ist innerhalb der Säugetiere sehr stark konserviert und führt zur Translation der langen TRPV6-Variante. Bei Fischen und Amphibien findet man hingegen nur die AUG-Startseite, die zur kurzen TRPV6-Variante führt (verändert nach Fecher-Trost *et al.*, 2013).

stromaufwärts des AUG-Codons am höchsten. Im Falle der Fische und Amphibien ist dieser Sequenzbereich hingegen nicht konserviert und enthält zahlreiche Stopcodons stromaufwärts des annotierten AUG-Codons. Diese Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass die Translation an einem alternativen Startcodon stattfinden könnte, was für Säugetiere durchaus bekannt ist, wofür jedoch nur wenige Beispiele publiziert sind (Fecher-Trost *et al.*, 2013; Kears & Wilusz, 2017). In Eukaryoten wird die Translation normalerweise am ersten AUG-Codon initiiert. Dabei bindet zunächst die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms, in einem Komplex mit den Initiationsfaktoren und der Met-tRNA_{iMet} als sogenannter 43S-Präinitiationskomplex an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Dieser Komplex wandert dann ATP-abhängig entlang der mRNA in Richtung 3'-Ende, bis die gebundene Met-tRNA_{iMet} mit dem Initiationscodon (normalerweise ein AUG) paart. Die Nukleotide in unmittelbarer Nachbarschaft zum AUG-Startcodon beeinflussen die Wahrscheinlichkeit, mit der der 43S-Präinitiationskomplex das Startcodon erkennt. Die optimale Nukleotidsequenz wird als Kozak-Sequenz bezeichnet und lautet: GCC(A/G)CCAUGG. Den größten Einfluss auf die Erkennung des Startcodons haben dabei die Nukleotide an den Positionen -3 (A/G) und +4 (G) (relativ zum A des AUG), da sie stabilisierende Interaktionen mit dem 43S-Präinitiationskomplex ausbilden (Kears & Wilusz, 2017).

Die Translation kann jedoch auch an alternativen Startcodons initiiert werden, die sich zum Beispiel lediglich in einem Nukleotid vom AUG-Codon unterscheiden (z.B. CUG, UUG, GUG, ACG, AUA und AUU). Die Translation an diesen Startcodons ist im Vergleich zur Translation am AUG-Startcodon weniger effizient. Die schwache Basenpaarung zwischen dem alternativen Startcodon und der Met-tRNA_{iMet} wird durch Interaktionen mit benachbarten Nukleotiden kompensiert. Daher sind für die Initiation der Translation an einem alternativen Startcodon die

Nukleotide unmittelbar um das Startcodon entscheidend. Lokale RNA-Strukturen, wie beispielsweise eine stabile Haarnadelstruktur 12-15 Nukleotide stromabwärts des Startcodons, können die Effizienz der Translationsinitiation an einem alternativen Startcodon erhöhen (Kearse & Wilusz, 2017; Ivanov *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009).

Im *TRPV6*-Gen erfüllt das ACG-Codon an Position -120 bis -118 stromaufwärts des ersten AUG-Codons die genannten Kriterien eines alternativen Startcodons. Das ACG-Codon befindet sich in einem Leseraster von *TRPV6* sowie in einem guten Kozak-Kontext (GAGACGGA). Mit Hilfe von nano-LC-MS/MS-Analysen konnte gezeigt werden, dass das ACG-Codon während der Translation nicht entsprechend des genetischen Codes in ein Threonin, sondern in ein Methionin übersetzt wird, da die Met-tRNA_{iMet} an das ACG-Codon binden kann. Daraus resultieren theoretisch zwei Proteinisoformen des *TRPV6*-Ionenkanals. Die „kurze“ *TRPV6*-Isoform mit einer Länge von 725 Aminosäuren wird durch die Translation am AUG-Startcodon gebildet, während die „lange“ *TRPV6*-Isoform mit einer Länge von 765 Aminosäuren durch die Translation am ACG-Startcodon entsteht (Abbildung 4). Mit Hilfe von Immunhistochemie, ortsspezifischer Mutagenese sowie einer nano-LC-MS/MS-Analyse konnte bestätigt werden, dass die Initiation der Translation des endogenen *TRPV6*-Proteins am ACG-Startcodon stattfinden kann und somit zu einer um 40 Aminosäuren längeren *TRPV6*-Isoform führt, als das Translationsprodukt des annotierten AUG-Startcodons (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Die aus der kanonischen Aminosäuresequenz abgeleitete molare Masse des *TRPV6*-Proteins beträgt 83,21kDa (Müller *et al.*, 2000; Hirnet *et al.*, 2003).

Die 725 Aminosäuren lange *TRPV6*-Isoform wird nachfolgend vereinfacht als „kurze *TRPV6*-Isoform“ bzw. „*TRPV6*_short“ bezeichnet, während die 765 Aminosäuren lange *TRPV6*-Isoform nachfolgend als „lange *TRPV6*-Isoform“ bzw. „*TRPV6*_long“ bezeichnet wird.



Abbildung 4: Kurze und lange Isoform des TRPV6-Ionenkanals. Die Translation der kurzen Isoform des *TRPV6*-Proteins wird am annotierten AUG-Codon gestartet, welches in ein Methionin (M) übersetzt wird. Die Translation der langen Isoform des *TRPV6*-Proteins startet hingegen an einem stromaufwärts gelegenen ACG-Codon, welches ebenfalls in ein Methionin (M) übersetzt wird. Die lange Isoform des *TRPV6*-Ionenkanals weist dadurch einen um 40 Aminosäuren verlängerten N-terminalen Bereich auf (verändert nach Fecher-Trost *et al.*, 2013).

In Western Blot-Analysen mit Lysaten aus humaner Plazenta und Antikörpern, die spezifisch für die lange Isoform des TRPV6-Proteins sind, wurde nachgewiesen, dass nur die lange TRPV6-Isoform *in vivo* in den verwendeten Gewebeproben gebildet wird. Dies beruht auf einem schlechteren Kozak-Kontext des annotierten AUG-Startcodons (CCCAUGGGT) im Vergleich zum ACG-Startcodon (GAGACGGGA). Zudem befindet sich eine invertierte Repeat-Sequenz stromabwärts des ACG-Codons. Diese führt zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur, durch die die Ribosomen daran gehindert werden, die Region stromabwärts zu scannen. Dadurch wird die Initiation der Translation am AUG-Codon blockiert (Kozak, 1990; Hinnebusch, 2011; Fecher-Trost *et al.*, 2013).

Die Initiation der Translation an alternativen Startcodons stellt prinzipiell eine Möglichkeit dar, unterschiedliche Protein-Isoformen aus einer mRNA zu generieren und somit die Protein-Diversität zu erhöhen. Dabei können sich die Isoformen in ihrer subzellulären Lokalisation, ihren Domänstrukturen sowie ihrer Aktivität voneinander unterscheiden. Im Falle des Proto-Onkogens c-Myc weisen die beiden Isoformen unterschiedliche DNA-Bindungsaffinitäten sowie unterschiedliche Expressionshöhen und Aktivitäten auf. In den bisher bekannten Beispielen, in denen sich das alternative Startcodon innerhalb des Leserasters befindet, führt die Initiation der Translation am alternativen Startcodon zu längeren Protein-Isoformen. Für die Proteine YPEL1, YPEL2, YPEL4, EPHX3, WDR26 und FGFR1 wurde aufgrund der Nutzung eines ACG-Startcodons und eines durchgängigen Leserasters ein verlängerter N-terminaler Bereich identifiziert (Ivanov *et al.*, 2011; Touriol *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2006; Diaz de Arce *et al.*, 2017).

Die 40 zusätzlichen Aminosäuren der langen TRPV6-Isoform weisen keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinsequenzen auf. Neun der 40 Aminosäuren stellen Proline dar, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein können. Somit könnte der verlängerte N-terminale Bereich des TRPV6-Proteins eine Rolle in Protein-Protein-Interaktionen spielen (Fecher-Trost *et al.*, 2017). Die Zusammenhänge des um 40 Aminosäuren längeren N-terminalen Bereichs der langen TRPV6-Isoform hinsichtlich Funktion, Regulation und Konservierung in Säugetieren ist bislang noch nicht umfassend geklärt.

1.3.1.2 Gewebeexpression

Mithilfe von Northern Blot, RT-PCR sowie Immunhistochemie wurde beim Menschen eine Expression des TRPV6-Ionenkanals in vielen Geweben, unter anderem dem Darm, Gehirn, Thymus, Hoden, Schilddrüse und der Nebenniere nachgewiesen. Eine TRPV6-Expression konnte hingegen nicht in der Herz- und Skelettmuskulatur detektiert werden (Uhlén *et al.*, 2015). Im

Menschen wird der TRPV6-Ionenkanal gemeinsam mit dem nahe verwandten TRPV5-Ionenkanal in Organen co-exprimiert, die am transzellulären Ca^{2+} -Transport beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise der Zwölffingerdarm, Leerdarm, Dickdarm und die Niere, aber auch exokrine Gewebe wie Pankreas, Prostata, Brustdrüse, Schweißdrüse und Speicheldrüse (den Dekker *et al.*, 2003). In der Plazenta stellt der TRPV6-Ionenkanal den Haupttransportweg von Ca^{2+} von der mütterlichen Plazenta zum Fötus dar (Giusti *et al.*, 2014). Er spielt damit eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. Mit Hilfe von TRPV6-defizienten Mausembryonen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des TRPV6-Ionenkanals zu einer Wachstumsverzögerung, reduziertem Gewicht sowie schlecht kalzifizierten Knochen des Fötus führt (Fecher-Trost *et al.*, 2019). Im Darm ist der TRPV6-Ionenkanal für die Aufnahme von Ca^{2+} aus der Nahrung zuständig (Peng *et al.*, 2000; Gunthorpe *et al.*, 2002; Fecher-Trost *et al.*, 2017). Aufgrund der TRPV6-Expression in Geweben, die am Ca^{2+} -Transport beteiligt sind, wird die Funktion des TRPV6-Ionenkanals in der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase verdeutlicht (Hoenderop *et al.*, 2003).

1.3.2 Proteinstruktur

1.3.2.1 Allgemeine Architektur

Das TRPV6-Protein besteht, wie alle anderen TRP-Ionenkanäle, aus sechs Transmembrandomänen, einer Porenregion sowie einem intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus. Die Ausbildung eines funktionellen TRPV6-Ionenkanals erfolgt über die Zusammenlagerung zu Tetrameren (Abbildung 5). Für den TRPV6-Ionenkanal sind sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere mit dem homologen TRPV5-Ionenkanal beschrieben. Der TRPV5- und der TRPV6-Ionenkanal teilen viele funktionelle Eigenschaften, wie beispielsweise die Durchlässigkeit für mono- und divalente Kationen, die hohe Ca^{2+} -Selektivität sowie die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Kanals. Unterschiede im N- und C-terminalen Bereich des TRPV5- und TRPV6-Ionenkanals führen jedoch zu unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften beider Proteine. Der TRPV6-Ionenkanal weist eine schnellere Inaktivierung infolge erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der TRPV5- im Vergleich zum TRPV6-Ionenkanal ca. 100-fach sensitiver auf den

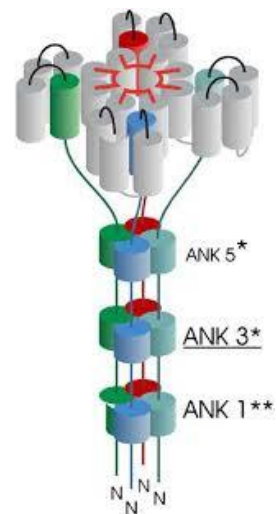


Abbildung 5: Assemblierung der TRPV6-Untereinheiten und Anordnung der Ankyrin-domänen 1, 3 und 5. Die Assoziation der Ankyrin-domänen führt zur Ausbildung und zur Erhaltung des funktionellen Kanals. ANK 3 fungiert als Anker für die Assemblierung und ANK 5 als potentielle stabilisierende Region. ANK 1 ist eine kritische Domäne für die Assemblierung mit TRPV5 (Niemeyer, 2005).

nicht-selektiven Inhibitor Ruthenium Red reagiert. Patch-Clamp Experimente mit heterolog exprimierten TRPV5/TRPV6-Heterotetrameren in HEK293-Zellen haben gezeigt, dass sich die Heterotetramere je nach Zusammensetzung hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Einstromkinetiken voneinander unterscheiden. Je höher der Anteil an TRPV6-Untereinheiten im Tetramer ist, desto stärker gleicht der beobachtete Ca^{2+} -Einstrom dem eines TRPV6-Homotetramers. Die Variation der Untereinheiten im Heterotetramer wird als Mechanismus diskutiert, mit dem die Ca^{2+} -Transportkinetiken in Geweben wie beispielsweise der Niere, Plazenta und dem Darm sehr fein reguliert werden können (Hoenderop *et al.*, 2003).

Der vierfach-symmetrische Aufbau des TRPV6-Ionenkanals besteht aus zwei Hauptkomponenten: einer Transmembrandomäne mit einer zentralen Ionenkanalpore und einem $\sim 70\text{\AA}$ hohen und $\sim 110\text{\AA}$ breiten intrazellulären Bereich (Abbildung 6A). Die Transmembrandomäne jeder TRPV6-Untereinheit wird von einer intrazellulären N- und C-terminalen Domäne flankiert. Die Transmembrandomäne besteht aus sechs Helices (S1-S6) und einem kurzen hydrophoben Abschnitt, der Porenschleife, zwischen der fünften und sechsten

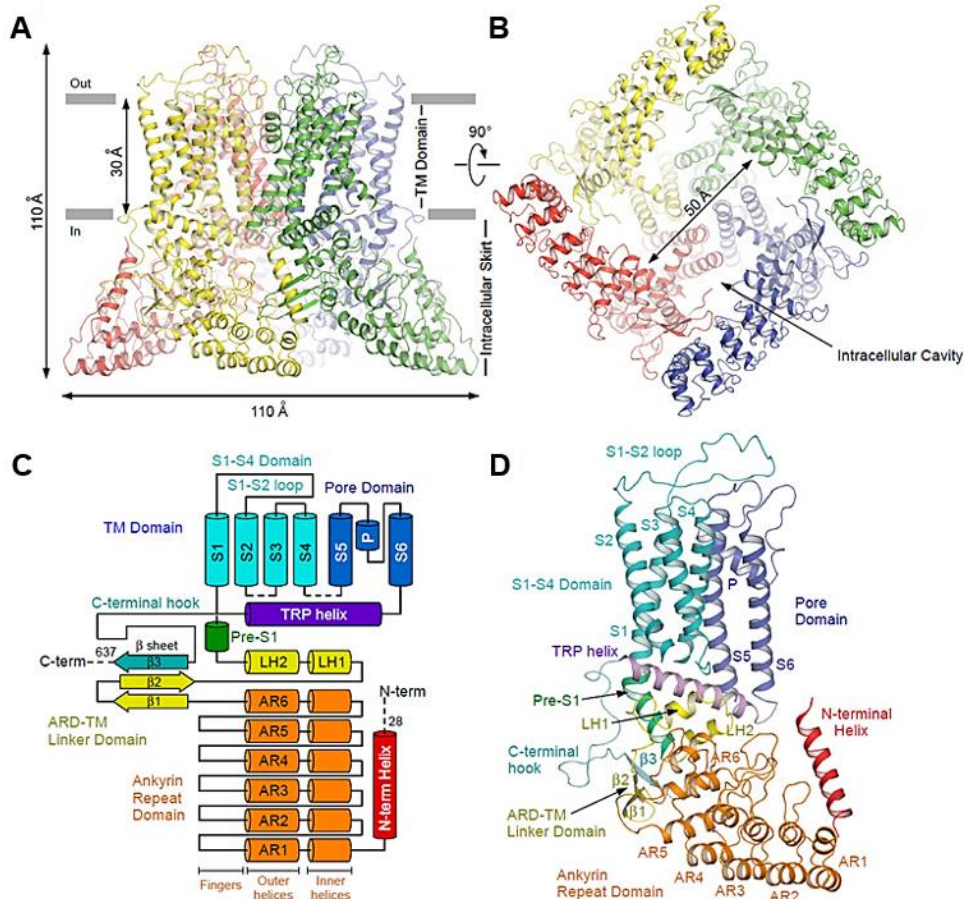


Abbildung 6: Struktur und Aufbau des TRPV6-Ionenkanals. (A) Seitenansicht des TRPV6-Tetramers und (B) Sicht von unten auf das TRPV6-Tetramer. Jede TRPV6-Untereinheit ist dabei in einer anderen Farbe dargestellt. (C) Darstellung der wichtigsten strukturellen Domänen eines Monomers. (D) Modell eines Monomers. Der Farbcode entspricht den in C dargestellten Domänen (verändert nach Saotome *et al.*, 2016).

Transmembrandomäne (Peng *et al.*, 1999; Saotome *et al.*, 2016). Die ersten vier Transmembrandomänen formen ein Bündel und stellen so die S1-S4 Domäne dar. Der Linker zwischen der S1-S4 Domäne und der Porendomäne unterscheidet sich wesentlich zu dem anderer TRP-Ionenkanäle, da er keine helikale Konformation ausbildet. Welchen Einfluss dies auf die Funktionalität des TRPV6-Ionenkanals hat, ist noch nicht geklärt. Im Anschluss an die S6-Domäne folgt die TRP-Helix, welche parallel zur Membran verläuft und mit intrazellulären löslichen Domänen interagiert. Der extrazelluläre Teil der Pore wird durch extrazelluläre Loops gebildet, welche die P-Loop-Helix mit der S5- und S6-Domäne verbinden. Der restliche Anteil der Pore wird durch Zusammenlagerung der S6-Helices der vier TRPV6-Untereinheiten gebildet. Die im Vergleich zu anderen TRPV-Ionenkanälen relativ starre äußere Porendomäne ist ein weiterer wichtiger Unterschied zu anderen Mitgliedern der TRPV-Familie. Dies könnte damit einhergehen, dass der TRPV6-Ionenkanal im Vergleich zu den TRPV-Ionenkanälen 1-4 keine polymodale Aktivierbarkeit aufweist. Die TRPV1-4 Mitglieder werden durch verschiedenste Stimuli aktiviert, weshalb eine höhere strukturelle Plastizität der Pore notwendig ist (Saotome *et al.*, 2016).

1.3.2.2 Ca²⁺-Permeationsmechanismus

In der Tetramerstruktur des TRPV6-Ionenkanals ist der Selektivitätsfilter in der Pore das Element, das die Durchlässigkeit des Kanals für monovalente und divalente Kationen bestimmt (Abbildung 7). Oberhalb dieses Selektivitätsfilters befindet sich extrazellulär eine elektronegative Rekrutierungsstelle. Hier sind negativ geladene Aspartat- oder Glutamatreste für die Koordination von Kationen sowie die Abstoßung von Anionen zuständig (Madej & Ziegler, 2018). Der Selektivitätsfilter selbst wird durch einen Ring aus vier negativ geladenen Aspartatresten, einer von jeder Untereinheit, gebildet. Die Seitenketten von D541 ragen dabei in die Zentralachse der Pore hinein und bilden so eine Engstelle von 4,6Å am oberen Rand des Selektivitätsfilters (Saotome *et al.*, 2016). Bei der Selektion und Permeation von Ionen spielt dabei sowohl die Ladung als auch die Größe eine entscheidende

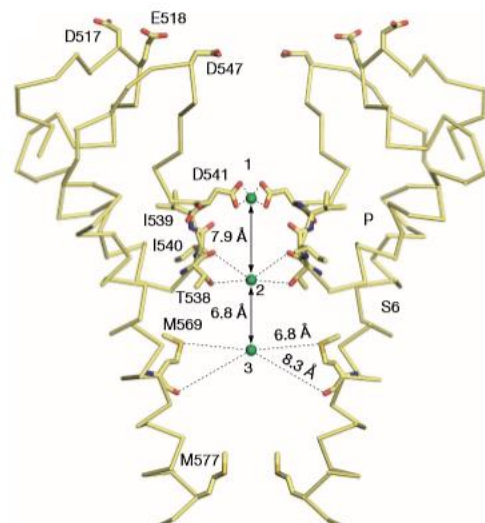


Abbildung 7: Ca²⁺-Permeationsmechanismus durch die TRPV6-Pore. Dargestellt ist die Seitenansicht der TRPV6-Pore. Die Calcium-Ionen an Position 1, 2 und 3 sind in grün dargestellt. Die interatomaren Distanzen, welche als gestrichelte Linien dargestellt sind, weisen darauf hin, dass Ca²⁺ durch die Seitenketten von D541 an Seite 1 koordiniert wird, während ein hydriertes Calcium-Ion indirekt mit der Pore an Position 2 und 3 interagiert (Saotome *et al.*, 2016)

Rolle. Die Porenregion anderer TRPV-Mitglieder besitzt diesen Aspartatrest nicht, was die geringe Ca^{2+} -Selektivität dieser Kanäle erklären würde (Nilius *et al.*, 2001). Unterhalb des Selektivitätsfilters verbreitert sich die Pore in eine große, hauptsächlich hydrophobe Kavität mit einer Breite von 13Å. Diese Kavität ist in der Lage, ein vollständig hydriertes Calcium-Ion aufzunehmen. Im unteren Teil der Pore kreuzen sich die S6-Helices. Dort bilden dann die M577 Seitenketten eine Verengung mit einem Durchmesser von 5,1Å und bilden so die untere Pforte der Pore (Saitome *et al.*, 2016).

Innerhalb der Pore gibt es drei Stellen (Abbildung 7), die eine Affinität für Ca^{2+} aufweisen, wobei Position 1 die höchste Affinität für Ca^{2+} besitzt. Das Calcium-Ion, das an Position 1 gebunden ist, wird durch einen „knock-off“ Mechanismus dazu bewegt, zu Position 2 zu wandern. Bislang ist noch unklar, ob ein weiterer „knock-off“ Mechanismus nötig ist, um das Calcium-Ion anschließend von Position 2 zu Position 3 zu befördern. An Position 3 kann das Calcium-Ion durch die Öffnung des Kanals in die Zelle eintreten. Bei der Öffnung des TRPV6-Ionenkanals, wandelt sich die α -helikale Konformation des Transmembransegments S6 in eine π -Helix um. Aufgrund der dadurch entstehenden Rotation der unteren Porenöffnung verändert sich der Porendurchmesser sowie die Verteilung der Aminosäurereste entlang der Porenoberfläche. Der Selektivitätsfilter selbst ändert im Gegensatz zu dem anderer TRPV-Ionenkanäle seine Konformation nicht (Madej & Ziegler, 2018).

Neben der hohen Selektivität für Ca^{2+} , ist der TRPV6-Ionenkanal auch für andere monovalente und divalente Kationen permeabel. Die Durchlässigkeit für monovalente Kationen lautet: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{NMDG}^+$ und für divalente Kationen: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \approx \text{Ba}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (Peng *et al.*, 2000; Hoenderop *et al.*, 2001). Der TRPV6-Ionenkanal ist zudem schwach permeabel für trivalente Kationen, wie beispielsweise La^{3+} und Gd^{3+} (Saitome *et al.*, 2016).

1.3.2.3 Intra- und extrazelluläre Domänen

Die N- und C-terminalen Regionen des TRPV6-Proteins sind entscheidend an der Assemblierung der Kanaluntereinheiten sowie der Regulierung und Lokalisation des Ionenkanals beteiligt. Am N-Terminus des TRPV6-Ionenkanals befindet sich eine Ankyrin-Repeat-Domäne (ARD), die sechs Ankyrin Wiederholungen aus jeweils 29 Aminosäuren enthält (Abbildung 8). Dieser folgt eine Linker-Domäne, welche ein β -Hairpin und ein Helix-turn-Helix Motiv beinhaltet und so den siebten Ankyrin-Repeat darstellt (Peng *et al.*, 1999; Saitome *et al.*, 2016). Mittels ortsspezifischer Mutagenese und anschließender Co-Immunopräzipitation konnte bislang gezeigt werden, dass die dritte Ankyrin-Wiederholung, die Aminosäuren 116-140, an der tetramerschen Assemblierung

der TRPV6-Untereinheiten und somit auch an der Regulation der Ionenkanalaktivität beteiligt sind (Erler *et al.*, 2004; Phelps *et al.*, 2008).

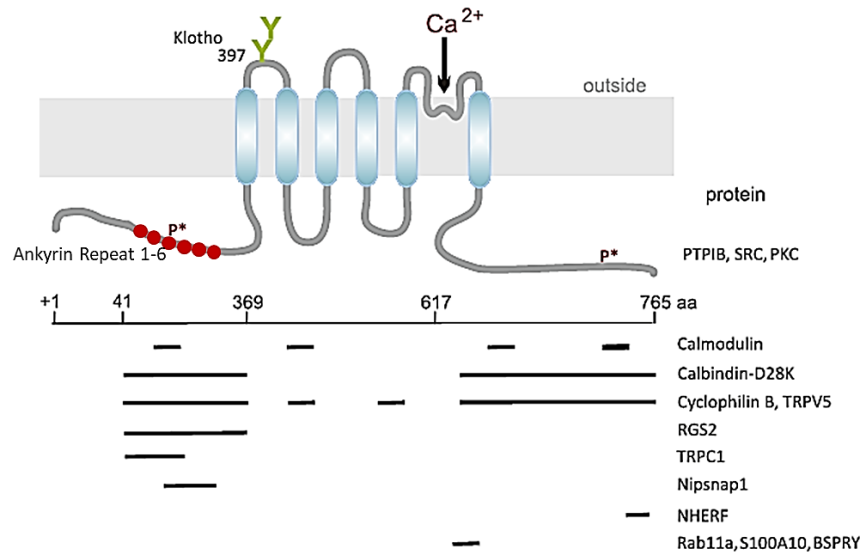


Abbildung 8: Struktur des TRPV6-Ionenkanals inklusive intra- und extrazellulärer Domänen. Dargestellt sind die Ankyrin-Repeat-Domänen, die N-Glykosylierungsstelle an Position 397, die Phosphorylierungsstelle (P*) der SRC-Kinase am Tyrosin (Position 161) und der Proteinkinase C am Threonin (Position 742). Zusätzlich sind die Regionen der interagierenden Proteine, wie beispielsweise Calmodulin, NHERF und Rab11 dargestellt (Fecher-Trost *et al.*, 2017).

Der intrazelluläre C-Terminus enthält Bindestellen für Proteine, welche bei der Lokalisation des TRPV6-Ionenkanals in die Plasmamembran eine Rolle spielen. So bindet zum Beispiel die kleine GTPase Ras-related Protein (Rab)11a, die am Transport von Recycling-Endosomen beteiligt ist, an die Aminosäurereste 600-607 des TRPV6-Ionenkanals und führt zu einer Translokation des Kanals an die Plasmamembran. Das Gerüstprotein NHERF4, welches zahlreiche Proteininteraktionsdomänen (PDZ-Domänen) enthält, bindet an den Aminosäurerest 621 und führt zur Verankerung des TRPV6-Ionenkanals in der Plasmamembran (Phelps *et al.*, 2008).

Sowohl im N-Terminus (Aminosäuren 133-143) als auch im C-Terminus (Aminosäuren 731-751) des TRPV6-Proteins befinden sich Calmodulin-Bindestellen. Diese sind für die Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals infolge einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich (Fecher-Trost *et al.*, 2017). Die Calmodulin-Bindestellen weisen zusätzlich eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C an Position 742 sowie eine Phosphorylierungsstelle der SRC-Kinase an Position 161 auf. Die Phosphorylierung der Tyrosin- bzw. Threoninreste an diesen Positionen führt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und einer verzögerten Inaktivierung des Ionenkanals (Niemeyer *et al.*, 2001; Hirnet *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2003).

Im ersten extrazellulären Loop weist der TRPV6-Ionenkanal eine konservierte N-Glykosylierungsstelle an der Position 397 auf. Der infolge der post-translationalen Modifikation

angehängte Zuckerrest ist ein Substrat für die β -Glucuronidase Klotho und führt zur Stabilisierung des TRPV6-Ionenkanals in der Plasmamembran und somit zu einer erhöhten Kanalaktivität. (Peng *et al.*, 1999; Hoenderop *et al.*, 2003).

Für die um 40 Aminosäuren längere N-terminale Region der langen TRPV6-Proteinisoform sind bislang noch keine Protein-Interaktionen beschrieben worden. Die 40 Aminosäuresequenz weist keine Homologie zu bereits bekannten Proteinsequenzen auf, die einen Rückschluss auf die mögliche Funktion dieses Bereichs erlaubt. Daher ist bislang nicht bekannt, welche Rolle die längere N-terminale Region in der Aktivierung und Lokalisation des TRPV6-Ionenkanals spielt. Allerdings besteht dieser Bereich zu 23% aus Prolinen, welche bekannterweise über SRC Homologie 3-, Tryptophan-Tryptophan- oder EVH1-Domänen in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die verlängerte N-terminale Region des TRPV6-Kanals einen Einfluss auf die spezifische Regulation des Ionenkanals in Säugetieren hat.

1.3.3 Regulation des TRPV6-Ionenkanals

Im Gegensatz zu den TRPV-Mitgliedern 1-4 besitzen TRPV6-Proteine keinen multimodalen Aktivierungsmechanismus. Es ist zudem nicht bekannt, dass sie auf sensorische Reize reagieren (O'Neil & Heller, 2005). Vielmehr ist der Ionenkanal bei physiologischen Membranpotenzialen in Abwesenheit eines bekannten Stimulus konstitutiv aktiv (Vennekens *et al.*, 2000). Es sind bisher keine spezifischen oder selektiven endogenen oder synthetischen Liganden bekannt, die direkt mit dem TRPV6-Ionenkanal interagieren (Gunthorpe *et al.*, 2002; Bödding, 2007). Die Regulierung der Aktivität des TRPV6-Ionenkanals erfolgt möglicherweise auf vier verschiedenen Ebenen: (i) über die Regulierung der Transkription und Translation, (ii) an der Plasmamembran durch pH- und Ca^{2+} -abhängige regulative Mechanismen, (iii) durch die Regulierung seines intrazellulären Transports / seine Translokation an die Plasmamembran und (iv) durch die Modulierung der Ionenkanal-Aktivität in der Plasmamembran über TRPV6-assoziierte Proteine (Nijenhuis *et al.*, 2005).

1.3.3.1 Regulation des TRPV6-Ionenkanals über Ca^{2+} und Calmodulin

Der TRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom ist stark von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Patch-Clamp Versuche an HEK293-Zellen mit heterologer TRPV6-Expression zeigten, dass niedrige, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, welche durch die Zugabe von 60mM BAPTA erzielt wurden, einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Ionenkanal bewirkten. Im

Gegensatz dazu führten hohe, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (0mM BAPTA) zu einer Inaktivierung des Ionenkanals, wodurch die Zelle vor einem toxischen Ca^{2+} -Einstrom geschützt wird (Peng *et al.*, 1999; Bödding *et al.*, 2002). Calcium-Ionen inaktivieren den Kanal hierbei auf zwei unterschiedliche Weisen. Die erste schnelle Inaktivierungsphase ist auf die Bindung der Calcium-Ionen an die Aminosäuren Leu409, Val411 und Thr412 zurückzuführen, welche sich in einem intrazellulären Bereich zwischen den Transmembrandomänen TM2 und TM3 befinden und Teil einer Inaktivierungsdomäne sind (Nilius *et al.*, 2002). Die langsame Inaktivierung in der zweiten Phase hingegen erfolgt durch einen Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Feedback-Regulationsmechanismus (Abbildung 9) (Peng *et al.*, 1999; Vennekens *et al.*, 2000; Niemeyer *et al.*, 2001). Der Ca^{2+} -Sensor Calmodulin bindet dabei Ca^{2+} -abhängig an eine 21 Aminosäuren lange Bindestelle im C-terminalen Bereich des TRPV6-Proteins (Aminosäuren 735-754) und führt

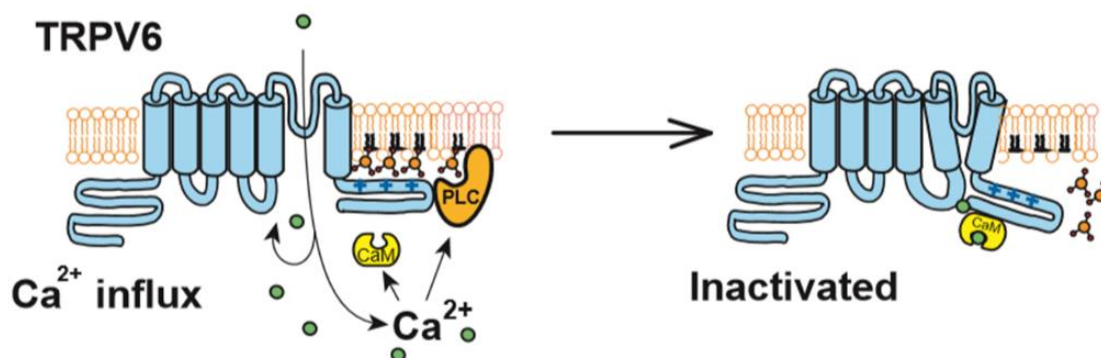


Abbildung 9: Ca^{2+} -induzierte Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals. Die Bindestellen für Calmodulin (CaM) und PIP_2 befinden sich in überlappenden Domänen im C-terminalen Bereich des TRPV6-Kanals. Im Falle einer geringen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration besetzt PIP_2 die Bindestelle des TRPV6-Ionenkanals und CaM kann nicht binden. Der TRPV6-Kanal ist somit aktiv. Strömt Ca^{2+} durch die Kanalpore in die Zelle ein, führt dies zu einer Aktivierung der PLC und einem damit verbundenen Abbau von PIP_2 . Die Bindestellen im TRPV6-Kanal sind nun nicht mehr besetzt und CaM kann Ca^{2+} -abhängig an den TRPV6-Kanal binden. Dies führt zu einer Konformationsänderung der S6-Helices und einer damit verbundenen Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals (Cao *et al.*, 2013).

somit zu einer Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals. Diese Bindestelle (Aminosäuren 735-754) enthält zusätzlich eine Proteinkinase C (PKC) -Phosphorylierungsstelle, wodurch eine Inaktivierung des Ionenkanals verhindert werden kann. Die Phosphorylierung eines Threoninrestes durch PKC führt zu einer zusätzlichen negativen Ladung, was wiederum die Bindung von Calmodulin an die Bindestelle und somit die Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals verhindert. Die Konkurrenz zwischen Calmodulin und PKC stellt daher einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle der TRPV6-Aktivität dar (Niemeyer *et al.*, 2001; Hirnet *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2003). Die Calmodulin-Bindestelle des Ionenkanals ist zusätzlich sensitiv für die Bindung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP_2). Calmodulin und PIP_2 konkurrieren somit um diese Bindestelle. Auch hier erfüllt Ca^{2+} zwei Rollen. Strömt Ca^{2+} durch den TRPV6-Kanal in die Zelle ein, so wird Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche wiederum zum Abbau von PIP_2 führt. Sinkt die PIP_2 -Konzentration, so kann mehr Calmodulin

binden und den Kanal nachfolgend inaktivieren. Bindet Ca^{2+} hingegen an das Calmodulin, kann mehr PIP_2 binden und der Kanal wird weniger stark inaktiviert (Thyagarajan *et al.*, 2008 a, b). Insgesamt unterliegt der Regulierung des TRPV6-Ionenkanals ein komplexer Mechanismus aus der Bindung von intrazellulärem Ca^{2+} an Calmodulin und PIP_2 und dem Konkurrieren von Calmodulin, PKC und PIP_2 um die gleiche Bindestelle im TRPV6-Ionenkanal (Fecher-Trost *et al.*, 2017).

1.3.3.2 Regulation des TRPV6-Ionenkanals durch Metallionen

Verschiedene Kationen führen zu einer Inaktivierung des TRPV6-Ionenkanals. Ca^{2+} -„Uptake“-Messungen mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in *Xenopus laevis* Oocyten haben gezeigt, dass in Anwesenheit von Gd^{3+} , La^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} der Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Ionenkanal zu 40-90% inhibiert wird. Die Kationen Ba^{2+} , Sr^{2+} und Mg^{2+} führen im Vergleich dazu nur zu einer 20-30%igen Inhibition, während Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Ionenkanal aufweisen (Peng *et al.*, 1999). Im Falle des zweiwertigen Kations Zink ergibt sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung/Inhibierung des TRPV6-Ionenkanals. Geringe extrazelluläre Zn^{2+} -Konzentrationen ($<20\mu\text{M}$) führen zu einer leichten Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms durch den TRPV6-Ionenkanal, während höhere Konzentrationen ($>20\mu\text{M}$) zu einer Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms führen. Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen konnten die Inaktivierungsmechanismen teilweise aufgeklärt werden. Trivalente Kationen sind in der Lage, an die Position 1 (Aminosäure D541) im Selektivitätsfilter zu binden und so die Bindestelle für Ca^{2+} zu besetzen. Zudem konnte für das zweiwertige Kation Magnesium gezeigt werden, dass es als bidirektionaler Blocker des TRPV6-Kanals agiert, indem es permanent an die Position 1 (Aminosäure D541) im Selektivitätsfilter des TRPV6-Ionenkanals bindet (Nilius *et al.*, 2001).

1.3.3.3 Regulation des TRPV6-Ionenkanals durch posttranslationale

Modifikationen

Die Glykosylierung und Phosphorylierung des TRPV6-Ionenkanals sind bekannte posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität des TRPV6-Kanals beeinflussen. Der TRPV6-Ionenkanal kann an der Position N397 zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 im Zuge einer posttranslationalen Modifikation glykosyliert werden (Abbildung 8). Die N-Glykosylierung ermöglicht die Regulation der Kanalaktivität von extrazellulärer Seite her durch das Membranprotein Klotho. Klotho gehört zur Familie der β -Glucuronidasen und sorgt für die

Abspaltung N-terminaler, extrazellulärer Zuckerreste, in deren Folge der TRPV6-Ionenkanal länger in der Plasmamembran verbleibt (Fecher-Trost *et al.*, 2017; van Goor *et al.*, 2017).

Auch die Phosphorylierung von Tyrosinen stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus in TRP-Ionenkanälen dar. Für den TRPV6-Ionenkanal konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Kanals von einer Src-vermittelten Phosphorylierung der Aminosäuren Y161 und Y162 abhängig ist, wohingegen die Inaktivierung des Kanals von einer PTP1B-vermittelten Dephosphorylierung der Tyrosine abhängt (Sternfeld *et al.*, 2007).

1.3.3.4 Regulation des TRPV6-Ionenkanals durch den Vesikeltransport

Für einige Mitglieder der TRP-Familie, wie beispielsweise dem TRPV5-Kanal (van de Graaf *et al.*, 2006 a), dem TRPC1-Kanal (de Souza & Ambudkar, 2014) sowie dem TRPC5-Kanal (Bezzerrides *et al.*, 2004) wurde eine Lokalisation in intrazellulären, vesikulären Strukturen beschrieben. Da über den Transport der Vesikel entlang exozytotischer und endozytischer Transportwege die Anzahl funktionaler TRP-Ionenkanäle an der Plasmamembran und damit auch der Ionen-Einstrom in die Zelle reguliert werden kann, wurde der Vesikeltransport als weiterer Regulationsmechanismus der TRP-Kanäle beschrieben (Abbildung 10) (Toro *et al.*, 2011).

Für den TRPC5-Ionenkanal konnte mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie und Patch-Clamp Experimenten an HEK293-Zellen mit heterologer TRPC5-Expression gezeigt werden, dass der Transport des Ionenkanals über exozytotische Prozesse infolge einer Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF erfolgt. Der Ionenkanal wird dabei innerhalb von zwei Minuten an die Plasmamembran

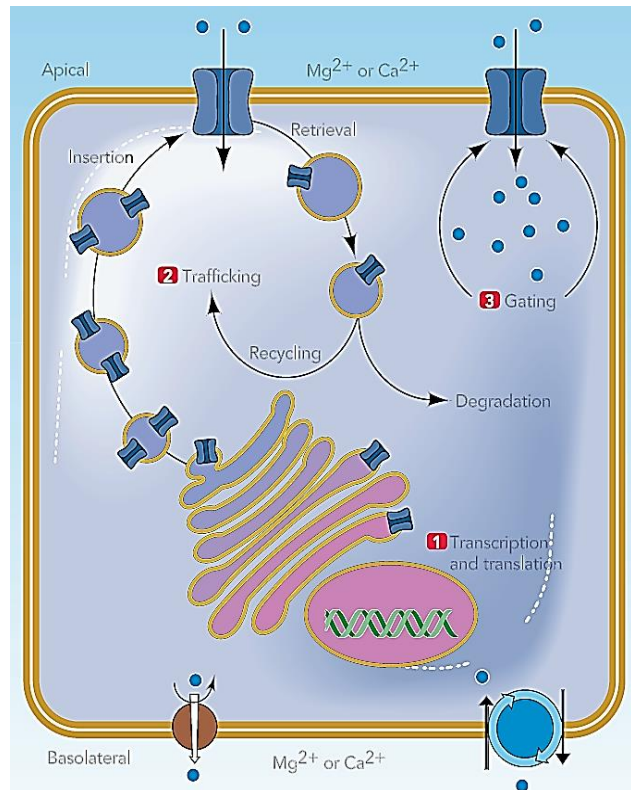


Abbildung 10: Regulationsmechanismen von TRP-Ionenkanälen. Die Regulation der Kanalaktivität kann auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden. Die Anzahl der Ionenkanäle kann über transkriptionelle sowie translationale Prozesse beeinflusst werden (1). Die Anzahl funktionell aktiver Ionenkanäle an der Zelloberfläche wird dynamisch reguliert. Dies geschieht durch Transportprozesse, welche je nach Bedarf den Kanal an die Plasmamembran befördern und dort einbauen oder von der Plasmamembran wieder weg befördern (2). Einen dritten wichtigen Regulationsmechanismus stellt die Kontrolle des Ioneneinstroms durch den Kanal selbst dar (3) (Hoenderop & Bindels; 2008).

transportiert (Bezzarides *et al.*, 2004). Für den zum TRPV6-Kanal nahe verwandten TRPV5-Kanal konnte ebenfalls mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie in HEK293-Zellen mit heterologer TRPV5-Expression gezeigt werden, dass die Lokalisation des Ionenkanals über den extrazellulären pH-Wert (pH_e) beeinflusst wird. Im Falle des TRPV5-Ionenkanals führte eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes von 6,0 auf 8,5 zu einer erhöhten Lokalisation der TRPV6-Vesikel an der Plasmamembran, was mit einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verbunden war (Lambers *et al.*, 2007). Kollokalisationsstudien in HeLa-Zellen mit heterologer TRPV5-Expression haben zudem gezeigt, dass die kleine GTPase Rab11, welche in die Exozytose von Recycling-Vesikeln involviert ist, für den Transport des TRPV5-Kanals an die Plasmamembran verantwortlich ist (van de Graaf *et al.*, 2006 a).

Für den TRPV6-Ionenkanal wurde neben der Lokalisation in der Plasmamembran ebenso eine Lokalisation in intrazellulären Membranen und vesikulären Kompartimenten nachgewiesen. Bislang konnte gezeigt werden, dass die im Vesicle-Trafficking involvierten Proteine Rab11a und S100A10-Annexin2 den exozytotischen Vesikeltransport des TRPV6-Ionenkanals regulieren, während das Gerüstprotein NHERF4 die Verankerung des Kanals in der Plasmamembran reguliert (van de Graaf *et al.*, 2006 b; Fecher-Trost *et al.*, 2017; Toro *et al.*, 2011). Die genaue Regulierung des Vesikeltransportes und die Lokalisation des TRPV6-Ionenkanals sind bislang im Detail nicht aufgeklärt. Der extrazelluläre pH-Wert könnte jedoch eine wichtige Rolle spielen, da Experimente mit HEK293-Zellen mit heterologer TRPV6-Expression gezeigt haben, dass eine Erhöhung des pH-Wertes von 7,4 auf 8,5 zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Ionenkanal führt (Peng *et al.*, 1999).

Zusammenfassend ergeben sich eine Vielzahl von Regulationsmechanismen für den TRPV6-Ionenkanal (Tabelle 1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Antagonisten 2-APB, Ruthenium Red, SOR-C13, La^{3+} sowie Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) und des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) auf die Regulierung der beiden TRPV6-Isoformen in den entwickelten Zellmodellen analysiert.

Tabelle 1: Regulatorische Effekte verschiedener Faktoren auf den TRPV6-Kanal. + = aktivierend, - = inhibierend, Kanalaktivität = konzentrationsabhängiger Einfluss des regulierenden Faktors auf den Calcium-Einstrom durch den TRPV6-Kanal.

Regulierender Faktor	Effekt	Regulierter Prozess	Referenz
2-APB	+/-	Kanalaktivität	Ramsey <i>et al.</i> , 2006
BPT2	-	Kanalaktivität	Ramsey <i>et al.</i> , 2006
Ruthenium Red	-	Kanalaktivität	Ramsey <i>et al.</i> , 2006 Hoenderop <i>et al.</i> , 2001
SOR-C13/SOR-C27	-	Kanalaktivität	Bowen <i>et al.</i> , 2013
Lidocaine	-	Kanalaktivität	Jiang <i>et al.</i> , 2016
TH-1177	-	Kanalaktivität	Landowski <i>et al.</i> , 2011
Klotho	+	Proteintransport	Lu <i>et al.</i> , 2008
Capsaicin	+	Kanalaktivität	Chow <i>et al.</i> , 2007
OCRL	-	Kanalaktivität	Wu <i>et al.</i> , 2012
La ³⁺	-	Kanalaktivität	Bouron <i>et al.</i> , 2015
Cd ²⁺	-	Kanalaktivität	Bouron <i>et al.</i> , 2015
Xestospongin	-	Kanalaktivität	Gunthorpe <i>et al.</i> , 2002
Vitamin D3	+	Transkription	Hoenderop & Bindels, 2008
Östrogen	+	Transkription	Hoenderop & Bindels, 2008
Progesteron	+	Transkription	Hoenderop & Bindels, 2008
Prednisolon	-	Transkription	Hoenderop & Bindels, 2008
S100A10/Annexin2	+	Proteintransport	Hoenderop & Bindels, 2008
Rab11a	+	Proteintransport	Hoenderop & Bindels, 2008
Calmodulin	-	Kanalaktivität	Niemeyer <i>et al.</i> , 2001; Lambers <i>et al.</i> , 2004
Geringer Ca ²⁺ -Gehalt der Nahrung	+	Transkription	Hoenderop <i>et al.</i> , 2002
Erhöhte [Ca ²⁺] _i	-	Kanalaktivität	Hoenderop <i>et al.</i> , 2001
Erhöhte [Ca ²⁺] _e	-	Kanalaktivität	Hoenderop <i>et al.</i> , 2001
Mg ²⁺	-	Kanalaktivität	Hoenderop <i>et al.</i> , 2001
RGS2	+	Kanalaktivität	Phelps <i>et al.</i> , 2008
NHREF4	-	Plasmamembranverankerung	Phelps <i>et al.</i> , 2008
Econazol	-	Kanalaktivität	Schwarz <i>et al.</i> , 2006
Inositol-(4,5)-bisphosphat	-	Kanalaktivität	Thyagarajan <i>et al.</i> , 2008 a, b
Tyrosinphosphatase PTP1B	-	Kanalaktivität	Sternfeld <i>et al.</i> , 2007
Tyrosinkinase Src	+	Kanalaktivität	Sternfeld <i>et al.</i> , 2007
Alkalischer extrazellulärer pH-Wert	+	Kanalaktivität	Peng <i>et al.</i> , 1999

1.3.4 Der TRPV6-Ionenkanal in der Pathologie

Intrazelluläre Calcium-Ionen agieren als Botenstoffe und regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Genexpression, Zellzykluskontrolle, Proliferation, Migration, Autophagie und Apoptose. Da die genannten Prozesse auch in der Tumorentstehung, Angiogenese, Progression und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen, ist der Ca^{2+} -selektive TRPV6-Ionenkanal neben seiner normalen Funktion in der Zellphysiologie auch für die Pathologie ein interessantes Zielmolekül (Cui *et al.*, 2017). TRPV6-Deletionsmutanten in Mausmodellen führten zu Phänotypen mit verringertem Körpergewicht, nicht-funktioneller intestinaler Ca^{2+} -Aufnahme, erhöhter renaler Ca^{2+} -Sekretion, Polyurie, reduzierter Fruchtbarkeit, Dermatitis und Haarausfall (Wu *et al.*, 2010). Mithilfe transgener Mausmodelle konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte TRPV6 mRNA-Expression zu Morbus Crohn führt, während eine erhöhte TRPV6-Expression bei Nierensteinerkrankungen detektiert werden konnte (Saotome *et al.*, 2016; Fecher-Trost *et al.*, 2017; Fecher-Trost *et al.*, 2019). Eine erhöhte TRPV6-Expression wurde auch in einer Vielzahl von Karzinomen, zum Beispiel Brust-, Prostata-, Lungen-, Schilddrüsen-, Darm-, Magen-, und Eierstockkrebs nachgewiesen (Abbildung 11) (Lehen'kyi *et al.*, 2012; Liberati *et al.*, 2013). Mammakarzinome wiesen im Vergleich zu normalem Brustgewebe eine um das zwei- bis 15-fach erhöhte TRPV6 mRNA-Menge auf (Prevarskaya *et al.*, 2010). Dabei korrelierte die Expressionshöhe des TRPV6-Ionenkanals mit dem invasiven Status des Gewebes (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Peters und Kollegen zogen Genamplifikation als möglichen Mechanismus für die TRPV6-Überexpression in Betracht (Peters *et al.*, 2012). Allerdings ist die Überexpression des TRPV6-Ionenkanals vom molekularen Subtyp des Mammakarzinoms abhängig, was einer generellen Genamplifikation widerspricht. Azimi und Kollegen konnten zeigen, dass Mammakarzinome mit erhöhter TRPV6 mRNA-Menge zum basalen Subtyp gehören und mit erhöhter Wahrscheinlichkeit Östrogen-Rezeptor-negativ sind (Azimi *et al.*, 2014). Diese Tumore werden mit einer schlechten Langzeitprognose eingestuft, da sie nicht auf eine Hormontherapie ansprechen (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2014). Sowohl für die Invasion als auch für die Migration von Brustkrebszellen wurde eine Beteiligung der TRPV6-Expression

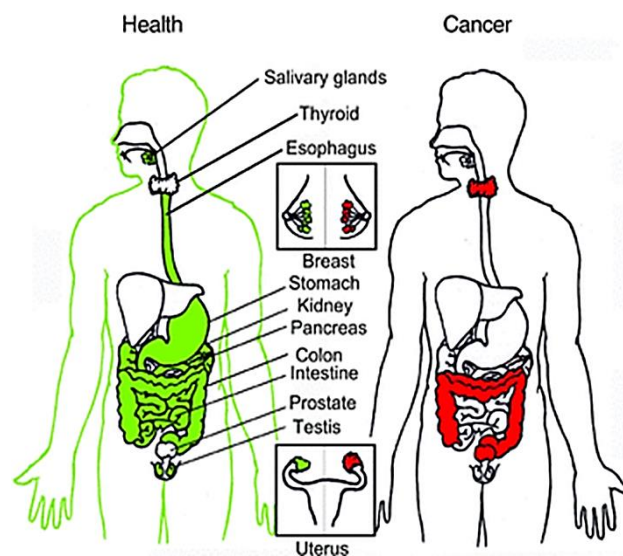


Abbildung 11: Rolle des TRPV6-Ionenkanals in Krebs-erkrankungen. Expression des TRPV6-Kanals in gesunden Patienten (linkes Bild, grün) und TRPV6-Überexpression in Krebspatienten (rechtes Bild, rot) (Lehen'kyi *et al.*, 2012).

beschrieben (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Man geht zum jetzigen Zeitpunkt davon aus, dass die Überexpression des TRPV6-Ionenkanals zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, welche wiederum die Proliferation und die Apoptose-Resistenz der Krebszellen unterstützt (Bolanz *et al.*, 2008). Forscher vermuten, dass dies mit der Aktivierung des NFAT-Signalwegs oder einem phosphorylierten Akt-Signalweg infolge des veränderten Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle zusammenhängt (Liberati *et al.*, 2013; Skrzypski *et al.*, 2016; Fecher-Trost *et al.*, 2017).

Die Korrelation der Expressionshöhe von TRPV6 mit der Malignität stellt einen interessanten Ansatz für die Entwicklung von Biomarkern für die Diagnose und Prognose von Brustkrebs dar (Bolanz *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2012).

Eine erhöhte Expression des TRPV6-Ionenkanals wurde weiterhin in primären Tumoren der Prostata nachgewiesen. Während die TRPV6-Transkripte in normalem oder gutartigem Prostatagewebe gering bis nicht detektierbar sind, sind sie im Prostatakrebsgewebe und Metastasen deutlich hochreguliert (Hirnet *et al.*, 2003; Prevarskaya *et al.*, 2010). Lehen'kyi und Kollegen konnten mit Hilfe von endogen TRPV6-exprimierenden LNCaP-Zellen zeigen, dass der TRPV6-Ionenkanal an der Apoptoseresistenz von Prostatakrebszellen beteiligt ist. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Lehen'kyi *et al.*, 2012). Da das TRPV6-Expressionsniveau mit dem Gleason Score (Tumorgrad) und der Entwicklung von Metastasen korreliert, könnte die Variation der TRPV6-Expression auch im Falle von Prostatakrebs einerseits als prognostischer Marker für die Tumorprogression und andererseits als neues therapeutisches Zielmolekül für die Behandlung von Prostatakarzinoma entwickelt werden (Bödding, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2010; Saotome *et al.*, 2016).

Um den TRPV6-Ionenkanal letztendlich klinisch für die Diagnose als Biomarker oder als therapeutisches Zielmolekül für Tumorerkrankungen etablieren zu können, bedarf es eines weitergehenden Verständnisses der Funktion und Regulation des Ionenkanals in Normal- und Tumorgewebe. Eine zusätzliche Schwierigkeit in der Funktionsanalyse des TRPV6-Ionenkanals beruht darin, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt nur ein einziger TRPV6-spezifischer Antagonist, SOR-C13, frei zur Verfügung steht (Fels *et al.*, 2018; Bowen *et al.*, 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der TRPV6-Ionenkanal nimmt physiologisch aufgrund seiner hohen Ca^{2+} -Selektivität ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$) als auch molekularbiologisch durch Nutzung eines alternativen ACG-Startcodons eine Sonderrolle innerhalb der TRP-Familie ein. Sequenzanalysen des *TRPV6*-Gens in Säugetieren haben gezeigt, dass sich im 5'-UTR 120 Basenpaare stromaufwärts, im selben Leseraster des annotierten, kanonischen AUG-Startcodons ein nicht-kanonisches ACG-Startcodon befindet, welches innerhalb der Säugetiere sehr stark konserviert ist. Weiterhin wird das *TRPV6*-Gen in verschiedenen Tumoren überexprimiert und gilt als neues diagnostisches und therapeutisches Zielmolekül aufgrund der mit der *TRPV6*-Überexpression direkt korrelierten, schlechten Krankheitsprognose (Stewart et. al, 2020).

Bei Sequenzvergleichen des *TRPV6*-Gens zwischen verschiedenen Spezies wurde im Gegensatz zu den Säugetieren bei Fischen und Amphibien nur das kanonische AUG-Codon als mögliches Start-Codon detektiert. Mit Hilfe von immunhistochemischen und nano-LC-MS/MS-Analysen wurde für das aus humanem Plazentagewebe isolierte TRPV6-Protein gezeigt, dass das nicht-kanonische ACG-Startcodon *in vivo* zur Initiation der Translation des *TRPV6*-Gens genutzt wird (Fecher-Trost et al., 2013). Die Bedeutung des um 40 Aminosäuren verlängerten N-terminalen Bereichs für die intrinsische Funktion und Regulation des TRPV6-Ionenkanals als auch für die starke Konservierung in Säugetieren konnte bislang nicht umfassend geklärt werden. Da ein großer Anteil der in den Datenbanken annotierten Proteinsequenzen auf bioinformatischen Vorhersagen beruht und nur die wenigsten Proteinsequenzen experimentell hergeleitet wurden, wurden viele Funktionsanalysen des TRPV6-Ionenkanals nur mit der kürzeren, auf der Annotierung des kanonischen AUG-Codons beruhenden hTRPV6-Proteinvariante durchgeführt. Die kürzere Variante war bei diesen Analysen in Säugetierzellen funktionell.

Die der vorliegenden Dissertation zugrunde liegende Forschungsfrage beruhte auf der Annahme, dass der um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminale Anteil die intrinsischen Eigenschaften des humanen TRPV6-Ionenkanals im Vergleich zu der verkürzten TRPV6-Proteinisoform beeinflusst, was für die Funktionsaufklärung und vor allem für die pharmakologische Nutzung des TRPV6-Ionenkanals bedeutsam ist. Zur Klärung dieser Hypothese sollte die Funktion von humanen TRPV6-Ionenkanälen (hTRPV6-Ionenkanäle) vergleichend in lebenden Zellen analysiert werden, die die kürzere oder die längere humane TRPV6-Proteinisoform exprimieren.

Da die endogene Expression von hTRPV6 in vielen menschlichen Geweben gering ist, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Zellmodelle mit Überexpression der hTRPV6-Proteinisoformen entwickelt, wodurch eine funktionelle Analyse der heterologen TRPV6-Ionenkanäle durch Calcium-Imaging möglich war. Zur Vermeidung von toxischen Effekten, bedingt durch die

Überexpression eines Ca^{2+} -Ionenkanals, sollte die Expression der hTRPV6-Ionenkanäle in den zellulären Überexpressionsmodellen regulierbar sein. Eine Expression der TRPV6-Ionenkanäle als fluoreszierende mCherry-Fusionsproteine sollte weiterhin die Quantifizierung der hTRPV6-Überexpression als auch subzelluläre Lokalisationsstudien ermöglichen. Da der TRPV6-Ionenkanal bei physiologischen Membranpotenzialen ohne Stimulierung aktiv ist, sollte im zweiten Teil der Dissertation ein Fluoreszenz-basierter Calcium-Assay entwickelt werden, mit dem die Ionenkanal-Aktivitäten der beiden TRPV6-Isoformen in lebenden Zellen vergleichend gemessen werden können. Der dritte Teil dieser Arbeit fokussierte sich auf vergleichende Funktionsanalysen zwischen den beiden Isoformen der hTRPV6-Ionenkanäle. Dabei wurde zum einen die Abhängigkeit der TRPV6-Isoformen von den Parametern $[\text{Ca}^{2+}]_e$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und pH_e , die den Ca^{2+} -Einstrom durch die Ionenkanäle beeinflussen, bestimmt. In einer Erweiterung dieser Analyse wurden vier Antagonisten für den TRPV6-Ionenkanal in den Zellmodellen getestet. Zum anderen wurde der Einfluss der hTRPV6-Isoformen auf Ca^{2+} -abhängige zellphysiologische, einschließlich pathophysiologischer Prozesse, wie Vesikeltransport, Proliferation, Migration, Invasion und Aktivierung des NFAT-Signalwegs untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Die Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Name	Hersteller
Autoklav VX-150	System GmbH, Wetzlar
Axio Cam HRm Kamera	Carl Zeiss, Oberkochen
Begasungsbrutschrank	Thermo Fisher Scientific, USA
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Einkanalpipetten (1-10, 2-20, 20-200, 100-1000 µl)	Gilson, USA
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Hannover
EL800 Absorbance Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, USA
Elektrophorese Power Supply Power PACTM	BioRad, München
Elektrophorese System Mini-Protean	BioRad, München
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, USA
Geldokumentationssystem	Peqlab, Erlangen
Geldokumentationssystem, G:Box	Syngene, England
Grobwaage Kern 3600-2N	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Heizbad HBR 4 digital	IKA Labortechnik, Staufen
Hybridisierungsofen HIR10M Grant Boekel	Boekel Scientific, USA
ImagEM C9100-13, EM-CCD Camera	Hamamatsu Photonics, Japan
Inverses Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kryobehälter ARPEGE 110	Air Liquide, Düsseldorf
Kühl- und Gefrierschrank (+4°C, -20°C)	Liebherr, Nürnberg
Kühl-Standzentrifuge ZK 380	Hermle Labortechnik, Wehingen
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer Ikamag® RH	IKA Labortechnik, Staufen
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroplatten-Reader CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg
MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3SR+	Heraeus Instruments, Hanau

Multikanalpipette Picus 1200	Sartorius, Göttingen
pH-Meter 765 Calimatic	Knick GmbH & Co. KG, Berlin
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore, Darmstadt
Spectrophotometer, NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific, USA
Sterilwerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80°C)	Sanyo, Osaka, Japan
Tischorbitalschüttler MaxQ™ 4000	Thermo Fisher Scientific, USA
Trockensterilisator	Jouan, SA, Frankreich
Ultraschallbad 5210R-MT	Branson
UV-Transilluminator Fluo_Link	Biometra, Göttingen
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, USA
Vortexer Yellow line TTS2	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad W22	Labortechnik Medingen, Dresden

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Name	Hersteller
Agarose	Electran, USA
29% Acryl- 1% Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
2-APB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
APS	Applichem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CaCl ₂ · 6H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CAPSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI	AAT Bioquest, USA
D-Glukose, Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Applichem, Darmstadt
Doxyzyklin	PAA Laboratories, Egelsbach
EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FCS	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund

Fluo-8-AM	AAT-Bioquest, USA
Fugene HD	Promega, Mannheim
GelRed	Biotium, USA
Geneticin (G418)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Glycin	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Applichem, Darmstadt
HEPES	Applichem, Darmstadt
Hoechst 33342	Life Technologies, Carlsbad
Hygromycin B	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
KCl	Applichem, Darmstadt
KH_2PO_4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LaCl_3	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Mowiol	Sigma-Aldrich, München
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
PFA	Sigma-Aldrich, München
PMSF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Probenecid	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Ruthenium Red	Biomol, Hamburg
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SignalFire ECL Reagent	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
SOR-C13	PSL, Heidelberg
TEMED	Applichem, Darmstadt
Tet-approved FCS	Biological Industries, Israel
Thapsigargin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Applichem, Darmstadt
Xfect Transfection Reagent	Clontech, USA

2.1.3 Antikörper

Für die Immundetektion von Western Blots (Kapitel 2.3.2) sowie für die Immunfluoreszenzmikroskopie (Kapitel 2.4.9) wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Name	Hersteller
Ziege anti-mCherry # AP32117PU-S	Acris Antibodies GmbH, Herford
Maus anti-GAPDH # MA5-15738	Thermo Fisher Scientific, USA
Kaninchen anti-TRPV6 # STJ191549	St John's Laboratory, UK
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP # 111-035-045	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK
Maus anti-Ziege/Schaf IgG-Peroxidase # A-9452	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-HRP # A-2304	Sigma-Aldrich, München

2.1.4 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial und Zubehör stammt, falls nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern und Lieferanten:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Carl Zeiss AG, Oberkochen
- Eppendorf, Hamburg
- Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Milli-Pore GmbH, Darmstadt
- Sigma-Aldrich, München
- VWR GmbH, Bruchsal
- Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.5 Objektive und Filter

Die Objektive und Filtersätze, welche im Rahmen dieser Arbeit am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M verwendet wurden, stammen von der Carl Zeiss AG aus Oberkochen und sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der am Axiovert 200M verwendeten Objektive.

Objektiv	Referenz
EC Plan-Neofluar 10x/0.3 Ph1	440331-9902-000
EC Plan-Neofluar 20x/0.5 Ph2	440341-9904-000
LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr	441340-9970-000
LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr	441350-9970-000
Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil Ph3	440461-0000-000

Tabelle 6: Liste der am Axiovert 200M verwendeten Filter.

Filter	Referenz
Filtersatz 46 YFP shift free (E) EX BP 500/20, BS FT 515, EM BP 535/30	000000-1196-681
Filtersatz 49 DAPI shift free (E) EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50	488049-9901-000
Filtersatz 45 HQ TexasRed, d=25 shift free (E) EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75	000000-1114-462

2.1.6 Kommerzielle Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kits sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits und deren Hersteller.

Name	Hersteller
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay # G8081	Promega, Mannheim
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay # G7572	Promega, Mannheim
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System # N1630	Promega, Mannheim
Nucleobond PC 500 # 740574.50	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, # 740609.250	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit # 10741395	Thermo Fisher Scientific, USA
Xchange Plasmid Kit # 732-3108	VWR, Bruchsal

2.1.7 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten und generierten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Herkunft
pGL4.54[luc2/TK]	Promega, Mannheim
pNL[NlucP/NFAT-RE/Hygro]	Promega, Mannheim
pMA-TRPV6_mCherry_short	Thermo Fisher Scientific, USA
pMA-TRPV6_mCherry_long	Thermo Fisher Scientific, USA
pTetOne	Clontech, Frankreich
pTetOne-TRPV6_mCherry_short	Diese Arbeit
pTetOne-TRPV6_mCherry_long	Diese Arbeit

2.1.8 Zelllinien und Medien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zelllinien und dazugehörigen spezifischen Medien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Zelllinien und Medien.

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium
CHO-K1	Subklon der parentalen CHO (Chinese Hamster Ovary) Zelllinie; epithelial	ATCC	Ham´s F12 + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 0.1 mg/ml Streptomycin
CHO-TetOne-TRPV6_short	Mit TetOne-TRPV6_mCherry_short stabil transfizierte CHO K1 Zelllinie; epithelial	Diese Arbeit	Ham´s F12 + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 0.1 mg/ml Streptomycin + 150 µg/ml Hygromycin
CHO-TetOne-TRPV6_long	Mit TetOne-TRPV6_mCherry_long stabil transfizierte CHO K1 Zelllinie; epithelial	Diese Arbeit	Ham´s F12 + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 0.1 mg/ml Streptomycin + 150 µg/ml Hygromycin

2.1.9 Bakterien

Die für die Transformation verwendeten kompetenten Zellen stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific und weisen folgende Eigenschaften auf:

➤ **Chemisch kompetente *E.coli* One Shot™ TOP10**

Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139*

Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

➤ **Chemisch kompetente *E.coli* MAX Efficiency™ DH10B™**

Genotyp: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1*

araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ -*rpsL* *nupG* /pMON14272 / pMON7124

2.1.10 Software

Die Software, die im Rahmen dieser Arbeit für die Datenanalyse und Datenauswertung verwendet wurde, ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Software.

Name	Anwendung	Referenz
AxioVision	Bildanalyse, digitale Mikroskopie	Carl Zeiss AG, Oberkochen
GraphPad Prism, Version 8	Grafische Datenanalyse	GraphPad Software Inc., USA
ImageJ /Fiji	Bildverarbeitung und Java-basierte Bildanalyse	Schindelin <i>et al.</i> , 2012
MARS Data Analysis	Analysesoftware des CLARIOstar Plattenlesegerätes	BMG Labtech, Ortenberg
Matlab Spheroid Sizer	Analyse von Sphäroiden	https://de.mathworks.com/products/matlab.html
Serial Cloner 2.6	Erstellung von Klonierungsstrategien	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
One-way ANOVA post-hoc Turkey HSD Test Calculator	Statistische Datenanalyse (Signifikanzanalyse)	https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TurkeyHSD/

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ist eine molekularbiologische Methode, bei der DNA an definierten Stellen mit der Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten („verdaut“) wird. Durch den Verdau mit einer definierten Kombination von Restriktions-Endonukleasen können an der Insert- und Vektor-DNA komplementäre Überhänge erzeugt werden. Wird ein Vektor durch den Verdau mit Restriktionsenzymen, die zu kompatiblen Enden führen, linearisiert, so kann es bei der späteren Ligationsreaktion zu einer Re-Zirkulisation des Vektors kommen. Dies kann durch eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors verhindert werden. Um dies zu erreichen, wird dem Restriktionsansatz Alkalische Phosphatase zugesetzt.

Ein Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	10µg
Restriktionspuffer (10x)	5µl
Restriktionsenzym	1,5µl
Alkalische Phosphatase	2µl
<hr/>	
ddH ₂ O	ad 50µl

Der Ansatz wurden 1h lang bei 37°C und 300rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das Ergebnis der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden anhand ihrer molekularen Größe mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Verfahren wurde beispielsweise genutzt, um Restriktionsfragmente zu überprüfen. Hierfür wurden je nach Fragmentgröße 0,8-1,8% Agarose in 35-100 ml 1x-TAE-Puffer (40mM Tris-base, 10M EDTA, 20mM Essigsäure; pH 8,2-8,4) in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurde das Gel auf etwa 60°C abgekühlt und anschließend gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die DNA-Proben, welche mit 6x-DNA-Gelladepuffer (0,2% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin, 60mM EDTA, TAE-Puffer) versetzt wurden, auf das Gel geladen und danach bei einer konstanten Spannung von 80V in der mit 1x-TAE-Puffer gefüllten Gelkammer für etwa 60min aufgetrennt. Zusätzlich wurde als Größenmarker ein entsprechender DNA-Marker aufgetragen. Das Agarose-Gel wurde

anschließend 30min lang in einem Gel-Red-Bad (0,5µg/ml) gefärbt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Transilluminators durch kurzweiliger UV-Anregung die gefärbte DNA sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des „PCR clean up / Gel Extraction“-Kit der Firma Machery Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden 50ng Vektor-DNA und ein 3-5 molarer Überschuss an Insert gemischt. Die Menge an Insert-DNA wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$Masse_{Insert} [ng] = \frac{Masse_{Vektor} [ng] \cdot Länge_{Insert} [kb]}{Länge_{Vektor} [kb]} \cdot Verhältnis \left[\frac{Insert}{Vektor} \right]$$

Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

T4-Ligase	1µl
Vektor-DNA	xµl
Insert-DNA	xµl
Ligase-Reaktionspuffer (5x)	4µl
<hr/>	
ddH ₂ O	ad 20µl

Der Ligationsansatz wurde homogenisiert und für 1-2h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden 5µl des Ligationsansatzes in die entsprechenden kompetenten *E.coli* Zellen transformiert.

2.2.5 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hitzeschock-Transformation für das Einschleusen von rekombinanter DNA in kompetente *E.coli* verwendet. Bei der Hitzeschock-Transformation führt ein plötzlicher Temperaturanstieg unter Anwesenheit von Calciumchlorid dazu, dass die Zellmembran der Bakterien kurzfristig permeabel für die rekombinante Plasmid-DNA wird.

Für die Transformation wurde zunächst ein Röhrchen (50µl) der bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten *E.coli* One Shot™ TOP10 oder *E.coli* MAX Efficiency™ DH10B™ auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50ng aufgereinigter Plasmid-DNA oder 5µl Ligationsansatz zu den kompetenten Zellen pipettiert und vorsichtig homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 45sec im 42°C warmen Wasserbad mit einer anschließenden zweiminütigen Inkubation auf Eis. Danach wurden 100µl vorgewärmtes SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose) zugegeben und die Ansätze 1h lang bei 37°C und 300rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 50µl und 100µl der Transformations-Ansätze auf angewärmte, mit entsprechendem Selektionsmarker versetzte LB-Agarplatten (5g Hefeextrakt, 10g Trypton/Pepton, 10g NaCl, 15g Agar, ddH₂O ad 1l, 100µg/ml Ampicillin bzw. 50µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Identifizierung rekombinanter Klone

Mini-Präparation

Durch den Einsatz des entsprechenden Selektionsmarkers wurden Bakterien selektioniert, die das plasmidgebundene Resistenzgen aufgenommen hatten. Mit den gewachsenen Klonen wurde anschließend eine DNA-Minipräparation durchgeführt. Hierfür wurde je ein Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB-Agarplatte gepickt und in 10ml LB-Medium (5g Hefeextrakt, 10g Trypton/Pepton, 10g NaCl, ddH₂O ad 1l; pH 7,4) und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (100µg/ml Ampicillin bzw. 50µg/ml Kanamycin) in einem 15ml Zentrifugenröhrchen angeimpft. Das Röhrchen wurde dann über Nacht auf einem Tisch-Orbitalschüttler bei 37°C und 220rpm inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Tag 30min lang bei 400g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250µl Resuspensionspuffer (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, 100 mg/ml RNase A; pH 8,0) resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend in ein 1,5ml Eppendorftube überführt, mit 250µl Lysepuffer (200mM NaOH, 1% SDS) versetzt und durch mehrmaliges Invertieren homogenisiert. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 300µl Neutralisierungspuffer (2,8M KAc; pH 5,1) und die Homogenisation durch mehrmaliges Invertieren. Anschließend wurde das Eppendorftube 25min lang bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Eppendorftube überführt, mit 800µl Isopropanol versetzt und die DNA 30min lang bei -80°C gefällt. Nach der Fällung wurden die Proben ein weiteres Mal 30min lang bei 20.000g und 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei

Raumtemperatur getrocknet und in 120µl H₂O gelöst. Die Nukleinsäurekonzentration der Probe wurde mit Hilfe einer Absorptionsmessung bei 260nm mit einem Nanodrop ND-1000 Photometer bestimmt.

Kontrollverdau

Mit der gewonnenen DNA wurden dann Restriktionsverdau als Kontrolle durchgeführt und diese mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Klone galten dann als positiv, wenn sie das komplette Plasmid enthielten (Vektor und Insert) und wenn das Plasmid in der richtigen Orientierung in den Vektor eingebaut worden war. Von den positiven Klonen wurde anschließend eine 30ml Übernachtskultur in flüssigem LB-Medium (5g Hefeextrakt, 10g Trypton/Pepton, 10g NaCl, ddH₂O ad 1l; pH 7,4) mit Zusatz des Selektionsmarkers (100µg/ml Ampicillin bzw. 50µg/ml Kanamycin) angesetzt. Die Aufreinigung der rekombinanten Plasmide aus *E.coli* erfolgte anschließend mit Hilfe des XChange Plasmid Kits der Firma Peqlab. Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse. Um die Nukleinsäurekonzentration der aufgereinigten Plasmide zu bestimmen, wurde die Absorption der Probe bei 260nm mit einem Nanodrop ND-1000 Photometer bestimmt.

2.2.7 Generierung von hTRPV6-mCherry-Expressionsplasmiden

In dieser Arbeit wurde das Tetrazyklin-abhängige Regulationssystem (Tet-System) aufgrund seiner hohen Effizienz in vielen Zelltypen und Organismen, seiner geringen Basalexpression, seiner hohen induzierbaren Expression, sowie seiner zeitlichen und quantitativen Modulierbarkeit als Expressionssystem für die beiden hTRPV6-Varianten ausgewählt.

Die Komponenten des Tet-Systems stammen aus dem Tetrazyklin-Operon des Enterobakteriums *Escherichia coli* (Gossen & Bujard, 1992). *Escherichia coli* hatte eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin entwickelt, indem es das Tetrazyklin mithilfe des Membranproteins TetA aus der Zelle ausschleust (Das *et al.*, 2016). In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet ein TetR-Dimer (Repressorprotein) an zwei Tet-Operatorsequenzen (tetO). Dieser Prozess blockiert die Transkription des *tetR* und *tetA* Gens. Diffundiert nun Tetrazyklin in die Zelle eines resistenten Bakteriums, so bildet sich ein Magnesium-Tetrazyklin-Komplex, welcher an den TetR-Operator-Komplex bindet und zu Konformationsänderungen im TetR-Dimer führt. Hierdurch kann das TetR-Dimer nicht mehr an den Tet-Operator binden, wodurch wiederum die Expression der *tetA* und *tetR* Gene stattfindet. TetA wird anschließend in die Membran eingebaut und exportiert den Magnesium-Tetrazyklin-Komplex (Saenger *et al.*, 2000).

Diese TetR-Operator-Tetrazyklin-Interaktion bildeten die Grundlage zur Entwicklung eines induzierbaren Genexpressionssystems. Durch die Fusion der C-terminalen VP16 Aktivierungsdomäne des *Herpes Simplex Virus* mit dem TetR-Repressor wurde ein Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator tTA für den Einsatz in Eukaryoten entwickelt (Gossen *et al.*, 1995). Zur Herstellung tTA-abhängiger Promotoren, wurde zunächst die Enhancer-Region des humanen Cytomegalovirus Promotors deletiert und anschließend mehrere tetO-Sequenzen eingefügt (Gossen & Bujard, 1992). In Anwesenheit von Tetrazyklin bildet dies einen Komplex mit dem Transaktivator, wodurch dieser seine Binefähigkeit an die Operator-Sequenzen verliert und die Transkription des Zielgens verhindert wird. Dieses 1992 von Gossen und Bujard entwickelte Tetrazyklin-induzierbare Expressionssystem wird heute als Tet-Off-System bezeichnet (Gossen *et al.*, 1994). Vier Punktmutationen innerhalb der TetR-Untereinheit des Transaktivators führten zu einer Umkehrung des tetO-Bindungsverhaltens. Die Zugabe von Tetrazyklin resultierte in einer spezifischen Bindung des rtTA-Transaktivators an die tetO-Sequenzen und einer damit verbundenen Transkription des Zielgens. Dieses System wird als Tet-On-System bezeichnet (Gossen *et al.*, 1995).

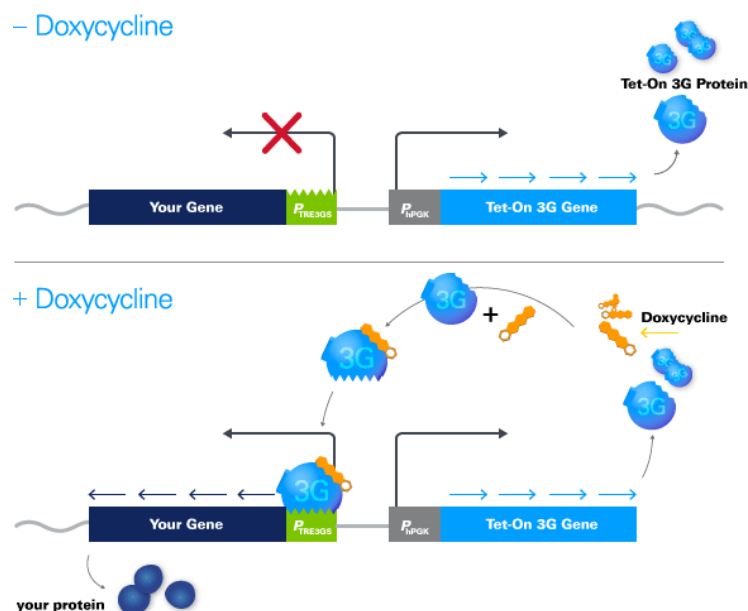


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Komponenten und der Funktionsweise des TetOne-Systems. Im TetOne-System befinden sich alle Komponenten auf einem Vektor. Dabei wird der Tet-On 3G Transaktivator unter der Kontrolle des konstitutiven humanen PGK-Promotors in Vorwärtsrichtung exprimiert, während das Transgen unter der Kontrolle des P_{TRE3GS} Promotors in Rückwärtsrichtung exprimiert wird. In Abwesenheit von Doxycyclin wird nur der Tet-On-3G Transaktivator exprimiert, kann jedoch nicht an den P_{TRE3GS} Promotor binden, weshalb die Expression des Transgens nicht stattfindet. Wird Doxycyclin dem Medium zugesetzt, bindet dies an den Tet-On-3G Transaktivator und führt zu einer Konformationsänderung des Transaktivators. Dieser ist nun in der Lage an die tet-Operatoresequenz im P_{TRE3GS} Promotor zu binden und somit die Expression des Transgens zu induzieren (Takara, 2019).

Seit seiner Entstehung im Jahre 1992 wurde das Tet-On-System ständig weiterentwickelt und optimiert (Transaktivator-Modifikation, Entfernung von Splicevarianten, Verwendung von

Doxyzyklin als Induktor usw.) (Loew *et al.*, 2010; Fussenegger, 2001). Dies führte letztendlich zur Entwicklung des TetOne-Systems (Abbildung 12), welches auch im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung induzierbarer Zellmodelle eingesetzt wurde. Im TetOne-System sind alle benötigten Elemente auf einem Plasmid untergebracht (Fussenegger, 2001). Hierbei wird der Tet-On 3G Transaktivator unter der Kontrolle des konstitutiven humanen PGK-Promotors in Vorwärtsrichtung exprimiert, während das Transgen unter der Kontrolle des P_{TRE3GS} Promotors in Rückwärtsrichtung exprimiert wird (Heinz *et al.*, 2011).

Der erste Schritt bei der Herstellung der beiden Expressionsvektoren bestand darin, die beiden Varianten des TRPV6-Kanals in die Multiple-Cloning-Site des TetOne-Vektors zu klonieren. Dafür wurden die ORF-Nukleotidsequenzen (NCBI Referenz: NM_018646.3) der langen und der kurzen Proteinvariante zuerst mittels Gensynthese von der Firma Life-Technologies im Auftrag hergestellt. Bei der Gensynthese wurde C-Terminal ein mCherry-Tag fusioniert. Beide Konstrukte weisen am 5'-Ende eine EcoRI Schnittstelle und am 3'-Ende eine MluI Schnittstelle auf und konnten durch einen Restriktionsverdau mit diesen Enzymen aus dem erhaltenen Vektor pMA-

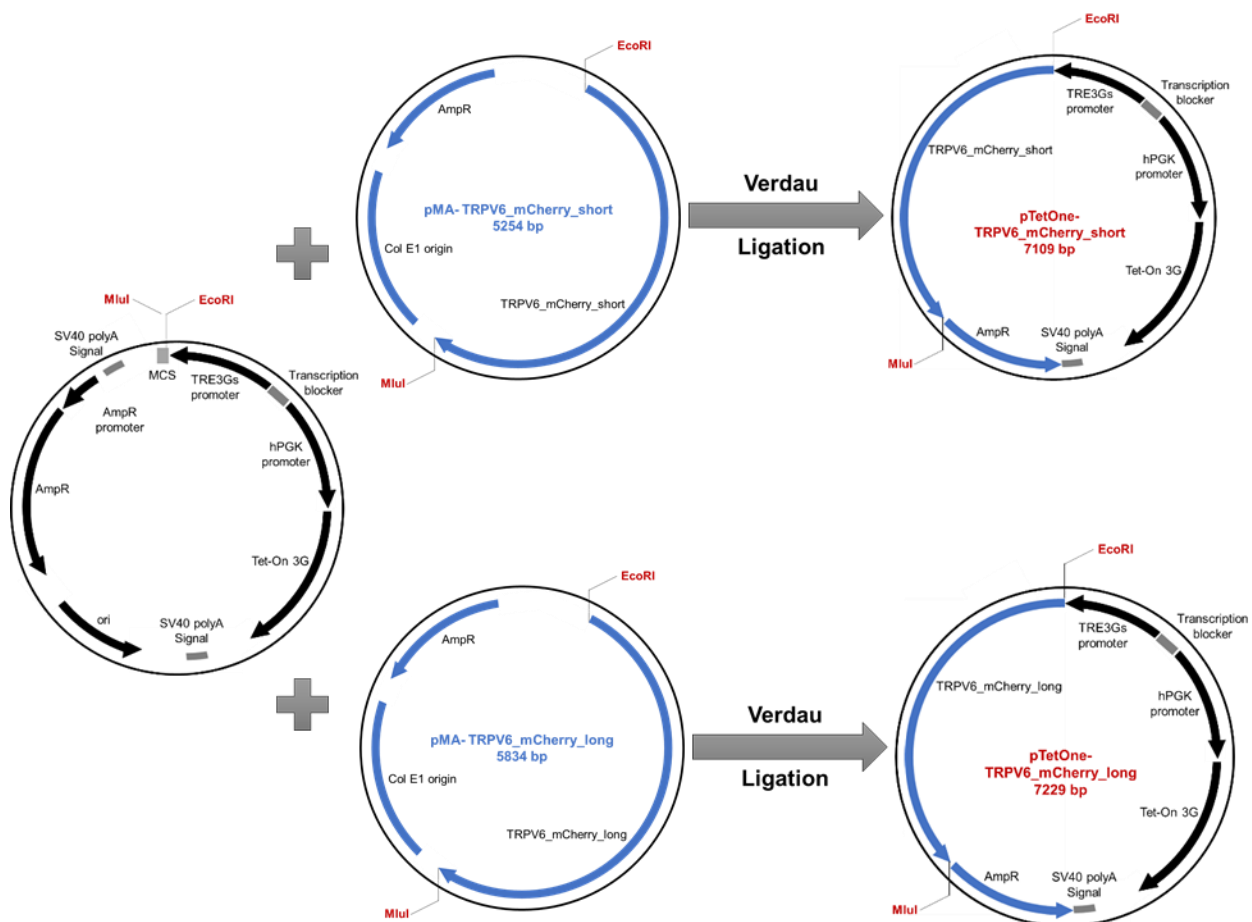


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Generierung der humanen TRPV6_{short} und TRPV6_{long}-mCherry Plasmide.

TRPV6_mCherry_long bzw. pMA-TRPV6_mCherry_short geschnitten werden. Der pTetOne-Vektor enthält ebenfalls die beiden Schnittstellen in der Multiple-Cloning-Site und wurde daher ebenso mit den Enzymen EcoRI und MluI verdaut. Anschließend erfolgte die Ligation des linearen Vektorfragments und des TRPV6_mCherry_short beziehungsweise des TRPV6_mCherry_long Fragments zu den Plasmiden pTetOne-TRPV6_mCherry_short und pTetOne-TRPV6_mCherry_long (Abbildung 13).

2.3 Proteinanalytische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Adhärente Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz des Zellrasens kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt und fünf Minuten lang bei 800rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen und in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 1.000g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100µl Lysepuffer (50mM Tris-HCl (pH 7,5), 15mM NaCl, 5% NP-40, 50mM NaF, Protease-Inhibitor-Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-fluorid)) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Zellsuspension alle fünf Minuten gevortext wurde. Zuletzt folgte nochmals eine Zentrifugation bei 10.000g und 4°C. Der so erhaltene Überstand, das Zelllysate, wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte nach Herstellerangaben mittels BCA-Assay der Firma Pierce. Die Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 SDS-PAGE und Immunoblot

Mit Hilfe der SDS-PAGE (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate – **P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis) können Proteingemische aufgetrennt werden. Sie dient dem Nachweis von Proteinen und deren Molekulargewichtsbestimmung. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und somit die Eigenladung der Proteine überdeckt.

SDS-PAGE

Zwischen zwei vertikale Glasplatten (Abstand 1mm) wurde ein 10%iges Polyacrylamid-Trenngel (29%Acryl- 1% Bisacrylamid, Trennpuffer (1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS, H₂O, 10% APS, TEMED) gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol entfernt, ein 5%iges Sammelgel (29% Acryl- 1% Bisacrylamid, Stacking Puffer (0,5M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, H₂O, 10% APS, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Auftrageschen eingesetzt. In der Zwischenzeit wurden die Zelllysate im Verhältnis 1:6 mit dem Ladepuffer (120mM Tris, 100mM EDTA, 20% Glycerin, 2% SDS, 4g/l Bromphenolblau, 450mM β -Mercaptoethanol (pH 7,2-7,4)) gemischt und anschließend sieben Minuten lang bei 99°C in einem Heizblock denaturiert. Durch das Erhitzen in SDS-haltigem Puffer, wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch das Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst. Das enthaltene Mercaptoethanol sorgt zusätzlich für eine Spaltung der Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen und führt somit zu einer Auflösung der Quartärstruktur. Somit wird gewährleistet, dass lediglich die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Polyacrylamidgel im Elektrophoresesystem (Bio-Rad Mini) vollständig mit Laufpuffer (25mM Tris Base, 0,19M Glycin, 0,1% SDS (w/v) (pH 8,3)) bedeckt. In die Auftrageschen wurden jeweils 50 μ g Protein geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromspannung von 150V solange durchgeführt, bis das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 2h).

Immunoblot

Direkt im Anschluss wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Die PVDF-Membran wurde hierfür zunächst 1-2s in 100% Methanol getaucht und anschließend in Transferpuffer (1mM CAPSO (pH 11), 1,5% Methanol) zwischengelagert. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde anschließend auf die feuchte PVDF-Membran gelegt. Danach wurde die Membran samt Gel zwischen jeweils zwei mit Transferpuffer befeuchtete Whatman 3 MM Filterpapiere und einen Schwamm gelegt. Dieser Stapel wurde danach in die Transferapparatur eingespannt. Zuletzt wurde der Tank der Apparatur mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für 1,5h bei 350mA.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5% Magermilchpulver in Blotwaschpuffer) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x20min mit dem Blotwaschpuffer

(137mM NaCl, 2,7mM KCl, 2mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄ x 2H₂O (pH 7.4), 0,1% Tween-20) gewaschen und danach 2h lang mit einem mit HRP (horseradish-peroxidase) -gekoppelten Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut 3x20min mit Blotwaschpuffer gewaschen. Die gebundene Peroxidase wurde mit dem SignalFire™ ECL-Reagenz von Cell Signaling nach Hersteller-Protokoll nachgewiesen. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, wandelt das HRP-Enzym des Zweitantikörpers Luminol in ein angeregtes intermediäres Dianion um, welches Licht emittiert. Diese Lichtemission wurde mit dem Geldokumentationssystem G:Box detektiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Die adhärent wachsenden Zellen wurden im jeweiligen zellspezifischen Medium (Tabelle 9) in Gewebekulturflaschen in wasserdampfgesättigter, 5%iger CO₂-Atmosphäre (95% Luftfeuchtigkeit) und 37°C in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Das sterile Arbeiten mit den Zellen wurde an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt. Täglich wurde die Konfluenz und Morphologie der Zellen mit Hilfe eines Inversmikroskops kontrolliert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 95% erreicht hatten, wurden sie subkultiviert (passagiert).

Subkultivierung

Das in periodischen Zeitintervallen durchzuführende Ausdünnen einer Kultur bezeichnet man als Subkultivieren oder Passagieren. Mit steigender Zelldichte sinkt sowohl der pH-Wert als auch das Nährstoffangebot des Mediums ab. Gleichzeitig steigt die Konzentration zytotoxischer Stoffwechselprodukte, welche ins Medium sezerniert wurden, an. Aufgrund dieser Faktoren hören die Zellen auf, sich zu teilen. Eine regelmäßige Subkultivierung beugt diesen Effekten vor (Schmitz, 2011).

Die Zelllinien wurden zwei- bis dreimal wöchentlich subkultiviert. Vor der Subkultivierung wurden die Kulturansätze zunächst makros- und mikroskopisch auf Kontaminationen und auf Auffälligkeiten der Zellmorphologie hin untersucht. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen anschließend mit Dulbecco´s-PBS (0.2g/l KCl, 0.2g/l KH₂PO₄, 8g/l NaCl, 1.15g/l Na₂HPO₄) gewaschen und danach mit Trypsin-EDTA (0,2g/l EDTA, 0,9g/l NaCl, 0,5g/l Trypsin, Dulbecco´s PBS) bedeckt, um die Zellen enzymatisch von der Zellkulturflasche abzulösen. Die Inkubation mit Trypsin-EDTA erfolgte für 5-10min im Begasungsbrutschrank.

Anschließend wurden die abgelösten Zellen in FCS-haltigem Medium resuspendiert. Ein Teil der homogenen, gut resuspendierten Zellsuspension wurde genutzt, um mit Hilfe des Zellzählgeräts ViCell die Lebendzellzahl, Gesamtzellzahl und Zellvitalität zu ermitteln. Basierend auf der gemessenen Lebendzellzahl und der benötigten Aussaatdichte wurde das benötigte Inokulum berechnet. Mit einer serologischen Pipette wurde das berechnete Inokulum in das auf 37°C temperierte frische Kultivierungsmedium überführt.

Die Zellen wurden erst nach zwei Passagen nach dem Auftauen für die Versuche eingesetzt. Zudem wurden die Zellen insgesamt für nicht länger als 20 Passagen kultiviert, um Einflüsse durch Veränderungen der Eigenschaften der Zelllinien bei langer Kultivierungsdauer zu vermeiden.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen

Einfrieren

Unter der Kryokonservierung versteht man das Einfrieren und Lagern von Zellen bei Temperaturen unter $\leq 150^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff oder in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Ziel der Kryokonservierung ist es, biologisches Zellmaterial zeitlich unbefristet lang zu lagern. Normalerweise stellt der Prozess des Tiefgefrierens ein Problem für die Zellvitalität dar. Dies beruht auf den folgenden drei Prozessen, welche während des Einfrierprozesses auftreten: Die Bildung von Eiskristallen, die Dehydrierung der Zellen und der Konzentrationsanstieg der gelösten Stoffe. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen bei der Kryokonservierung ist bei einer niedrigen Kühlrate ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) und der Beimischung des Gefrierschutzmittels DMSO am höchsten. Unter diesen Bedingungen ist die Größenverteilung entstehender intrazellulärer Eiskristalle und der durch den Konzentrationsanstieg der gelösten Stoffe resultierende osmotische Druck am wenigsten zellschädigend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von allen verwendeten Zelllinien eine Zellbank von insgesamt jeweils 15 Kryovials pro Zelllinie angelegt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst trypsiniert, die entstandene Zellsuspension fünf Minuten lang bei 134g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde danach in Einfriermedium (zellspezifisches Medium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und 1ml der Zellsuspension in beschriftete 1,5ml-Kryoröhrchen (Greiner) überführt. Pro Kryovial wurden 1×10^6 Zellen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden anschließend sofort in einen vorgekühlten Einfrierbehälter überführt. Dieser Einfrierbehälter wurde 24h lang bei -80°C gelagert, bevor die Kryovials zur dauerhaften Lagerung in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt wurden (Schmitz, 2011).

Auftauen

Während der Einfrierprozess möglichst langsam und bei konstanter Kühlrate erfolgen soll, sollte der Auftauprozess sehr schnell erfolgen. Ist der Auftauprozess zu langsam, so verbinden sich kleine Kristalle miteinander und es kommt zu einer zellschädlichen Rekrystallisation. Ein weiterer Grund ist die bei wärmeren Temperaturen auftretende toxische Eigenschaft des verwendeten Gefrierschutzmittels DMSO. Dieses sollte daher nach dem Auftauen durch Waschschrirte so schnell wie möglich entfernt werden.

Vorbreitend wurden pro Kryovial 10ml zellspezifisches Medium auf 37°C temperiert. Das Kryovial wurde dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in das in einem Zentrifugenröhrchen befindliche vorgewärmte Medium überführt und 5min lang bei 134g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 5ml vorgewärmten Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach 24-48h erfolgte entweder ein Mediumwechsel oder die Subkultivierung wie unter 2.4.1 beschrieben (Schmitz, 2011).

2.4.3 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des „CellTiter-Blue® Cell Viability Assays“ bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine fluorometrische Messmethode. Der Assay nutzt den Redoxindikator Resazurin um die metabolische Aktivität der Zellen zu bestimmen. Resazurin ist dunkelblau und besitzt nur eine sehr geringe intrinsische Fluoreszenz. Es kann in die Zelle eindringen und dort durch die Aktivität des Redoxenzym Diaphorase unter Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ zu Resorufin reduziert werden, einem rosa Farbstoff, der eine hohe Fluoreszenzintensität aufweist

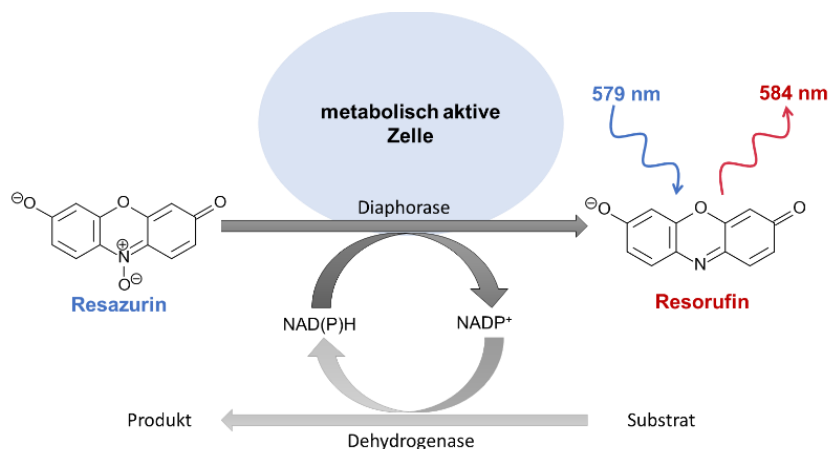


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Cell-Titer-Blue® Assays. Das Enzym Diaphorase reduziert in metabolisch aktiven Zellen Resazurin zu Resorufin, welches fluorometrisch nachgewiesen werden kann.

(579_{EX}/584_{EM}). Tote Zellen bzw. nicht vitale Zellen verlieren sehr schnell diese metabolische Aktivität, d.h. sie sind nicht mehr in der Lage Resazurin zu reduzieren und generieren somit kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 14).

Durchführung:

Es wurden CHO-K1, CHO-TetOne-TRPV6_short und CHO-TetOne-TRPV6_long Zellen mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/Well (100 μ l Endvolumen/Well) in 96-Well-Platten (je eine Platte für die Zeitpunkte 0, 24, 48, 72, 96h) ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion der Zellen mit 0, 1, 10, 50, 100, 1000 ng/ml Doxyzyklin und die Messung der ersten Platte (0h Wert). Hierfür wurden 20 μ l CTB Reagenz zu den 100 μ l Medium pro Well pipettiert. Nach 4h Inkubation im Begasungsbrutschrank erfolgte die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des Fluorocan Mikrotiterplattenreaders (560nm_{EX}/590nm_{EM}). Als Negativkontrolle wurden Wells ohne Zellen und als Positivkontrolle Wells mit Zellen, die mit 4% bzw. 10% DMSO behandelt wurden, eingesetzt. Die erhaltenen Messdaten wurden mithilfe der Negativkontrolle hinsichtlich unspezifischer Hintergrundsignale korrigiert

2.4.4 Bestimmung der Verdopplungszeit

Um den Einfluss der TRPV6 Expression auf das Wachstumsverhalten der Zellen untersuchen zu können, wurde die Verdopplungszeit t_d der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die Wachstumsrate μ gibt an, wie viel Zellen pro Zeiteinheit zur Kultur hinzukommen. Unter der Verdopplungszeit versteht man die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen.

Durchführung

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurden jeweils 50.000 Zellen in die Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mit Doxyzyklin behandelt, um die Expression des TRPV6 Kanals zu induzieren, während der andere Teil, der als Kontrolle dient, nicht mit Doxyzyklin behandelt wurde. Die Platten wurden anschließend im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach 0, 24, 48, 72 und 96h Inkubation wurden die Zellen in der 6-Well-Platte mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst und die Zellzahl anschließend mit Hilfe des Zellzählgerätes ViCell bestimmt. Die Zellzahlen für 0, 24, 48, 72 und 96h Induktion wurden anschließend in Form einer Wachstumskurve aufgetragen. Anschließend wurde die Verdopplungszeit t_d in der exponentiellen Wachstumsphase der Kurve bestimmt (Abbildung 15).

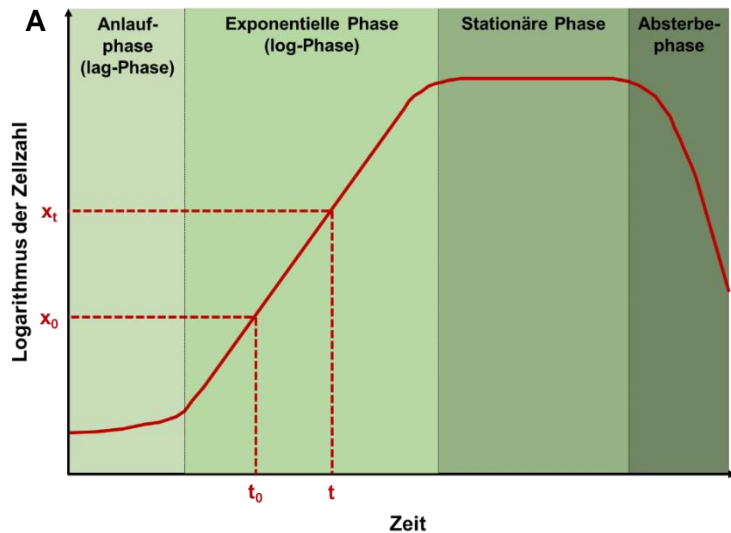


Abbildung 15: Ideale Wachstumskurve einer Zellkultur. A) Die Wachstumskurve setzt sich aus vier Phasen zusammen. In der Anlaufphase müssen sich die Zellen zunächst an die neue Umgebung adaptieren, weshalb das Zellwachstum verlangsamt ist. In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase wachsen die Zellen optimal mit maximaler Wachstumsrate. In der darauffolgenden stationären Phase ist die Geschwindigkeit der Vermehrung und des Absterbens der Zellen gleich groß, weshalb die Zellzahl konstant bleibt. In der anschließenden Absterbephase überwiegt das Absterben der Zellen, wodurch die Zellzahl sinkt. B) Formel zur Berechnung der Verdopplungszeit einer Zellkultur innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase.

B

$$\text{Verdopplungszeit } t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{(\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0)}$$

2.4.5 Transiente und stabile Transfektion

In der Zellbiologie bezeichnet man das Einbringen von zellfremdem genetischem Material in eukaryotische Zellen als Transfektion. Unter einer transienten Transfektion versteht man dabei das zeitweilige Einbringen von DNA in die Wirtszelle und unter der stabilen Transfektion den dauerhaften Einbau in das Genom. Es gibt unterschiedliche Methoden, das genetische Material in die Wirtszelle einzubringen. In dieser Arbeit wurden die Zellen mit einer nicht-liposomalen Methode transfiziert.

Durchführung

Zur Vorbereitung der stabilen Transfektion wurde zunächst ein Test durchgeführt, um die optimale Konzentration des Selektionsantibiotikums zu ermitteln. Hierfür wurden 1×10^5 bzw. 1×10^6 CHO-K1-Zellen in die Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden 0, 50, 100, 200, 400 bzw. $800 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin B in die Wells hinzu pipettiert. In den folgenden 14 Tagen wurde die Morphologie und Vitalität der Zellen mit Hilfe eines inversen Mikroskops dokumentiert. Die Konzentration, welche bereits nach fünf Tagen zu einem massiven Zelltod führt und alle Zellen innerhalb von zwei Wochen abtötet, wird als Selektionskonzentration gewählt.

Anschließend wurde ein Test durchgeführt, um die optimale Aussaatdichte zu ermitteln. Hierfür wurden 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , 1×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen in 10-cm Zellkulturschalen mit

Selektionsmedium ausgesät. Die Zellmorphologie und Vitalität der Zellen wurden die nächsten 10 Tage mit Hilfe eines inversen Mikroskops dokumentiert. Es wurde die Zellzahl als optimale Aussaatdichte ausgewählt, bei der die Zellen nach fünf Tagen eine Konfluenz von etwa 80% erreicht haben.

Für die transiente Transfektion wurden CHO-K1-Zellen 24h vor der geplanten Transfektion mit der zuvor ermittelten optimalen Zelldichte in 6-Well-Platten ausgesät. Der Transfektionsansatz setzt sich aus Xfect Reaktionspuffer, der zu transfizierenden DNA und dem Xfect Transfektionsreagenz zusammen (Tabelle 11). Das DNA-Polymer-Gemisch wurde zunächst 10s lang homogenisiert und danach 10min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben wurde, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurde der komplette Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel.

Tabelle 11: Transfektionsansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte

linearisierte DNA (z.B. TetOne-TRPV6_mCherry_short/long)	5µg
linearer Hygromycin Selektionsmarker	100ng
Xfect Polymer	1.5µl
Xfect Reaktionspuffer	Ad 100µl

2.4.6 Subklonierung zur Selektion stabil transfizierter Einzelklone

Selektionsmedium für TetOne-Klone:

Ham's F12, 10% Tet-approved FCS, 1% Pen/Strep, 200µg/ml Hygromycin B

Um stabile Zelllinien zu erhalten, wurden die Zellen 48h nach der Transfektion in vier 10-cm Zellkulturschalen verteilt. Nach weiteren 48h erfolgte die Zugabe der zuvor ermittelten optimalen Hygromycin-Konzentration um den Selektionsdruck auszuüben. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach etwa zwei Wochen begannen sich Hygromycin-resistente Kolonien zu entwickeln. Diese Kolonien wurden anschließend in je ein Well einer 24-Well-Platte übertragen. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie auf zwei Platten verteilt. Die Mischklone in der einen Platte wurden mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert und nach 24h wurde die mCherry-Fluoreszenz der verschiedenen Klone mikroskopisch analysiert. Klone, die nach der Induktion mit Doxyzyklin eine mCherry-Fluoreszenz aufwiesen, wurden von der nicht-induzierten Parallelplatte in 6-Well-Platten übertragen. Um aus den Mischklonen nun Einzelklone zu isolieren, wurde mit diesen Zellen anschließend eine „limited dilution series“ durchgeführt (Abbildung 16). Hierzu

wurde von jedem Mischklon eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 20.000 Zellen/ml angesetzt. Diese Zellsuspension wurde anschließend nach dem in Abbildung 16 gezeigten Schema in einer 96-Well-Platte verdünnt. Nach 4-5 Tagen Inkubation im Begasungsbrutschrank wurden die Platten mit Hilfe eines inversen Mikroskops untersucht und die Wells markiert, die lediglich eine einzelne Zellkolonie enthielten. Diese Kolonien wurden anschließend in 24-Well-Platten transferiert. Die Einzelklone wurden nach 24-stündiger Inkubation mit 100ng/ml Doxyzyklin fluoreszenzmikroskopisch auf eine mCherry-Fluoreszenz hin untersucht. Die positiven Klone wurden weiter expandiert, Zellen kryokonserviert und parallel ihre Eigenschaften, wie beispielsweise die Regulierbarkeit der Expression mit Doxyzyklin und das Calciumeinstromverhalten, analysiert.

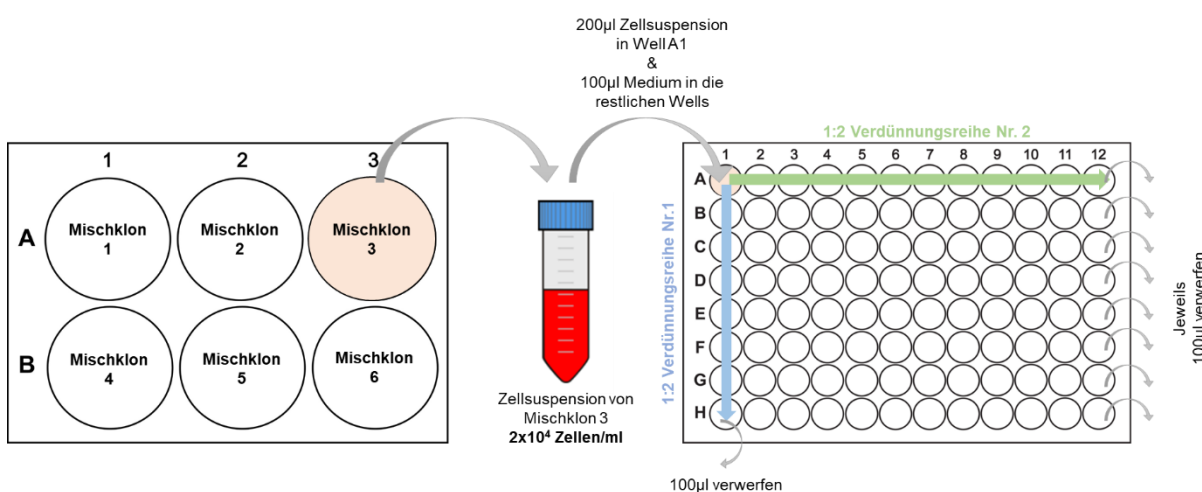


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Pipettierschemas für die limited dilution series.

2.4.7 Herstellung von Sphäroidkulturen

Dreidimensionale (3D) Zellkulturmodelle haben in letzter Zeit immer mehr an Interesse gewonnen, da sie die komplexen physiologischen *in vivo* Bedingungen besser reflektieren als die traditionellen zweidimensionalen Zellkultursysteme. Zellen, die als Sphäroide wachsen, weisen einen deutlichen Proliferationsgradienten auf, welcher die Verteilung von Sauerstoff-, Nährstoff- und Energiegradienten sowie die Akkumulation von Stoffwechselprodukten sehr gut widerspiegelt (Wenzel *et al.*, 2014).

Es existieren unterschiedliche Techniken zur Generierung von 3D-Zellkulturen. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen Matrix-basierten und Matrix-freien Methoden. Die „forced floating“, „hanging drop“ und „agitation based method“ stellen die gebräuchlichsten Matrix-freien Methoden dar (Abbildung 17). Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode zur

Generierung von Sphäroiden zählt zur „forced-floating“-Technik. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, die Adhärenz der Zellen durch eine spezielle Oberflächenbeschichtung zu verhindern (Edmondson *et al.*, 2014; Breslin & O’Driscoll, 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ULA (Ultra-Low-Attachment)-Platten der Firma Corning sind mit einem kovalent gebundenen hydrophilen, neutral geladenen Hydrogel beschichtet, welches die Bindemöglichkeiten von Adhäsionsproteinen sehr stark reduziert.

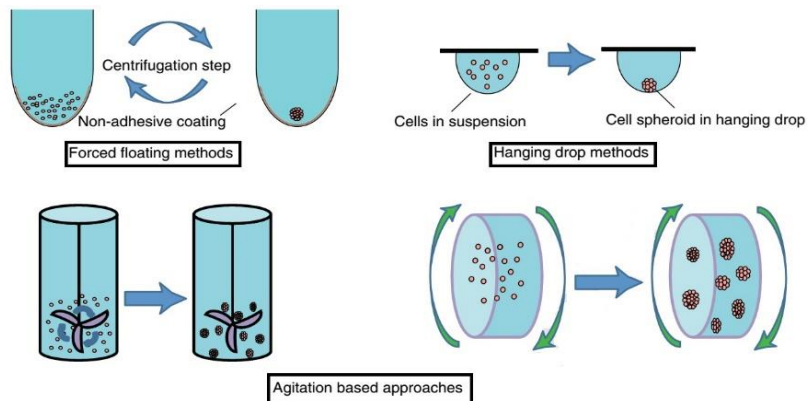


Abbildung 17: Scaffold-freie Methoden zur 3D-Kultivierung von Zellkulturen (Breslin & O’Driscoll, 2013).

Durchführung

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro Well in 200µl Endvolumen in 96-Well ULA-Platten ausgesät. Nach der Aussaat wurde die Platte 5min lang bei 33g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 24h. CHO-TetOne-TRPV6_mCherry_short/long Zellen wurden 24h nach der Aussaat mit 100ng/ml Doxzyklin induziert. Die Sphäroidbildung wurde anschließend mikroskopisch untersucht.

2.4.8 3D-Matrixinvasionsassay

Invasion ist definiert als Zellbewegung durch eine 3D-Matrix. Um durch eine Matrix wandern zu können, muss die Zelle ihre Form verändern und mit der extrazellulären Matrix interagieren. Die Invasion beinhaltet somit Prozesse wie Adhäsion, Proteolyse von extrazellulären Matrixkomponenten sowie Migration. Es existieren unterschiedliche Methoden zum Nachweis des Invasionsverhaltens von Zellen *in vitro* (z.B. Transwell invasion assay, Gelatin degradation assay, Spheroid confrontation assay). Zur Analyse des Invasionsverhaltens der Zellmodelle, wurde in dieser Arbeit ein 3D-Matrixinvasionsassay (Abbildung 18) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Sphäroide in eine 3D extrazelluläre Matrix eingebettet werden.

Invasive Zellen werden damit beginnen, vom Sphäroid aus in die umliegende Matrix zu wandern, während nicht-invasive Zellen im Sphäroid verbleiben (Kramer *et al.*, 2013).

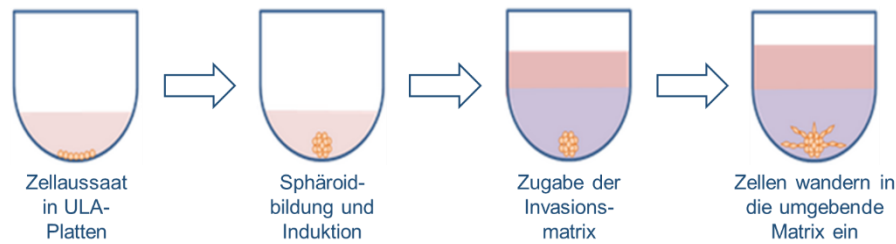


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Matrix-Invasionsassays.

Durchführung:

Der erste Schritt besteht darin, Sphäroide zu generieren. Hierfür wurden 20.000 Zellen/Well in einem Endvolumen von 100µl in ULA-Platten ausgesät (siehe 2.4.7). 96h nach der Aussaat wurden die entstandenen Sphäroide mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt, um die Expression des TRPV6-Kanals zu induzieren. Zeitgleich wurden Sphäroide mit 0ng/ml Doxyzyklin behandelt, um als Negativkontrolle zu dienen. Nach 48h Inkubation mit Doxyzyklin wurde zunächst aus jedem Well 50 µl Medium entfernt. Anschließend wurde die Platte mit den Sphäroiden für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sphäroidplatte auf eine Kühlunterlage unter der Sterilwerkbank gelegt. Anschließend wurden 50µl eiskalte BME-Lösung mit Hilfe vorgekühlter Pipettenspitzen vorsichtig in jedes Well pipettiert. Die ULA-Platte wurde danach zum Aushärten für zweieinhalb Stunden in den Begasungsbrutschrank gestellt. Nach Ablauf der Aushärtezeit wurden 100µl Medium mit 0 bzw. 200ng/ml Doxyzyklin und 20% FCS in jedes Well pipettiert. In den darauffolgenden Tagen wurde das Invasionsverhalten mikroskopisch analysiert.

2.4.9 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1.5×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Platten auf sterilen Deckgläschen (18x18mm, Thermo-Scientific) ausgesät und anschließend im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach 24h wurde das Medium gegen Doxyzyklin-haltiges Medium ausgetauscht, um die Expression des TRPV6-Kanals zu induzieren. Nach 24-stündiger Induktion mit Doxyzyklin wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 1ml 4%igem PFA für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Schütteln. Im Anschluss daran wurde das PFA wieder abgenommen und die Zellen dreimal für 5min mit PBS bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15min lang bei Raumtemperatur mit 0.4% Triton X-100

permeabilisiert. Danach wurden die Zellen nochmals mit PBS (3x5min bei RT) gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte das Blockieren mit einer 3%igen BSA-Lösung für 1h bei Raumtemperatur. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, welcher in einer 3%igen BSA-Lösung verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper sowie 1µg/ml DAPI, welche ebenfalls in 3%iger BSA-Lösung verdünnt wurden. Nach Ablauf der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen (3x5min bei RT) und anschließend auf Objektträgern mit Mowiol eingedeckt.

Die Analyse der eingedeckten Proben erfolgte entweder an einem inversen Leica Microsystems TCS SP8 -Mikroskop (Leica Microsystems CMS, Mannheim) mit einem 488nm, 561nm und 633nm Laser oder am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop.

2.4.10 NFAT-Reporterassay

Der NFAT Signalweg koppelt intrazelluläre Calciumsignale mit nachfolgenden Signalwegen, welche beispielsweise in die Proliferation, Invasion sowie Migration einer Zelle involviert sind (Qin *et al.*, 2014). Der Einfluss der hTRPV6-Expression auf die Aktivierung des NFAT-Signalwegs wurde mit Hilfe eines NFAT-Reporterassays untersucht (Abbildung 19). Unter einem Reporterassay versteht man ein Gen, welches zum Nachweis der Expression anderer Gene

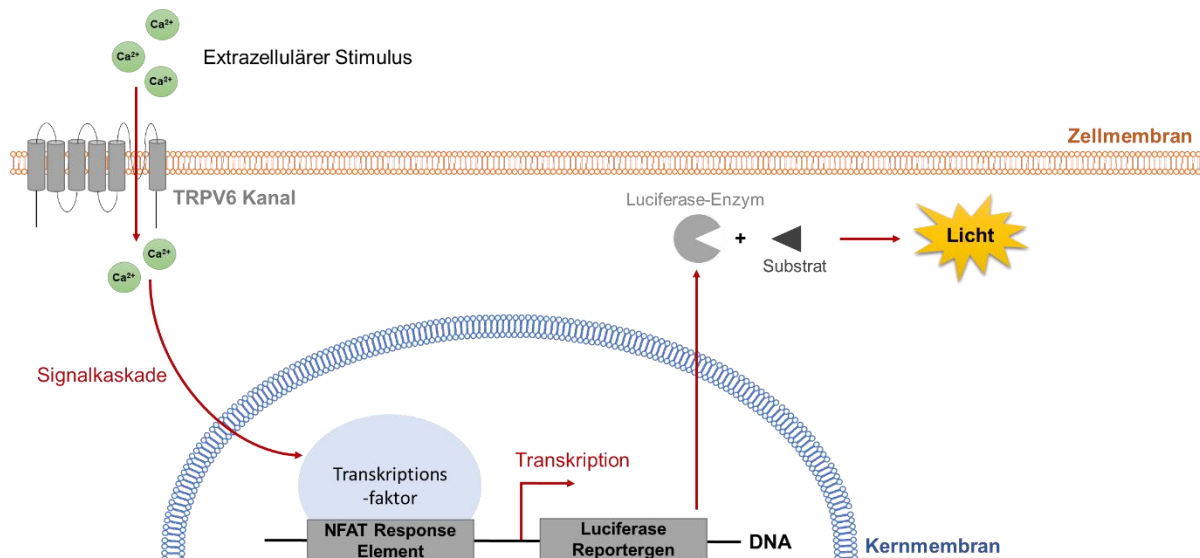


Abbildung 19: Schematische Darstellung des NFAT-Reporterassays mit TRPV6-exprimierenden Zellen. Ca²⁺ strömt durch den TRPV6-Kanal in die Zelle ein. Dies führt zur Aktivierung einer Calcium-abhängigen Signalkaskade, an deren Ende NFAT in den Zellkern wandert und an NFAT-spezifische Elemente bindet, in diesem Fall an NFAT Response Elemente. Die Bindung des Transkriptionsfaktors führt zur Transkription eines Luciferasegens und somit zur Expression des Luciferase-Enzyms. Gibt man nun das Luciferase-Substrat zu den Zellen, so setzt das Luciferase-Enzym das Substrat um, wodurch Biolumineszenz entsteht, welche wiederum messbar ist.

verwendet werden kann. Das Reporterplasmid, welches in die zu untersuchenden Zellen transfiziert wird, beinhaltet ein Luciferase-Reportergen sowie eine DNA-Bindestelle für den NFAT-Transkriptionsfaktor, welche als DNA-Response-Element bezeichnet wird und die transkriptionelle Aktivierung des Luciferase-Reportergens kontrolliert. Eine Aktivierung der NFAT-Signalkaskade führt zur Bindung des NFAT-Transkriptionsfaktors an die DNA-Bindestelle und somit zur Transkription der Luciferase. Die Höhe der NFAT-Aktivierung kann über die Höhe der enzymatischen Aktivität der Luciferase bestimmt werden. Dafür wird das Luciferase-spezifische Substrat Beetle-Luciferin zu den Zellen gegeben. Dieses wird von der Luciferase in Anwesenheit von Sauerstoff, Magnesium und ATP in Oxyluciferin umgewandelt, wobei Licht der Wellenlänge 565nm emittiert wird.

Durchführung

Für diesen Assay wurden zunächst 10.000 Zellen/Well in einem Endvolumen von 100µl in weißwandige 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit dem Kontrollplasmid pGL4.54[luc2/TK] und dem Reporterplasmid pNL[NlucP/NFAT-RE/Hygro] kotransfiziert. Der pNL[NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vektor enthält das NFAT response Element (NFAT-RE), welches die Transkription des Luciferase Reprtergens NlucP antreibt. NlucP ist eine synthetisch hergestellte Luciferase-Sequenz mit einer Codon-Optimierung. Nach weiteren 24h wurden die CHO-TetOne-TRPV6_short/long Zellen mit Doxyzyklin induziert. Nach 24h Inkubation mit Doxyzyklin erfolgte die Zugabe des Luciferase-Substrates und die Messung der Luciferaseaktivität im Clariostar-Gerät.

2.4.11 Migrationsassay

Migration wird als gerichtete Bewegung einer Zelle auf einem Substrat definiert. Sie ist eine wesentliche Eigenschaft lebender Zellen und kritisch für die normale Entwicklung, die Immunantwort aber auch für krankheitsrelevante Prozesse wie beispielsweise der Metastasierung von Krebs oder Entzündungsreaktionen. Es existieren unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Migrationsverhaltens einer Zelle. Beispiele hierfür sind der „Transwell Migration Assay“, „Wound Healing Assay“ oder „Cell Exclusion Zone Assay“ (Kramer *et al.*, 2013; Justus *et al.*, 2014). Bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assay handelt es sich um einen sogenannten „Cell Exclusion Zone Assay“. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 20 dargestellt und beruht darauf, dass zwei mit Zellen bewachsene Flächen durch eine Begrenzung voneinander getrennt sind. Wird diese entfernt, beginnen die Zellen in die entstandene zellfreie

Fläche zu migrieren, bis sich neue Zell-Zell-Kontakte gebildet haben. Dieser Vorgang kann mittels Lebendzellmikroskopie analysiert werden.

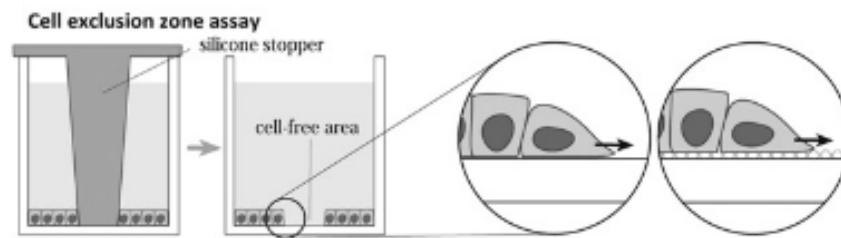


Abbildung 20: Prinzip eines "Cell exclusion zone" Assays. Zellen werden in Wells ausgesät, in deren Mitte sich ein Silikonstopfen befindet. Dadurch werden zwei Zellflächen generiert, welche durch einen definierten zellfreien Spalt voneinander getrennt sind. Nach dem Entfernen des Silikonstopfens kann das Zuwachsen der zellfreien Fläche mikroskopisch quantifiziert werden (Kramer *et al.*, 2013).

Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Migrationsassay mit Hilfe von Silikon-Inserts der Firma Ibidi durchgeführt (Abbildung 21). Die Inserts bestehen aus einem biokompatiblen Silikonmaterial mit einer adhäsiven Unterseite. Die Inserts bestehen aus zwei Zellkultur-Reservoirs, welche durch einen 500µm breiten Spalt voneinander getrennt sind.

Zunächst wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml hergestellt. Je 70µl dieser Zellsuspension wurde in jedes der beiden Wells des Inserts pipettiert. Die Fläche außerhalb des Inserts wurde mit dem entsprechenden zellspezifischen Medium gefüllt. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen in den Inserts mit 100ng/ml Doxzyzyklin bzw. als Negativkontrolle mit 0ng/ml Doxzyzyklin behandelt. Nach einer 24-stündigen Induktionszeit wurde das Medium abgesaugt und das Insert vorsichtig mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt, sodass ein zellfreier Spalt von 500µm Breite entstand. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen oder Zellbruchstücke zu beseitigen. Danach wurde frisches Medium mit 0 bzw. 100ng/ml Doxzyzyklin in das Well pipettiert. Im Anschluss daran wurde das Insert in einem am Mikroskop angebrachten Inkubatoraufsatz (37°C , $5\%\text{CO}_2$) eingesetzt und mit Hilfe

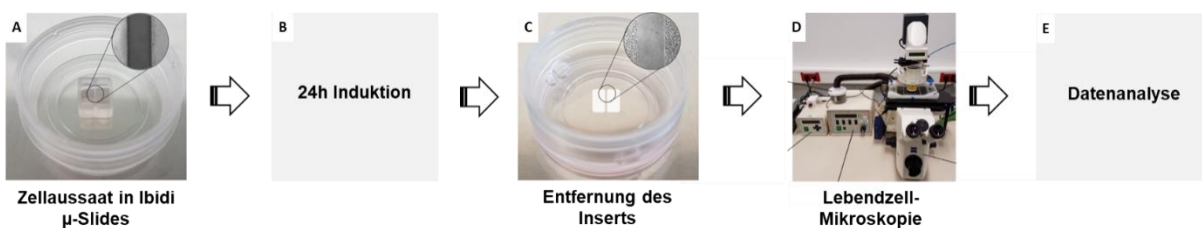


Abbildung 21: Ablauf des Migrationsassays. Zellen wurden zunächst in Ibidi µ-Slides ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion der TRPV6-Expression durch die Zugabe von Doxzyzyklin. Nach weiteren 24h wurde das Silikoninsert entfernt. In der Zellkulturschale befinden sich nun zwei mit Zellen bewachsene Flächen, die durch einen 500µm breiten Spalt voneinander getrennt sind. Das Zuwachsen dieses Spaltes wird 24h lang mittels Mikroskopie beobachtet. Anschließend folgt die Berechnung der zellfreien Fläche über die Zeit.

eines 10x Objektiv über einen Zeitraum von 24h Bilder des zellfreien Spaltes im Zeitintervall von 15min aufgenommen. Die Abnahme der zellfreien Fläche wurde anschließend mit Hilfe der Programme Fiji und Excel quantifiziert.

2.4.12 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fluo-8

Die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des Farbstoffes Fluo-8® untersucht. Fluo-8® (Abbildung 22) ist ein auf Fluorescein basierender, grünfluoreszierender ($490nm_{EX}/520nm_{EM}$), Ca^{2+} -bindender Farbstoff, der für die Detektion von intrazellulärem Ca^{2+} eingesetzt wird. Bindet Ca^{2+} an den Fluoreszenzindikator, kommt es zu einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität.

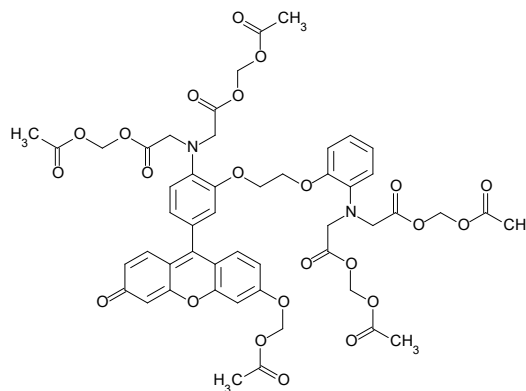


Abbildung 22: Strukturformel von Fluo-8® AM.

Die mikroskopische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mittels Lebendzellfluoreszenzmikroskopie in Durchflusskammern. Als Durchflusskammern kamen die μ -Slides VI^{0.4} der Firma Ibidi zum Einsatz (Abbildung 23). Sie besitzen das Format eines konventionellen Objektträgers. Auf diesen μ -Slides befinden sich sechs Kanäle mit den Maßen 0.4x3.8x17mm (Höhe x Breite x Länge), woraus sich ein Kanalvolumen von 30 μ l und eine Fläche von 0.6cm² pro Kanal ergibt. An beiden Kanalenden befindet sich jeweils ein Reservoir mit einem Volumen von 60 μ l, in welches das entsprechende zellspezifische Medium pipettiert werden kann. Die Kanäle können zudem mittels Luer-Adapter an ein Pumpsystem angeschlossen werden.

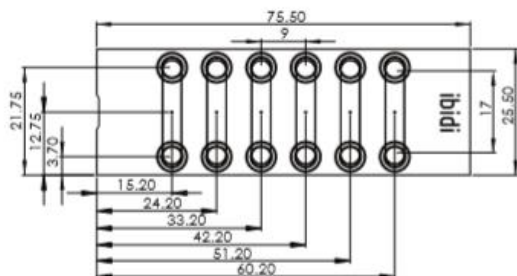


Abbildung 23: Ibidi μ -Slide mit 6 Kanälen für Lebendzell-Durchflusseperimente (Ibidi, 2019).

Durchführung

Fluo-8® AM Beladungspuffer:

Ca²⁺-freier Puffer, 2.5mM Probenecid, 2µM Fluo-8® AM

→ Wurde an jedem Messtag frisch angesetzt

Ca²⁺-freier Puffer:

140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂·6H₂O, 10mM Hepes, 10mM D-Glucose Monohydrat, 1mM EGTA

→ Mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt und anschließend sterilfiltriert (0.2µm)

Ca²⁺-haltiger Puffer:

140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂·6H₂O, 10mM Hepes, 10mM D-Glucose Monohydrat, 2mM CaCl₂·2H₂O

→ Mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt und anschließend sterilfiltriert (0.2µm)

Thapsigargin:

Ca²⁺-freier Puffer, 100nM Thapsigargin

→ Wurde an jedem Messtag frisch angesetzt

Waschpuffer:

Ca²⁺-freier Puffer, 2µM Probenecid

→ Wurde an jedem Messtag frisch angesetzt

Für die Aussaat der Zellen in die µ-Slides wurde zunächst eine Zellsuspension mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml angesetzt. Anschließend wurden 30µl dieser Zellsuspension in jeden der sechs Kanäle ausgesät. Das µ-Slide wurde anschließend für 30 Minuten in den Begasungsbrutschrank gestellt, um ein Adhären der Zellen zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurden jeweils 60µl des zellspezifischen Mediums in die Reservoirs an den Kanalenden pipettiert und das µ-Slide im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen mit Doxyzyklin behandelt, um die Expression des TRPV6 Kanals zu induzieren. Hierzu wurde zunächst das Medium in den Reservoirs mithilfe einer Pipette abgenommen und gegen Doxyzyklin-haltiges Medium ausgetauscht. Anschließend wurde das µ-Slide weiter im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Am Tag des Experiments wurde zunächst das Medium im ersten Kanal des µ-Slide mithilfe einer Pipette abgenommen. Anschließend wurde der erste Kanal mit 140µl Ca²⁺-freiem Puffer gespült und im Anschluss daran mit 140µl Fluo-8® AM Beladungspuffer beladen. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. In dieser Zeit diffundiert der Fluo-8® AM

Farbstoff in die Zellen. Das im Puffer enthaltene Probenecid, welches ein Inhibitor von organischen Anionen-Transportern ist, wurde eingesetzt, um den Farbstoffverlust aus der Zelle zu reduzieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein Waschschrift, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und eine weitere 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Ca²⁺-freiem Puffer. In dieser Zeit wird der in den Zellen akkumulierte Fluo-8 Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen vollständig hydrolysiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde der erste Kanal des Ibidi μ -Slides an das Pumpsystem angeschlossen.

Zur Gewährleistung gleicher Bedingungen wurden die Kanäle in einem zeitlichen Abstand von 30min mit dem Farbstoff beladen.

Am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M wurden zunächst Aufnahmen mit dem Filtersatz 45 (Texas-Red) angefertigt, um die Expression des TRPV6-Ionenkanals zu überprüfen. Im Anschluss daran wurden mit Hilfe der AxioVision Software 350 Aufnahmen mit einem Intervall von 2s, dem Filtersatz 49 (YFP) und einer Belichtungszeit von 100ms mit der ImagEM C9100-13 EM-CCD Kamera gemacht. Während der Aufnahme wurde der Kanal mit folgenden Puffern durchströmt:

Bild 1-40	Calcium-freier Puffer
Bild 41-200	Thapsigargin
Bild 201-350	Calcium-haltiger Puffer

2.5 Bildanalyse

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Fiji, Matlab, Microsoft Excel und Graph Pad Prism.

2.5.1 Calcium-Imaging

Als erster Schritt wurde eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Anschließend wurden alle Zellen als sogenannte ROIs (Region Of Interest) im Programm Fiji markiert. Daraufhin wurde die Fluo-8® Fluoreszenzintensität mit Hilfe von Fiji von jeder Zelle und zu jedem Zeitpunkt gemessen. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit der folgenden Formel normalisiert:

$$\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$$

wobei F die Fluoreszenzintensität einer Zelle pro Zeitpunkt und F_0 den Mittelwert der als Basislinie aufgenommenen ersten 40 Bilder der Messung der jeweiligen Zelle darstellt. Die auf diese Weise erhaltenen Messwerte wurden anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Zudem wurde das Peak Maximum, sowie die Zeit bis zum Erreichen des Peak Maximums bestimmt.

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde pro zugegebener Konzentration der Mittelwert der Peak Maxima $((F-F_0)/F_0)_{\max} = \Delta F_{\max}/F_0$ berechnet. Diese relativen Fluoreszenzintensitäten wurden anschließend gegen die Agonist- beziehungsweise Antagonist-Konzentration aufgetragen. Die EC_{50} - und IC_{50} -Werte wurden dann mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 8 mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse nach den in Abbildung 24 angegebenen Formeln berechnet:

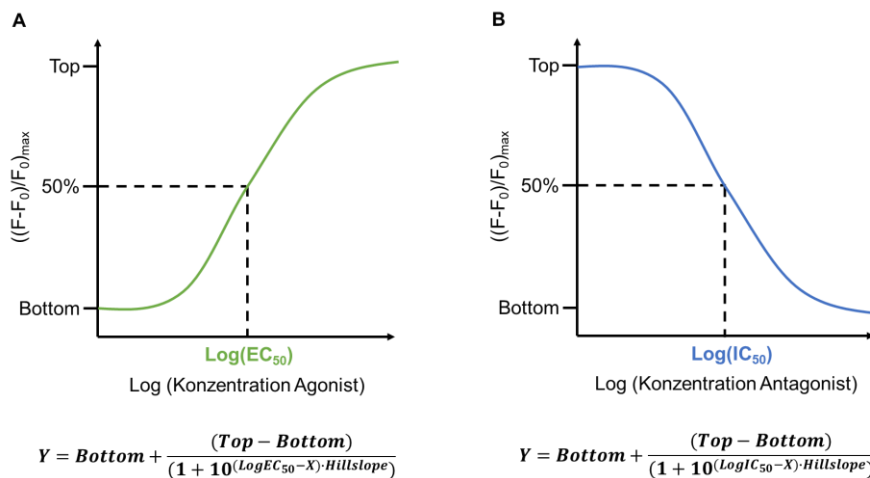


Abbildung 24: Schematische Darstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven und nicht-linearer Regressionsanalyse. Basale Antwort (Bottom), maximale Antwort (Top), Konzentration eines Agonisten (A) bzw. Antagonisten (B), bei der die halbmaximale bzw. inhibitorische Wirkung erreicht ist.

2.5.2 Analyse der mCherry-Fluoreszenzintensität

Zunächst wurden alle Zellen mit Hilfe des Programms Fiji als ROIs in den Hellfeldaufnahmen markiert. Diese ROIs wurden anschließend zur Analyse der mCherry-Aufnahmen genutzt. Dies sollte sicherstellen, dass auch die Zellen analysiert werden, die keine sichtbare mCherry-Fluoreszenz aufweisen. Die gemessenen Intensitätswerte wurden anschließend in Microsoft Excel übertragen. Zudem wurde der Anteil mCherry-positiver Zellen prozentual zur Gesamtzellzahl der analysierten Zellen berechnet.

2.5.3 Mikroskopische Analyse von Sphäroiden

Zur Analyse der Parameter Fläche, Durchmesser, Umfang und Volumen der Sphäroide wurde das Programm Matlab zusammen mit der SpheroidSizer Softwareanwendung genutzt. Die mikroskopischen Hellfeldaufnahmen der Sphäroide wurden hierfür in Matlab geöffnet und anschließend mit Hilfe der SpheroidSizer Anwendung automatisch segmentiert. Falsch segmentierte Sphäroide wurden per Hand korrigiert. Die Software ermittelte anschließend anhand der Segmentierungen die Länge und Breite sowie das Volumen der Sphäroide. Mit Hilfe von Excel wurden anschließend noch der mittlere Durchmesser sowie die Fläche und der Umfang mit Hilfe der nachfolgenden Formeln berechnet:

$$\text{mittlerer Durchmesser } d [\mu\text{m}] = \frac{\text{Länge} + \text{Breite}}{2}$$

$$\text{Fläche } A [\mu\text{m}^2] = \frac{\pi \cdot d^2}{4}$$

$$\text{Umfang } U [\mu\text{m}] = \pi \cdot d$$

2.5.4 Analyse des Matrix-Invasionsassays

Die Analyse des Invasionsassays erfolgte mit den Programmen Fiji und Excel (Abbildung 25). Zunächst wurden die mikroskopischen Aufnahmen in Fiji geladen. Anschließend wurde Fiji auf die Erkennung zellfreier Flächen, des Sphäroidbereichs sowie des invasiven Bereichs trainiert. Dies geschah mit Hilfe des Plug-Ins „Trainable Weka Segmentation“. In einem Beispielbild wurden dafür sowohl zellfreie Flächen, Sphäroidbereiche sowie invasive Bereiche markiert und drei unterschiedlichen Klassen zugeordnet. Basierend auf Algorithmen für maschinelles Lernen und der Mustererkennung, wurde das Programm durch mehrfaches Training an unterschiedlichen Bildern darauf trainiert, die drei Klassen in einem Mikroskopiebild voneinander zu unterscheiden. Die segmentierten Bilder des Sphäroidbereichs sowie des gesamten Zellbereichs (Sphäroid + invasiver Bereich) wurden anschließend mit Hilfe des Plug-Ins „Adjust Threshold“ in ein binäres Bild umgewandelt. Dabei wurde der Hintergrund in Schwarz und der Bereich mit Zellen in Weiß dargestellt. Über das Plug-In „Analyze Particles“ wurde anschließend die Fläche des Zellbereichs berechnet. Die Messdaten wurden in Excel exportiert und die Fläche des invasiven Bereichs mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Fläche invasiver Bereich} = [\text{Fläche gesamter Zellbereich}] - [\text{Fläche Sphäroid}]$$

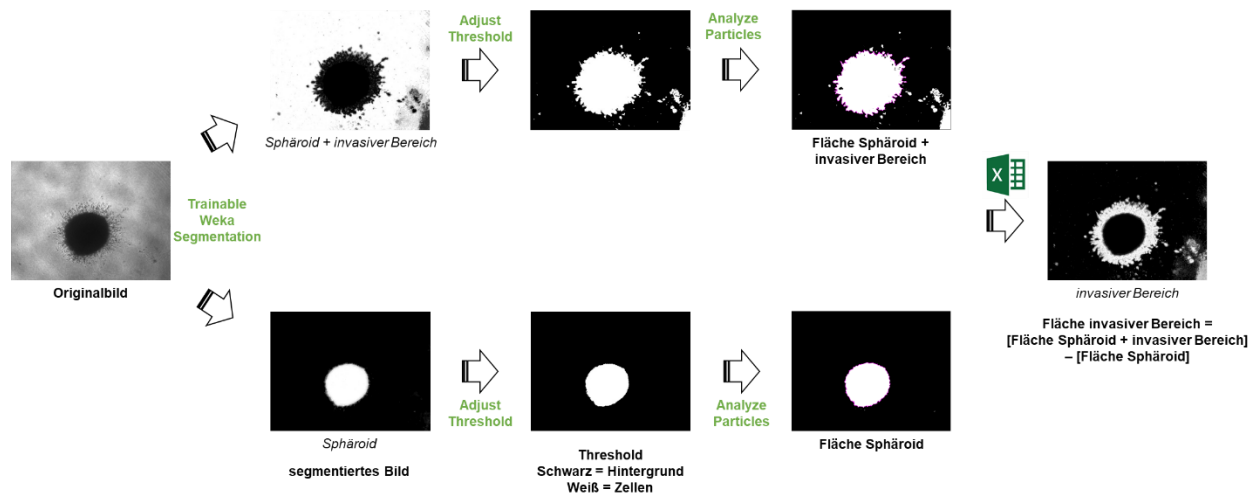


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Auswertung eines Matrix-Invasionsassays. Das Originalbild wird zunächst mit Hilfe des Plug-Ins „Trainable Weka Segmentation“ in zwei Klassen (gesamter Zellbereich und Sphäroid) segmentiert. Anschließend wird das Bild mit Hilfe des Plug-Ins „Adjust Threshold“ in ein binäres Bild umgewandelt. Über das Plug-In „Analyze Particles“ wird anschließend die Fläche des gesamten Zellbereichs sowie des Sphäroids berechnet. Die Daten werden in Excel exportiert um die Fläche des invasiven Bereichs als Differenz der Fläche des gesamten Zellbereichs und des Sphäroids berechnen zu können.

2.5.5 Analyse des Migrationsassay

Die Analyse des Migrationsassays erfolgte mit den Programmen Fiji und Excel (Abbildung 26). Zunächst wurden die mikroskopischen Aufnahmen in Fiji geladen. Anschließend wurde Fiji auf die Erkennung zellfreier Flächen trainiert. Dies geschah mit Hilfe des Plug-Ins „Trainable Weka Segmentation“. In einem Beispielbild wurden dafür sowohl zellfreie Flächen, als auch Flächen, die mit Zellen bewachsen sind markiert und den beiden unterschiedlichen Klassen zugeordnet. Basierend auf Algorithmen für maschinelles Lernen und der Mustererkennung, wurde das Programm durch mehrfaches Training an unterschiedlichen Bildern darauf trainiert, die beiden Klassen in einem Mikroskopiebild voneinander zu unterscheiden. Das Ergebnis ist ein segmentiertes Bild, in dem die zellfreie Fläche in Weiß und Zellen in Schwarz dargestellt werden. Dieses segmentierte Bild wurde dann mit Hilfe des Plug-Ins „Adjust Threshold“ in ein binäres Bild umgewandelt. Über das Plug-In „Analyze Particles“ wurde anschließend die zellfreie Fläche berechnet. Die Messdaten der im Abstand von 10min aufgenommenen Bilder wurden in Excel exportiert und die zellfreie Fläche gegen die Zeit aufgetragen. Im linearen Bereich der Kurve wurde die Steigung berechnet, welche die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen darstellt.

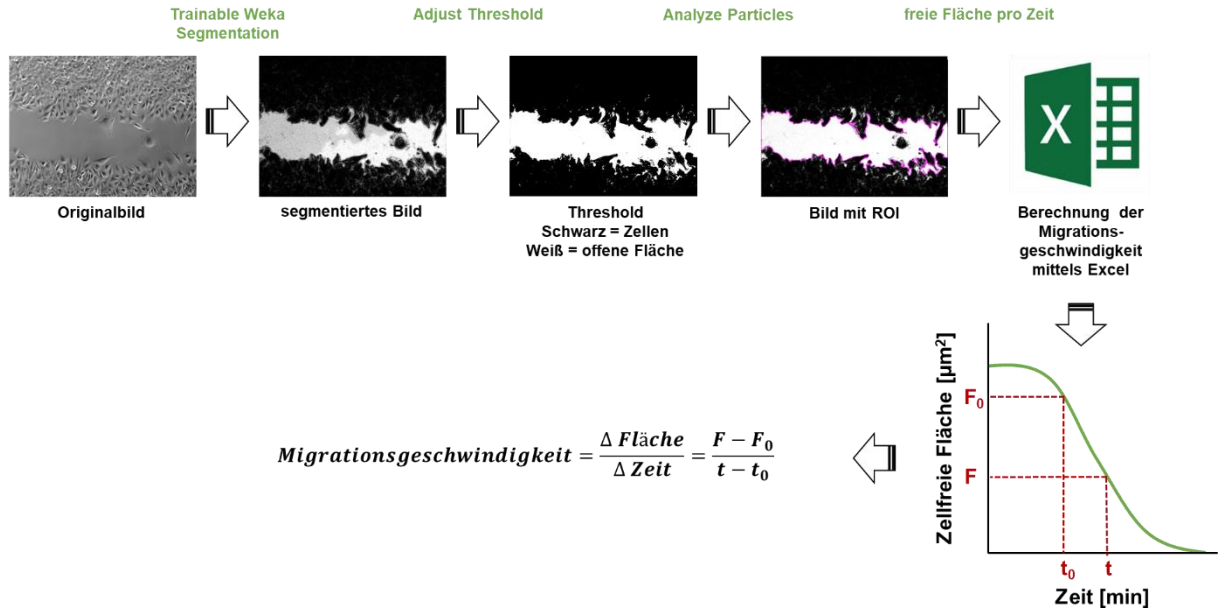


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Auswertung eines Migrationsassays. Das Originalbild wird zunächst mit Hilfe des Plug-Ins „Trainable Weka Segmentation“ segmentiert. Dabei werden zellfreie Flächen in Weiß und Zellen in Schwarz dargestellt. Anschließend wird das Bild mit Hilfe des Plug-Ins „Adjust Threshold“ in ein binäres Bild umgewandelt. Über das Plug-In „Analyze Particles“ wird anschließend die zellfreie Fläche berechnet. Die Daten werden in Excel exportiert und dort gegen die Zeit dargestellt. Aus dem linearen Bereich der Kurve wird dann die Steigung berechnet, welche der Migrationsgeschwindigkeit entspricht.

2.5.6 Vesikelanalyse

Die Vesikelanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme Fiji und Excel. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde in Fiji exportiert und eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 25 Zellen aus je drei Experimenten analysiert. Hierfür wurden zunächst alle Vesikel sowie der Umriss der Zelle und des Zellkerns per Hand markiert und als ROI gespeichert. Die ROIs wurden anschließend genutzt um die folgenden Parameter zu bestimmen:

- Vesikelgröße
- Vesikelanzahl
- Fluoreszenzintensität der Vesikel, der gesamten Zelle und des Zellkerns
- Abstand der Vesikel zum Zellkern

Der Abstand der Vesikel zum Zellkern wurde dabei folgendermaßen bestimmt: Zunächst wurde der Zellkern einer Zelle markiert. Anschließend wurde der Schwerpunkt des Zellkern in Form von X,Y-Koordinaten ermittelt. Über die X,Y-Koordinaten des Zellkerns sowie die X,Y-Koordinaten der jeweiligen Vesikel wurde dann der Abstand der Vesikel zum Zellkern mit Hilfe des Satzes des Pythagoras berechnet. Die Daten wurden anschließend in Excel und GraphPad-Prism exportiert

und graphisch dargestellt. Die Größenverteilung der Vesikel wurde in Form eines Histogramms dargestellt.

2.5.7 Kolokalisationsanalyse

Um die Kolokalisation von Alexa-Fluor® 488-markierten Rab-Proteinen mit den mCherry markierten TRPV6_short/long-Vesikeln nachzuweisen, wurden Bilder mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Programms Fiji analysiert. Dafür wurde zunächst jeder Bilderstapel („Stack“) auf der geeignetsten Z-Ebene geöffnet und der Hintergrund mit Hilfe des Plug-Ins „Background Subtraction from ROI“ entfernt. Anschließend wurden jeweils 25 Zellen ausgewählt und als ROI („Region of Interest“) markiert. Die markierten Zellen wurden als separate Bilder gespeichert und in den roten, grünen und blauen Kanal aufgeteilt. Anschließend wurde der ROI auf den roten Kanal angewendet und eine Kolokalisationsanalyse mit Hilfe des Plug-Ins „Coloc2“ durchgeführt. Dabei entsprach der rote Kanal dem Channel1 und der grüne Kanal dem Channel2. Die berechneten Pearson-Korrelationskoeffizienzwerte wurden anschließend in Excel und GraphPad-Prism exportiert und graphisch dargestellt. Die Korrelation beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient r gibt in diesem Fall an, in welchem Verhältnis zwei Intensitäten im selben Pixel stehen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wird dabei mit folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

In der Formel stehen x_i und \bar{x} jeweils für die i -te Pixelintensität und die mittlere Pixelintensität in Kanal 1 und y_i und \bar{y} entsprechend für Werte in Kanal 2. Der Pearson-Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Liegt der Wert bei Null, so lässt sich keine Korrelation zwischen den beiden untersuchten Variablen erkennen. Bei Werten größer Null besteht eine positive Korrelation zwischen den beiden Variablen.

2.6 Statistische Datenanalyse

Zur Datenanalyse und Visualisierung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene statistische Methoden angewandt. Basierend auf den jeweiligen biologischen Triplikaten wurde jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Daten sind dementsprechend als

Mittelwerte (MW) \pm 1xStandardabweichung (Stabw) angegeben. Die Daten wurden anschließend mit einem ungepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dies geschah mit Hilfe des Ony-way ANOVA post-hoc Turkey HSD Test Calculator. Die Grenzwerte für eine Verwerfung der Nullhypothese entsprachen den üblichen Konventionen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von Zelllinien mit induzierbarer Expression des humanen TRPV6- Ionenkanals

Die Entwicklung von Zellmodellen, die eine regulierbare Überexpression sowie funktionelle Analysen des humanen TRPV6-Ionenkanals im zellulären Säugetier-Hintergrund erlauben, beinhaltet eine Reihe von sukzessiven Schritten, von der Klonierung der Transgene in geeignete Expressionsplasmide, der Transfektion und Selektion von Zellen mit effizienter Transgen-Expression bis zu deren Etablierung als stabile Zelllinien.

Die *TRPV6*-Gensequenz enthält ein kanonisches AUG-Startcodon als auch ein alternatives, nicht-kanonisches ACG-Startcodon, wodurch zwei unterschiedliche Proteinisoformen mit einer Länge von 725 bzw. 765 Aminosäuren bei der Translation gebildet werden können. Für die heterologe Überexpression der humanen TRPV6-Proteine in den CHO-K1-Zellmodellen wurden zur Klonierung der Expressionsplasmide jeweils nur die Sequenzbereiche der unterschiedlich langen, offenen Leseraster (ORF) der beiden TRPV6-Isoformen eingesetzt. Die rekombinanten Zelllinien, die den ORF beginnend mit dem kanonischen AUG exprimieren, bilden hTRPV6-Transkripte mit einer Länge von 2175 Nukleotiden, die im Folgenden als „hTRPV6_short“ bzw. „kurze“ hTRPV6-Isoform bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu werden die Transkripte, die entsprechend der Klonierung an dem alternativen ACG-Startcodon starten und eine Länge von 2295 Nukleotiden aufweisen, im Verlauf dieser Arbeit als „hTRPV6_long“ bzw. „lange“ hTRPV6-Isoform bezeichnet. Bei den oben angezeigten Transkriptlängen sind die Sequenzen des *mCherry*-Gens und des dazwischenliegenden Spacers nicht berücksichtigt. Der Begriff „Isoform“ wird nachfolgend sowohl im Kontext von heterologer Transkription als auch Translation von hTRPV6 in den Zelllinien genutzt.

Zur Regulierung der rekombinanten Expression der beiden Isoformen des hTRPV6-Ionenkanals in Säugerzellen wurde das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem TetOne eingesetzt (Clontech). Im ersten Schritt wurde der Open Reading Frame (ORF) der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform mit einem „in-frame“ C-terminalen mCherry-Tag in die Klonierungsstelle des Expressionsvektors inseriert. Anschließend wurden CHO-K1-Zellen mit einem der beiden Expressionsplasmide (pTetOne-TRPV6-mCherry_short bzw. pTetOne-TRPV6-mCherry_long) stabil transfiziert. Das C-terminale Fusionsprotein dient sowohl dem späteren Nachweis der hTRPV6-Expression als auch der Bestimmung der subzellulären Lokalisation. Der Emissionsbereich von mCherry (610_{nm}) liegt spektral weit von dem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzindikator Fluo-8 (515_{nm}) entfernt, welcher für die Funktionsanalysen der hTRPV6-

Ionenkanäle im Verlauf der Arbeit eingesetzt wurde. Hierdurch ist eine parallele Analyse der hTRPV6-Expression, -Lokalisation als auch des hTRPV6-vermittelten Einstroms von Calcium-Ionen in den beiden entwickelten CHO-Zellmodellen möglich.

Die zunächst durchgeführte, transiente Transfektion der hTRPV6-Expressionsplasmide diente der Überprüfung der Induzierbarkeit der Genexpression und der Lokalisation der Fusionsproteine als auch der Vitalität der rekombinanten Zelllinien. Nach Induktion der heterologen Expression durch die Zugabe von 100ng/ml Doxyzyklin (Dox) zeigten transfizierte Zellen eine deutlich sicht- und messbare mCherry-Fluoreszenz (587_{Ex}/610_{Em}). Dabei wiesen CHO-K1-Zellen, die das TetOne-TRPV6-mCherry_short Plasmid (kurze Isoform) exprimierten, eine höhere mCherry-Fluoreszenzintensität auf, als Zellen, die das TetOne-TRPV6-mCherry_long Plasmid (lange Isoform) exprimierten (Abbildung 27). Die beiden hTRPV6-mCherry Fusionsproteine zeigten eine diffuse zytosolische Verteilung als auch eine Lokalisation in intrazellulären, vesikulären Strukturen, was mit dem subzellulären Verteilungsmuster rekombinanter TRPV6-Proteine in anderen Säugetier-Zelllinien übereinstimmt (Fecher-Trost *et al.*, 2013).

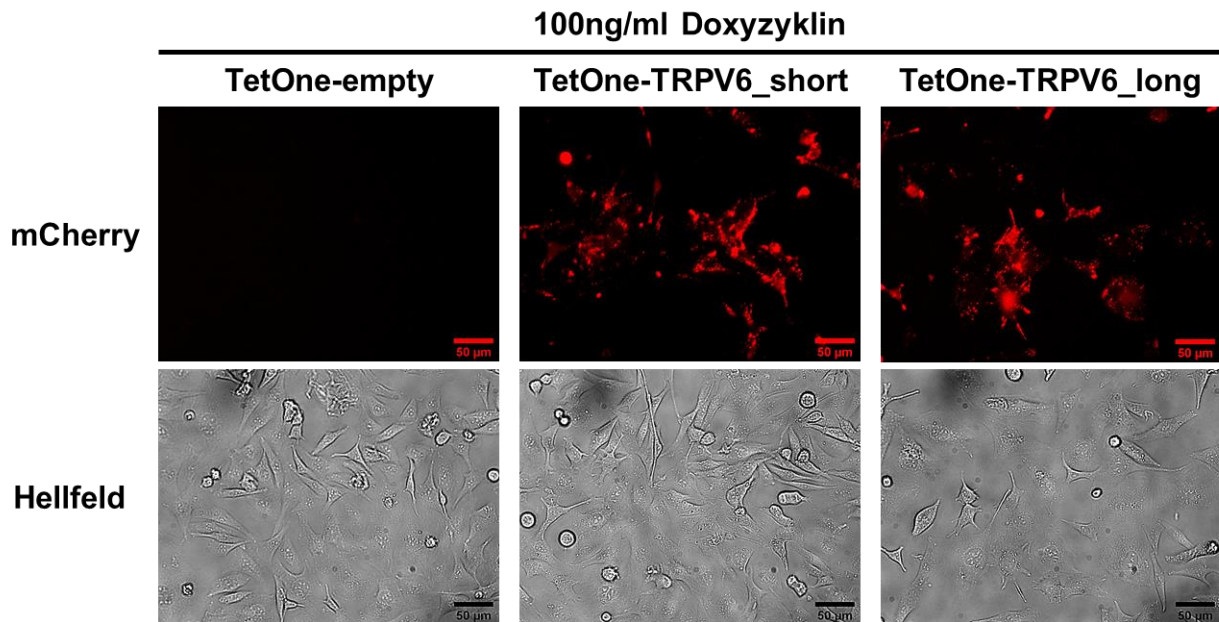


Abbildung 27: Transiente Expression der hTRPV6-mCherry Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem TetOne-empty Vektor (ohne *hTRPV6*-Gen) transfiziert (links). Die Transfektion des Expressionsvektors ohne Insert führte zu keiner sichtbaren Veränderung der Zellmorphologie. Parallel dazu wurden die Zellen mit dem TetOne-TRPV6-mCherry_short (Mitte) bzw. TetOne-TRPV6-mCherry_long (rechts) Plasmid transfiziert und mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert. In beiden Fällen zeigten die transfizierten Zellen eine deutlich sichtbare mCherry-Fluoreszenz, die im Falle der hTRPV6_short Variante jedoch etwas stärker war. Die Zellen mit Doxyzyklin-induzierter heterologer hTRPV6 Expression wiesen keine veränderte Morphologie im Vergleich zu Zellen auf, die mit dem Expressionsplasmid ohne hTRPV6-Insert transfiziert wurden.

3.2 Identifizierung von Zellklonen mit regulierter hTRPV6 Expression

Für die Selektion von stabilen Zellklonen, die eine sehr gute Regulierbarkeit sowie keine detektierbare Basalexpression des Transgens aufwiesen, wurden CHO-K1-Zellen mit dem TetOne-TRPV6-mCherry_short bzw. dem TetOne-TRPV6-mCherry_long Expressionsplasmid transfiziert und anschließend mit Hygromycin selektioniert. Nach Induktion mit 100ng/ml Doxyzyklin wurde die mCherry-Fluoreszenzintensität der isolierten Zellklone mikroskopisch analysiert. Von insgesamt 25 getesteten CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short Zellklonen zeigten sieben Klone eine mCherry-Fluoreszenz und von 37 getesteten CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Zellklonen wiesen acht Klone eine mCherry-Fluoreszenz auf. Zur weiteren Charakterisierung der selektionierten Einzelklone wurde eine mögliche Basalexpression ohne Doxyzyklin-Induktion („Leakiness“) sowie die Tet/Dox-Induzierbarkeit und Homogenität der hTRPV6-mCherry Expression überprüft (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Ohne Induktion durch Doxyzyklin zeigten sowohl die CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short als auch die CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Zellklone bis auf wenige Ausnahmen (Einzelklone 1.1 und 1.3) keine mikroskopisch detektierbare Basalexpression von hTRPV6-mCherry (Abbildung 28 und Abbildung 29 links). Klone mit detektierter Basalexpression wurden verworfen. Bei der Überprüfung der Doxyzyklin-abhängigen Regulierbarkeit der hTRPV6-mCherry-Expression wurden unterschiedliche Expressionshöhen des hTRPV6-mCherry Fusionsproteins in den einzelnen Zellklonen gemessen (Abbildung 28 und Abbildung 29 rechts). Zusammenfassend wiesen Zellklone mit Expression der kurzen hTRPV6-mCherry Isoform eine höhere mCherry-Fluoreszenzintensität als Zellklone mit Expression der langen hTRPV6-mCherry auf. Allerdings wurden in einigen selektionierten Zellklonen bzw. Einzelzellen mit Expression der kurzen oder der langen hTRPV6-Isoform unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten detektiert und daher von weiteren Analysen ausgeschlossen (beispielsweise Zellklone 1.7_long, 1.5_short und 1.7_short). Weiterhin wurden Zellklone, die eine veränderte Morphologie nach 24-stündiger Induktion der Transgen-Expression mit Doxyzyklin aufwiesen (z.B. Klon 4.5_long), verworfen. Zusammenfassend konnten drei geeignete Zelllinien mit rekombinanter Expression der kurzen hTRPV6-Isoform (Zelllinien CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short 1.3, 1.4 und 2.6) und drei Zelllinien mit heterologer Expression der langen hTRPV6-Isoform (Zelllinien CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long 1.8, 1.9 und 1.11) erfolgreich isoliert werden.

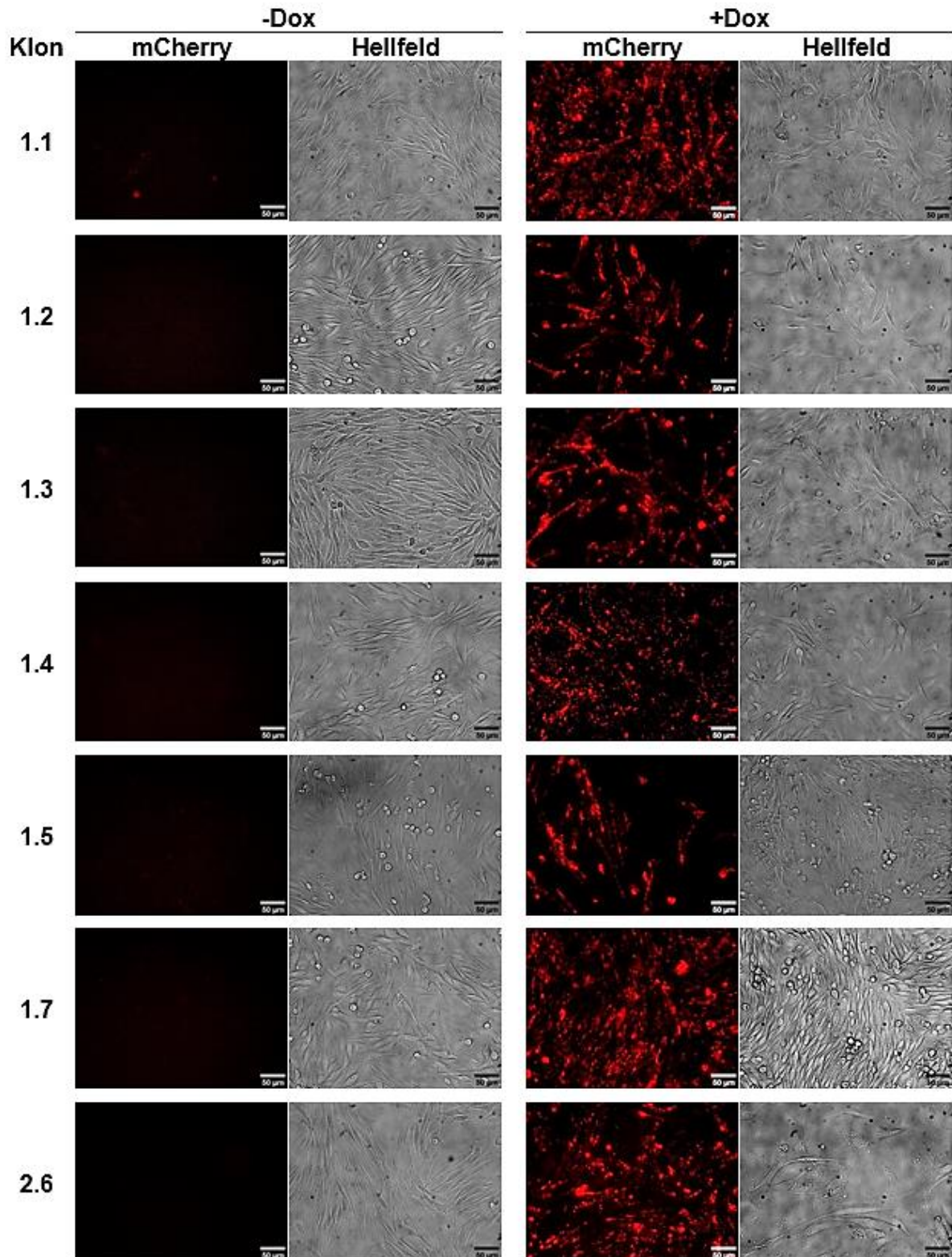


Abbildung 28: mCherry Fluoreszenzintensitäten der CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short Klone vor und nach 24-stündiger Behandlung mit Doxyzyklin. 1×10^5 Zellen pro Klon wurden in 6-Well-Platten ohne Induktion der hTRPV6-mCherry-Expression ausgesät. Nach 24h wurde keine basale mCherry-Fluoreszenzintensität, d.h keine „Leakiness“ des Expressionssystems, festgestellt (links). Die Zellen wurden anschließend mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt und nach 24h Induktion die mCherry-Fluoreszenzintensität mikroskopisch analysiert (rechts). Aufgrund der homogenen Expression und der Expressionshöhe der kurzen TRPV6-Isoform wurden die Zellklone 1.3, 1.4 und 2.6 isoliert und als Zelllinien entwickelt.

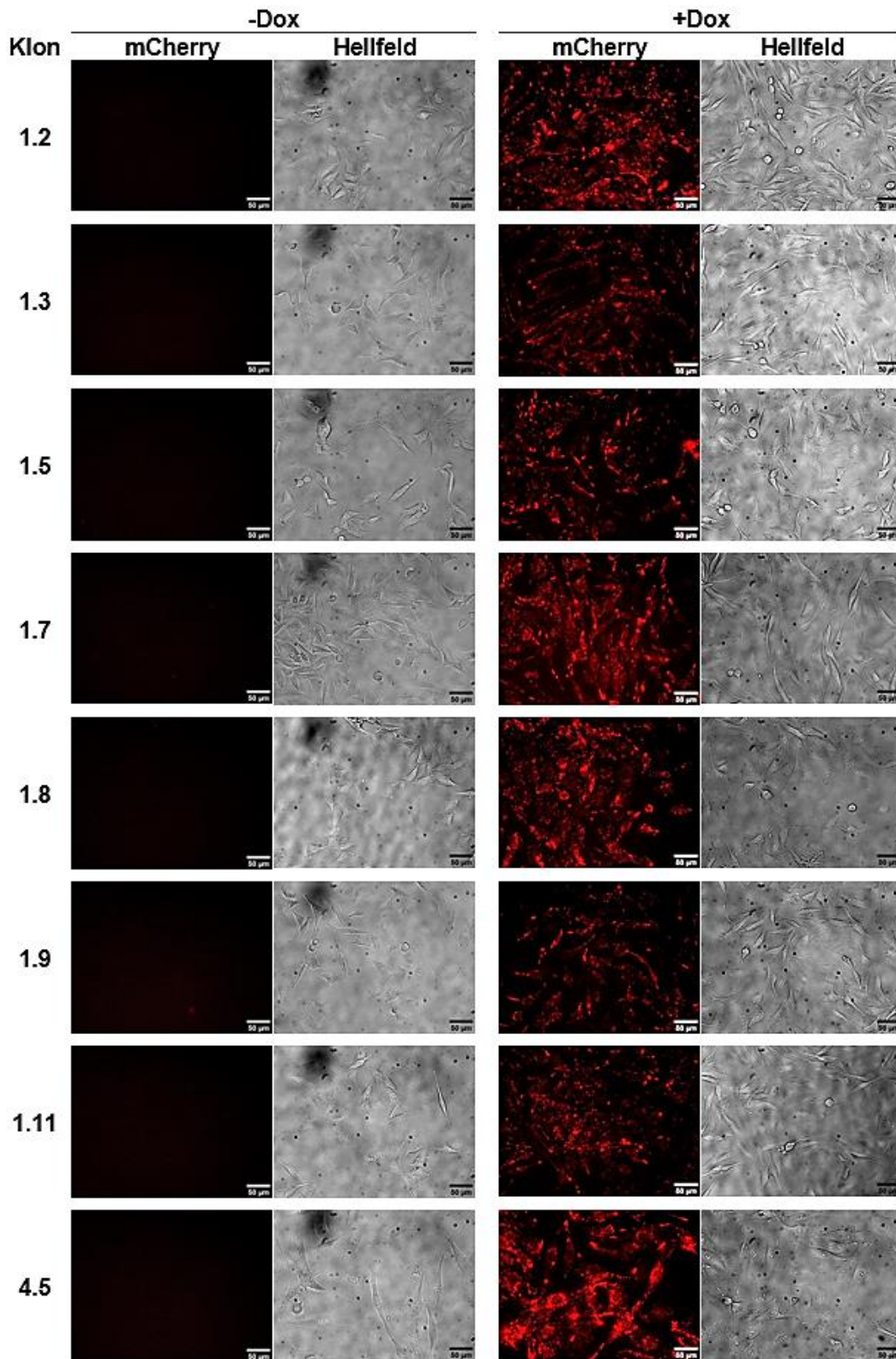


Abbildung 29: mCherry Fluoreszenzintensitäten der CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Klone vor und nach 24-stündiger Behandlung mit Doxyzyklin. 1×10^5 Zellen pro Klon wurden in 6-Well-Platten ohne Doxyzyklin-Induktion ausgesät. Nach 24h wurde keine basale mCherry-Fluoreszenzintensität, d.h keine „Leakiness“ des Expressionssystems, festgestellt (links). Die Zellen wurden anschließend mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt und nach 24h Induktion die mCherry-Fluoreszenzintensität mikroskopisch analysiert (rechts). Die Zellklone 1.8, 1.9 und 1.11 wurden isoliert und als Zelllinien entwickelt.

Da die Analyse der Regulierbarkeit der hTRPV6-mCherry Expression in den Zellklonen keine Aussage über die Assemblierung der hTRPV6-mCherry Proteine in funktionelle Ionenkanäle zulässt, wurde die Aktivität der heterologen Ionenkanäle mittels Calcium-Imaging in Einzelzellen der selektionierten Zellklone mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform oder der langen hTRPV6-Isoform überprüft. Dazu wurden die Zellen zunächst in Ca^{2+} -freiem Puffer mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-8 beladen. Während der Ca^{2+} -Messung wurden die Zellen während der ersten 80s mit Ca^{2+} -freiem Puffer, danach für 320s mit einer 100nM Thapsigargin-Lösung überspült. Die Inkubation der Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer sowie die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher mittels Thapsigargin dienten dazu, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) auf ein Minimum herabzusetzen (Chow *et al.*, 2007). Anschließend wurde der hTRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in den folgenden 300s durch die Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) von 0mM auf 2mM ausgelöst. Zeitgleich wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität gemessen, über die die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluorometrisch quantifiziert werden kann (Abbildung 30). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die heterolog exprimierten hTRPV6-Ionenkanäle funktionell sind und der hTRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom gemessen werden kann. Zellklone, die eine maximale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten und damit eine hohe Auflösung bei der Messung von Änderungen des Ca^{2+} -Einstroms erlaubten, wurden als geeignete Zellmodelle für vergleichende Funktionsanalysen zwischen der kurzen und der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals identifiziert. Alle zuvor isolierten Zelllinien, die mit Doxzyklin induziert wurden, reagierten nach Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 0mM auf 2mM mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität. Der CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short Zellklon 2.6 sowie der CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Zellklon 1.8 zeigten im Vergleich zu den anderen analysierten Zellklonen die höchste Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese beiden stabilen Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit als Zellmodell für die funktionellen Analysen der heterolog exprimierten hTRPV6-Ionenkanäle sowie für vergleichende Untersuchungen der kurzen und langen humanen TRPV6-Isoformen eingesetzt. Die Bezeichnung der Zelllinien bzw. der Expression des TRPV6-mCherry Fusionsproteins werden im nachfolgenden Text vereinfacht: die Zelllinie CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 wird als „Zelllinie mit Expression der langen hTRPV6-Isoform“ benannt, während die Zelllinie CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 als „Zelllinie mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform“ gekennzeichnet ist.

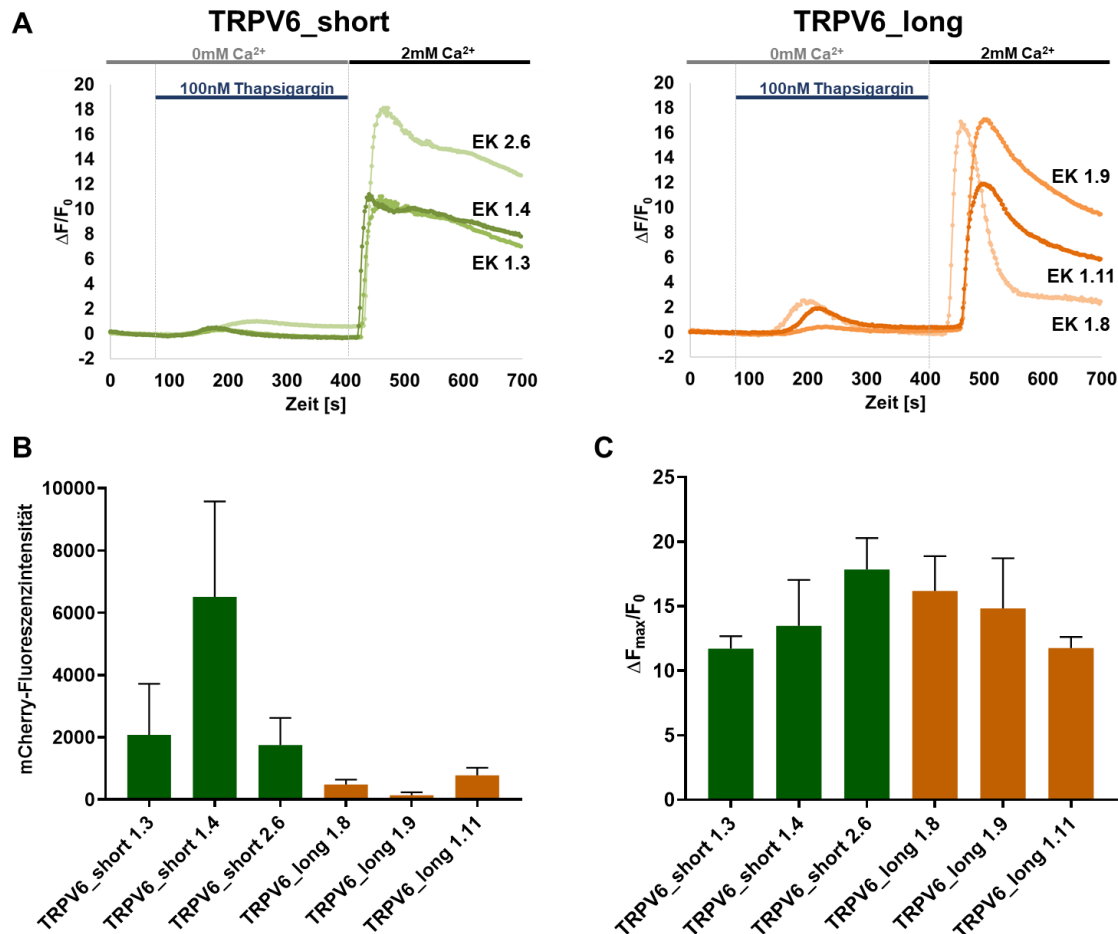


Abbildung 30: Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität nach Erhöhung der [Ca²⁺]_e von 0mM auf 2mM. TRPV6-mCherry-Zellen wurden in jeden Kanal eines Ibidi μ -Slide ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit 2 μ M Fluo-8@-AM in Ca²⁺-freien Puffer beladen. Anschließend wurde das Ibidi μ -Slide an ein Pumpsystem angeschlossen und unter dem Mikroskop platziert. Die Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Hierfür wurden 350 Bilder im Abstand von 2s aufgenommen. Innerhalb der ersten 80s wurden die Zellen mit Ca²⁺-freien Puffer überspült. Im Zeitraum 80-400s wurden die intrazellulären Ca²⁺-Speicher durch die Behandlung mit 100nM Thapsigargin geleert. Ab 400s erfolgte die Erhöhung der [Ca²⁺]_e von 0mM auf 2mM. A) Kurvenverläufe der Fluo-8-Fluoreszenzintensität von CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short Klonen 2.6, 1.3, 1.4 und CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Klonen 1.8, 1.9, 1.11. B) mCherry-Fluoreszenzintensität der Klone nach 24h Induktion mit 100ng/ml Doxyzyklin. C) Maximale Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität nach Erhöhung der [Ca²⁺]_e von 0mM auf 2mM. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3 Experimenten.

3.3 Charakterisierung der generierten CHO-TetOne-hTRPV6 Zelllinien

Die stabilen Zelllinien mit Expression der kurzen oder der langen hTRPV6-Isoform wurden als Modelle genutzt, um über vergleichende Analysen mögliche Funktionen der zusätzlichen 40 N-terminalen Aminosäuren der langen TRPV6-Isoform zu charakterisieren. Dazu wurden beide Zelllinien hinsichtlich folgender Parameter charakterisiert: i) Analyse der Expression der beiden hTRPV6-mCherry Fusionsproteine, ii) Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der hTRPV6-mCherry Fusionsproteine, iii) Abhängigkeit der Genexpression von Induktionszeit und Doxyzyklin-

Konzentration, iv) Reaktion der Zellen mit Expression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoform auf bekannte TRPV6-Antagonisten, v) Wirkung der Doxyzyklin-induzierten Expression auf die Viabilität der Zelllinien mit Expression der kurzen oder der langen hTRPV6-Isoform.

3.3.1 Nachweis der hTRPV6-mCherry Expression mittels Westernblot

Der Nachweis der beiden hTRPV6-mCherry Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen hTRPV6 (Abbildung 31). In Lysaten der Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform konnten insgesamt drei hTRPV6-spezifische Proteinbanden (90kDa (*1), 115kDa (*2) und 127kDa (*3)) ab einer Induktion mit 10ng/ml Doxyzyklin detektiert werden. In Lysaten aus Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform waren diese drei Banden erst ab einer Induktion mit 50ng/ml Doxyzyklin zu erkennen. In Zellen, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, wurden in beiden Fällen keine hTRPV6-Proteinbanden detektiert.

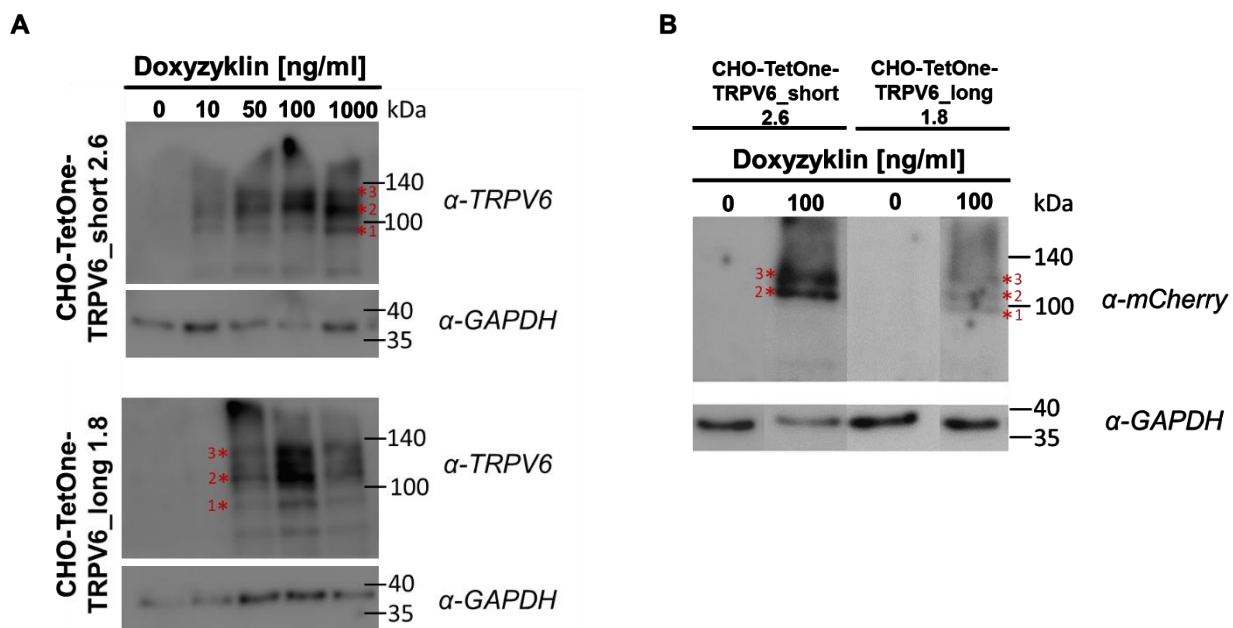


Abbildung 31: Western Blot-Analyse von Zelllysaten aus Zellen mit Expression der kurzen oder der langen hTRPV6-Isoform. Die Zellen wurden mit 0, 10, 50, 100 bzw. 1000ng/ml Doxyzyklin (A) bzw. 0 und 100ng/ml Doxyzyklin (B) behandelt und anschließend 24h kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zelllysate gewonnen. Je 50µg Protein wurden pro Tasche einer SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Als Primärantikörper wurden α-TRPV6 und α-GAPDH (A) bzw. α-mCherry und α-GAPDH (B) verwendet.

Das Molekulargewicht der beiden hTRPV6-mCherry Fusionsproteine wurde mittels der Software „Serial Cloner“ anhand der Proteinsequenzen berechnet. Es ergibt sich aus der Summe des Molekulargewichts der kurzen bzw. langen TRPV6-Isoform (83,1kDa für TRPV6_short bzw. 87,2kDa für TRPV6_long) sowie dem Molekulargewicht des Glycin-Serin Linkers und des daran

gekoppelten mCherry-Proteins (28,8kDa). Die resultierenden Molekulargewichte betragen 111,9kDa für das Fusionsprotein der kurzen hTRPV6-Isoform und 116kDa für das Fusionsprotein der langen hTRPV6-Isoform. Dies entspricht auf dem Western Blot der mittleren Bande von 115kDa. Die darüber liegende Proteinbande von 127kDa stellt vermutlich die glykosylierte Form des hTRPV6-mCherry-Fusionsproteins in den Zellen mit Expression der kurzen oder langen hTRPV6-Isoform dar. Die unterste Bande von 90kDa könnte ein Abbauprodukt des hTRPV6-mCherry-Fusionsproteins anzeigen. Ähnliche Abbauprodukte von mCherry-Fusionsproteinen wurde von Huang und Kollegen beschrieben, die im Kontext von Analysen des lysosomalen Proteins NPC2 mögliche Artefakte fluoreszenter Fusionsproteine, u.a. durch Abbau oder Spaltung des Fluoreszenzproteins, untersuchten. In MEF-, U2OS- und CHO-Zellen mit stabiler Expression eines NPC2-mCherry Fusionsproteins wurden in Western Blot-Analysen ebenfalls mehrere Proteinbanden detektiert, die dem Fusionsprotein, dem mCherry-Tag, dem NPC2-Protein ohne Tag sowie einem Abbauprodukt aus NPC2-Linker und dem N-terminalen Bereich des mCherry-Proteins zugeordnet werden konnte. Die N-terminale Region des mCherry-Proteins sowie der Glycin-Serin Linker zwischen dem NPC2-Protein und dem mCherry-Tag waren dabei anfällig für Proteolyse durch lysosomale Endoproteasen (Huang *et al.*, 2014). Da für die Klonierung des hTRPV6-mCherry Fusionproteins im Rahmen dieser Arbeit auch ein Glycin-Serin Linker eingesetzt wurde, sind die in der Western Blot-Analyse detektierten Abbauprodukte des TRPV6-mCherry-Fusionsproteins vermutlich auf eine proteolytische Spaltung des mCherry-Tags bzw. verkürztem hTRPV6-Fusionsprotein mit unvollständigem mCherry-Tag zurückzuführen.

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation der kurzen und langen hTRPV6-mCherry-Isoformen

Zur Bestimmung der Lokalisation der beiden hTRPV6-Isoformen wurden CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach 24h Doxyzyklin-Induktion wurde die Lokalisation der rekombinanten hTRPV6-mCherry Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abbildung 32).

Neben einer diffusen Verteilung im Cytoplasma war der größte Anteil der exprimierten hTRPV6-Proteine in intrazellulären Strukturen, vermutlich Endomembranen (2), möglicherweise in der Kernhülle (3) sowie in vesikulären Strukturen (4) lokalisiert. Eine mCherry-Fluoreszenz wurde nur zu einem sehr geringen Anteil in der Plasmamembran (1) detektiert. Es wurden Unterschiede in der subzellulären Verteilung der kurzen und langen hTRPV6-Isoformen beobachtet. Die lange

Proteinisoform zeigte eine diffusere Verteilung im Cytoplasma, während sich die kurze Isoform verstärkt um den Zellkern und in vesikulären Strukturen befand.

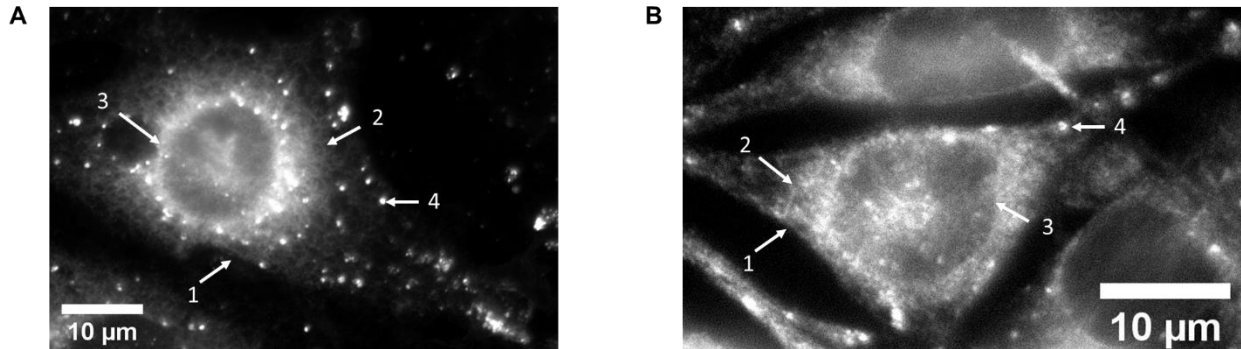


Abbildung 32: Lokalisation der humanen hTRPV6-mCherry_short (A) bzw. hTRPV6-mCherry_long (B) Fusionsproteine. CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short bzw. CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long Zellen wurden mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach 24h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. 1) Plasmamembran, 2) intrazelluläre Strukturen, 3) Kernhülle, 4) vesikuläre Strukturen.

3.3.3 Heterologe hTRPV6-Expression: konzentrations- und zeit- abhängige Induktion mit Doxyzyklin

Um vergleichende Funktionsanalysen zwischen den Zellmodellen mit heterologer Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform durchführen zu können, wurde die heterologe hTRPV6-Expression in beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der Konzentration des Induktors Doxyzyklin (Abbildung 34 und Abbildung 33) sowie von der Behandlungsdauer mit Doxyzyklin analysiert (Abbildung 35).

Ergebnisse

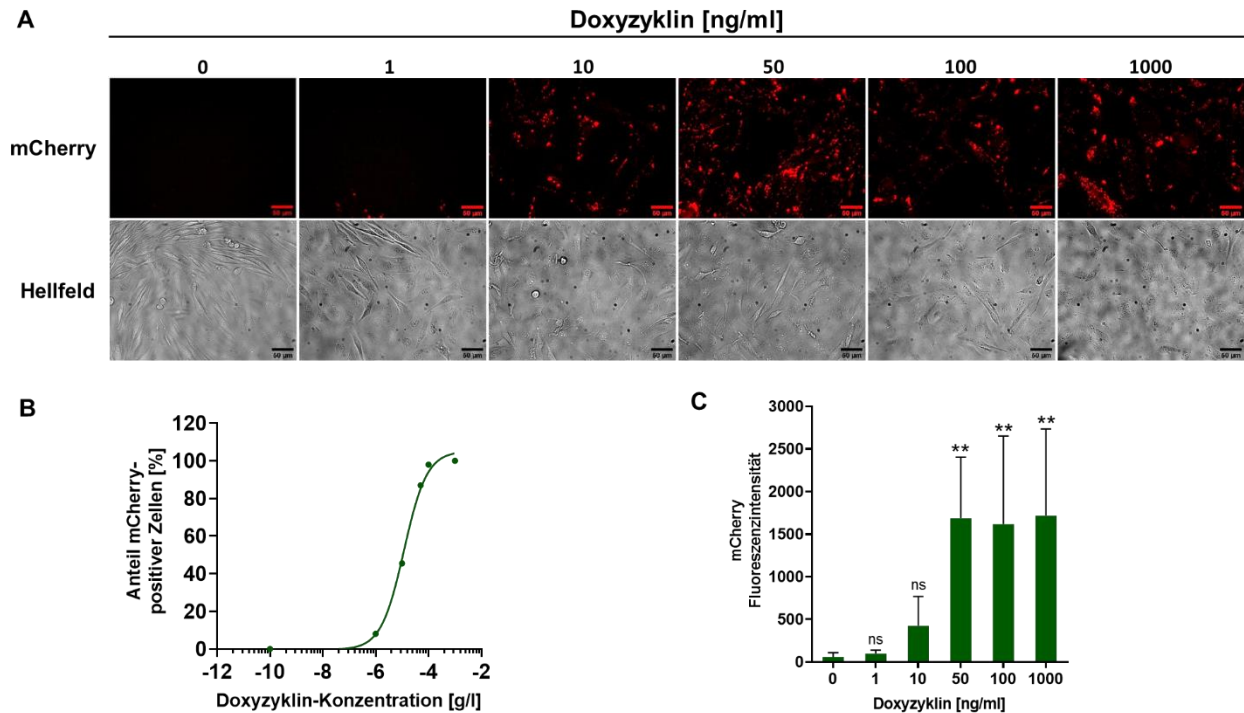


Abbildung 34: Konzentrationsabhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten Expression der kurzen hTRPV6-mCherry Isoform. CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short 2.6 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde den Zellen Medium mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen zugegeben (1, 10, 50, 100 bzw. 1000ng/ml). Nach 24h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Hellfeld und mCherry-Fluoreszenz. B) Anteil mCherry-positiver Zellen. C) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Einzelzellen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=3 Experimenten. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0ng/ml Doxyzyklin) berechnet. ns = nicht signifikant, **P<0,01.

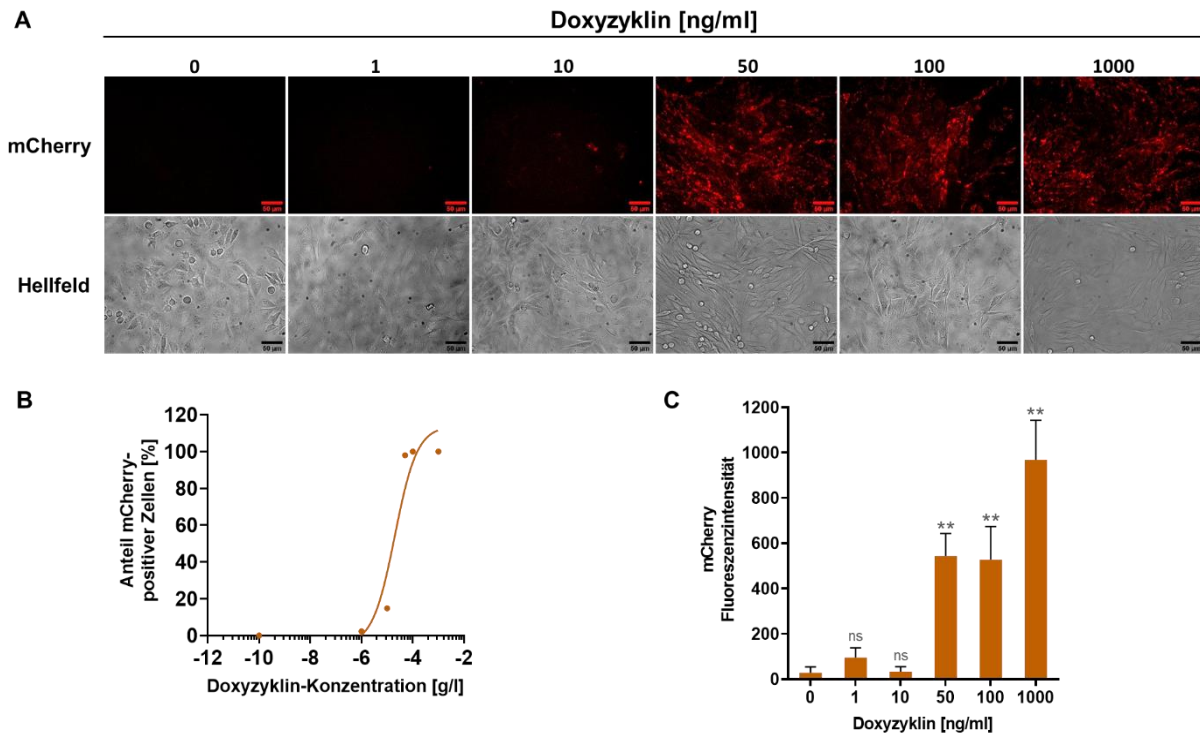


Abbildung 33: Konzentrationsabhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten Expression der langen hTRPV6-mCherry Isoform. CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long 1.8 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde den Zellen Medium mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen zugegeben (1, 10, 50, 100 bzw. 1000ng/ml). Nach 24h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Hellfeld und mCherry-Fluoreszenz. B) Anteil mCherry-positiver Zellen. C) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Einzelzellen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=3 Experimenten. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0ng/ml Doxyzyklin) berechnet. ns = nicht signifikant, **P<0,01

Die Expression der hTRPV6-mCherry Fusionsproteine zeigte in beiden Zellmodellen eine Abhängigkeit von der Doxyzyklin-Konzentration. Ohne Behandlung mit Doxyzyklin wurde keine mCherry-Fluoreszenz in den Zellmodellen detektiert. Ab einer Konzentration von 10ng/ml Doxyzyklin zeigten circa 46% und ab 100ng/ml Doxyzyklin 100% der Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform eine mCherry-Fluoreszenz. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform konnte ab einer Konzentration von 10ng/ml in circa 15% und ab 50ng/ml in 100% der Zellen eine mCherry-Fluoreszenz gemessen werden. Weiterhin wiesen Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform eine dreifach höhere mCherry-Fluoreszenz auf als Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform. In einzelnen Zellen jedes Zellmodells wurden unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensitäten gemessen, was auf unterschiedlich hohe Expressionsraten schließen lässt. Die Expressionsraten können aufgrund unterschiedlicher Zellzyklusstadien variieren oder auf klonale Unterschiede hinweisen. Bei beiden Zelllinien wurde eine maximale Induktion (mCherry-Fluoreszenzintensität und Anteil mCherry-positiver Zellen) bei einer Behandlung mit 100ng/ml Doxyzyklin erreicht und nachfolgend als optimale Konzentration für die Induktion der heterologen Expression der hTRPV6-mCherry Fusionsproteine der kurzen und langen Isoformen eingesetzt.

Zur weiteren Charakterisierung der beiden Zellmodelle wurde die Zeitabhängigkeit der mit Doxyzyklin induzierten (100ng/ml) Expression in den CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 35). Die Expressionshöhe sowohl der kurzen als auch der langen hTRPV6-Isoformen zeigte in den jeweiligen Zelllinien eine signifikante Abhängigkeit von der Induktionsdauer. In Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform konnte im Vergleich zwischen einer Induktionsdauer von 24h und 48h ein 1,4-facher Anstieg der Expression bei 48h und nach 72h eine zweifach höhere mCherry-Fluoreszenzintensität im Vergleich zum 24h-Wert gemessen werden. Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform zeigten im Vergleich einer 24-stündigen zu einer 48-stündigen Doxyzyklin-Behandlung einen zweifachen Anstieg der mCherry-Fluoreszenzintensität und nach 72h Doxyzyklin-Behandlung einen Anstieg um 4,8. Die Ergebnisse der Experimente zur konzentrations- und zeitabhängigen Induktion bestätigten eine gute Regulierbarkeit der Expression der heterologen hTRPV6-mCherry Ionenkanäle in beiden Zellmodellen. Die im Vergleich durchschnittlich 3,1-fach geringere mCherry-Fluoreszenz in dem Zellmodell mit Expression der langen hTRPV6-Isoform könnte durch das nicht-kanonische ACG-Codon bedingt sein. Alternative Start-Codons weisen im Vergleich zum kanonischen AUG-Startcodon häufig eine geringere Translationseffizienz auf (Chen *et al.*, 2009).

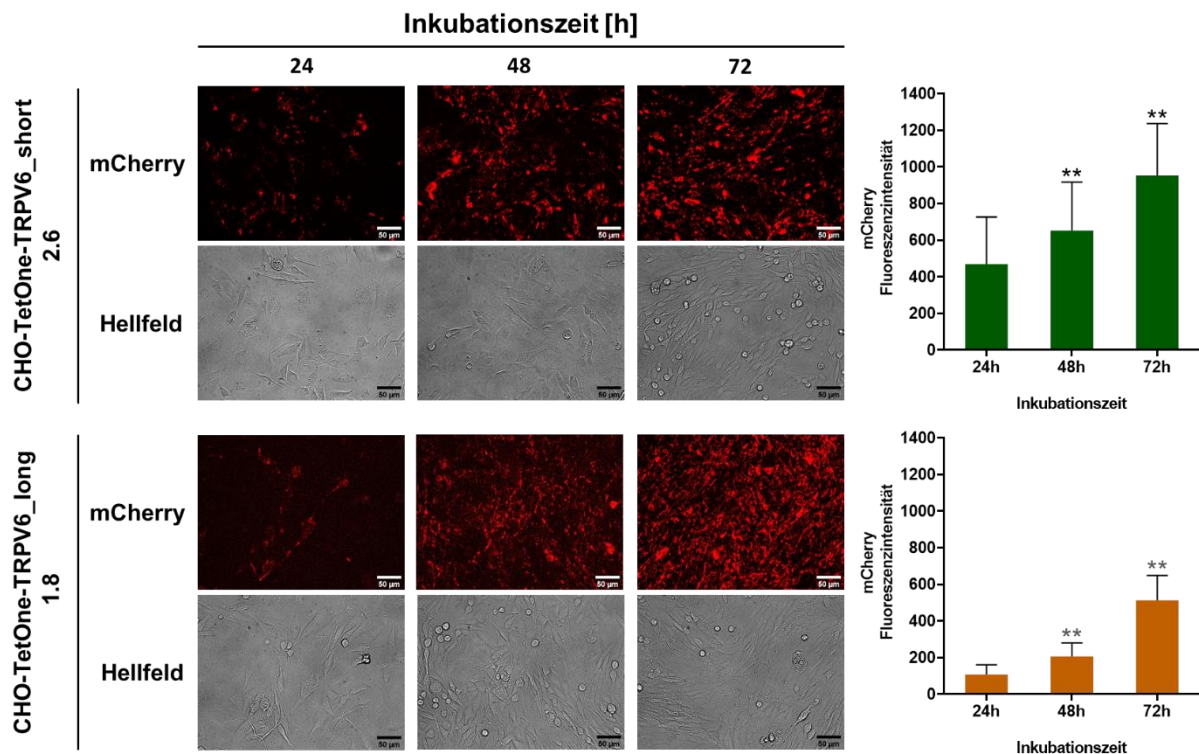


Abbildung 35: Zeitabhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten Expression der kurzen hTRPV6-mCherry und der langen hTRPV6-mCherry Isoform. CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen wurden in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde den Zellen Medium mit einer Doxyzyklin-Konzentration von 100ng/ml zugegeben. Nach 24h, 48h und 72h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Hellfeldaufnahmen und mCherry-Fluoreszenz. B) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Einzelzellen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=3 Experimenten. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (24h Inkubation) berechnet. **P<0,01.

3.3.4 Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf die Morphologie und die Vitalität der rekombinanten Zellen

Die Behandlung mit dem Induktor Doxyzyklin als auch die daraus folgende Überexpression der hTRPV6-Ionenkanäle können einen Einfluss auf die Vitalität und Morphologie der rekombinanten Zellen haben. Daher wurden die Effekte der Überexpression der beiden hTRPV6-Isoformen auf Morphologie und Vitalität der beiden stabilen Zelllinien in Abhängigkeit der Doxyzyklin-Behandlung untersucht. Die Vitalitätsbestimmungen wurden nach der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Methode mit Hilfe des Cell-Titer-Blue Assays durchgeführt. Um einen möglichen Effekt des zugegebenen Doxyzyklins beurteilen zu können, wurde die nicht-rekombinante CHO-K1-Parentalzelllinie (Wildtyp) in die Analyse einbezogen (Abbildung 36). Für die Bestimmung möglicher Veränderungen der zellulären Morphologie wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

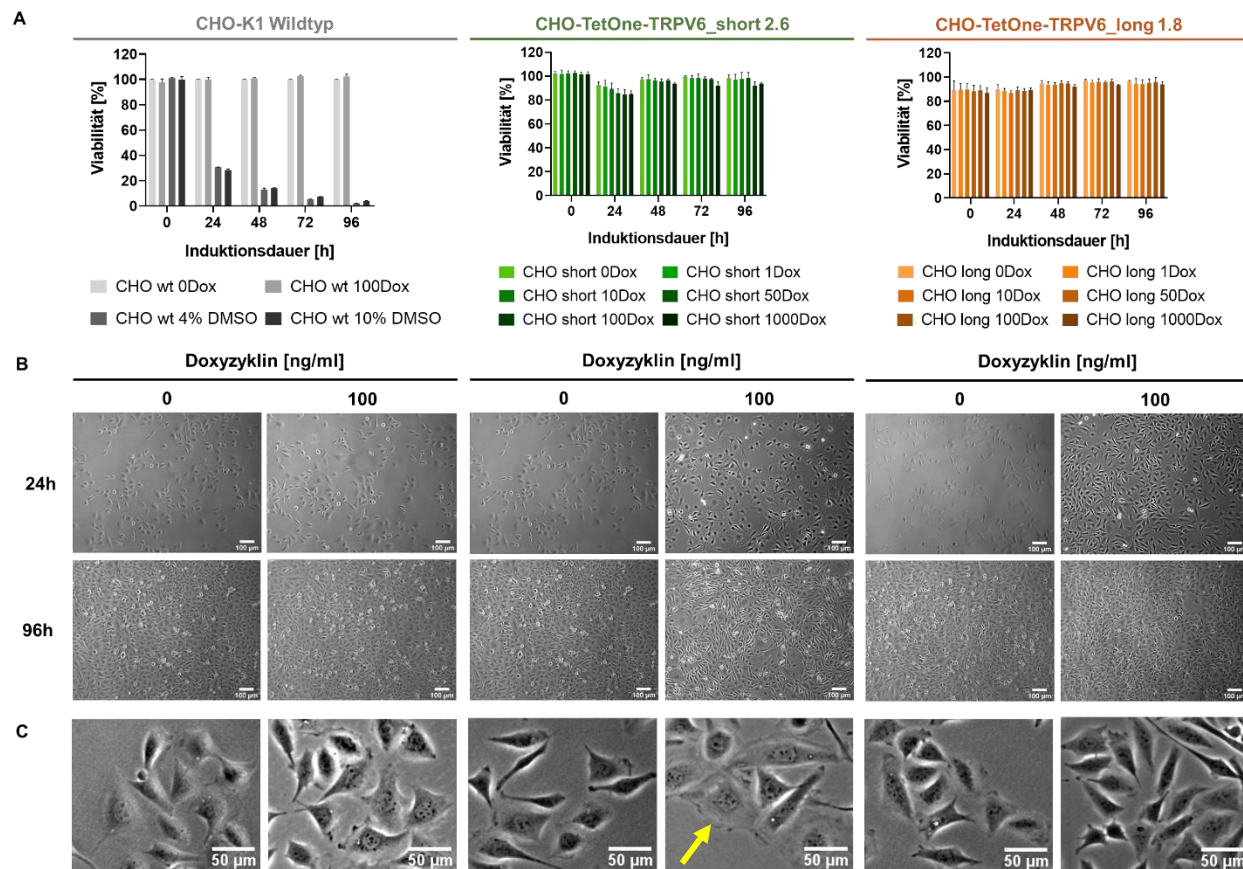


Abbildung 36: Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf die Viabilität und Morphologie der Zellen. A) Viabilität von CHO-K1 Wildtyp, CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long 1.8 Zellen nach Induktion mit Doxyzyklin in Medium mit 10%FCS und 0,24mM Calcium. Es wurden 10.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion mit Doxyzyklin (0-100ng/ml). Nach 0, 24, 48, 72 und 96h Induktion wurde ein fluoreszenzbasierter Cell-Titer-Blue Viabilitätstest durchgeführt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=4 Experimenten. B) Morphologie von CHO-K1 Wildtyp, CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long 1.8 Zellen nach 24h Behandlung mit 0 bzw. 100ng/ml Doxyzyklin. C) Vergrößerte Aufnahmen der Zellmorphologie von CHO-K1 Wildtyp, CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6-mCherry_long 1.8 Zellen nach 24h Behandlung mit 0 bzw. 100ng/ml Doxyzyklin.

Die Analysen der CHO-K1-Wildtyp-Zellen zeigten keinen signifikanten Einfluss der Doxyzyklin-Behandlung auf die Vitalität und Morphologie der Zellen. Die Doxyzyklin-induzierte Überexpression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoformen beeinflusste die Vitalität beider hTRPV6-Zelllinien ebenso nicht signifikant messbar (Abbildung 36 A). In der stabilen CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 Zelllinie wurden nach 24-stündiger Doxyzyklin-Behandlung einige Zellen mit einer größeren und flacheren Morphologie detektiert (Abbildung 36 C). Da dies keinen messbaren Einfluss auf die Vitalität der Zelllinie hatte, wurde dieser Effekt nicht weitergehend quantifiziert. In Zellen, die die lange hTRPV6-Isoform exprimierten, konnte keine Veränderung der Zellmorphologie mit zunehmender Doxyzyklin-Behandlungsdauer beobachtet werden. Für die vergleichenden Funktionsanalysen der Zellmodelle mit der kurzen bzw. langen Isoform des

hTRPV6-Ionenkanals wurde daher nachfolgend eine 24-stündige Behandlung mit 100ng/ml Doxyzyklin festgelegt.

3.3.5 Einfluss der hTRPV6-Expression auf das Wachstumsverhalten

Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, einschließlich der Zellproliferation. Ca^{2+} ist in der G_0/G_1 -Phase entscheidend bei der Regulation der Transkription von am Zellzyklus beteiligten Genen involviert. Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind darüber hinaus im Zellzyklus mit den S- und M-Phase Übergängen assoziiert, wobei die Ca^{2+} -vermittelten Übertragungswege noch nicht umfassend geklärt sind. Da der TRPV6-Ionenkanal eine hohe Selektivität für Calcium-Ionen sowie eine konstitutive Aktivität besitzt, könnte er in der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein. Über eine vergleichende Analyse zwischen den Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform wurde untersucht, ob der um 40 Aminosäuren N-terminal verlängerte Bereich der langen hTRPV6-Isoform eine spezifische Funktion hinsichtlich der Kontrolle des Zellwachstums übernimmt. Der Versuchsansatz beinhaltete die Analyse des Wachstumsverhaltens der beiden hTRPV6-Zellmodelle sowie einer Wildtyp CHO-K1-Zelllinie mittels Bestimmung der Verdopplungszeit in Abhängigkeit vom FCS-Gehalt und der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) im Kulturmedium.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die 96-stündige Behandlung mit dem Induktor Doxyzyklin und der dadurch bedingten Überexpression der hTRPV6-Ionenkanäle zu keiner signifikanten Veränderung der Verdopplungszeit führte (Abbildung 37). Der FCS-Gehalt des Mediums hatte dagegen einen grundlegenden Einfluss auf die Verdopplungszeit in der Kontroll-Zelllinie als auch in den Zellmodellen mit heterologer hTRPV6-Expression. Die Verdopplungszeit in Wildtyp CHO-K1-Zellen bei Kultivierung in Medium mit 0,5% FCS und einer Behandlung mit 100ng/ml Doxyzyklin betrug 27,5h, während sie in Medium mit 10% FCS bei 19,2h lag. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei beiden hTRPV6-Zellmodellen, so dass keine signifikante Änderung der Verdopplungszeit zwischen den Zellen mit Expression der kurzen versus Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform festgestellt werden konnte. Somit ergab sich mittels dieses Experimentes kein Hinweis auf eine spezifische Funktion des N-terminal verlängerten Abschnittes der langen hTRPV6-Isoform, der sich auf die Regulation der Zellverdopplung auswirkt.

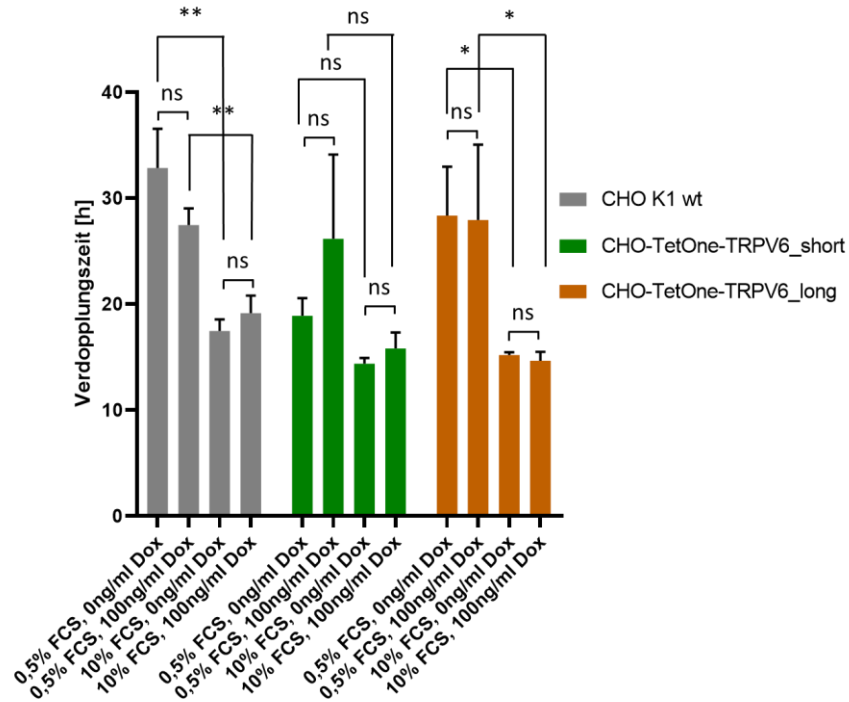


Abbildung 37: Verdopplungszeit von CHO-K1 Wildtyp, CHO-TetOne-TRPV6_short und CHO-TetOne-TRPV6_long Zellen in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration und Induktion mit Doxozyklin. Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte in Medium mit 0,5% bzw. 10% FCS ausgesät. Mit der Aussaat erfolgte gleichzeitig die Induktion mit 0 bzw. 100ng/ml Doxozyklin. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurden die Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Mithilfe der Wachstumskurve wurde anschließend die Verdopplungszeit der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Das Säulendiagramm stellt den Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus n=3-5 Experimenten dar. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0ng/ml Doxozyklin bzw. 10% FCS) berechnet. ns = nicht signifikant, *P< 0,05, **P<0,01.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die $[Ca^{2+}]_e$ in Verbindung mit der Überexpression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Variante einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat (Abbildung 38). Um extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen von 0mM (Ca^{2+} -frei), 0,24mM und 5mM zu erhalten, wurde die $[Ca^{2+}]_e$ im zellspezifischen Medium durch Zugabe einer 0,2M Calciumchlorid-Lösung von 0,24mM auf 5mM erhöht bzw. durch die Zugabe einer 20 μ M EGTA-Lösung auf 0mM erniedrigt. In Abbildung 38 ist die Verdopplungszeit der Zelllinien in Abhängigkeit der eingestellten Ca^{2+} -Konzentrationen im Kulturmedium dargestellt. Die Analyse zeigte ein von der $[Ca^{2+}]_e$ unabhängiges Wachstumsverhalten der Wildtyp CHO-K1-Zellen als auch der Zellen mit heterologer Expression der langen hTRPV6-Isoform. Im Gegensatz dazu war die Verdopplungszeit der Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform im Vergleich der $[Ca^{2+}]_e$ von 0mM bzw. 0,24mM mit einer $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM signifikant von 21,8h auf 37,3h erhöht. Dies bedeutet eine Suppression des Zellwachstums in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Proteinisoform bei stark erhöhter extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration.

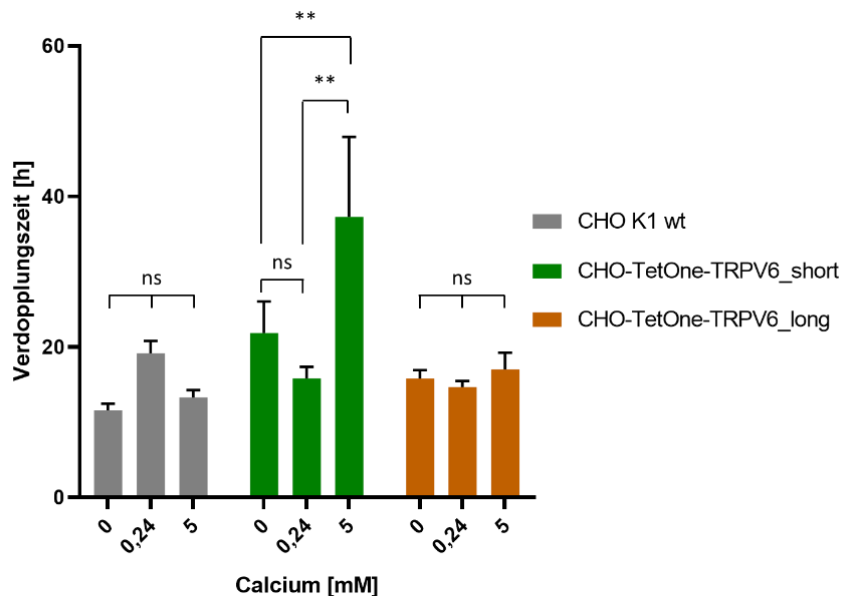


Abbildung 38: Verdopplungszeit von CHO-K1 Wildtyp, CHO-TetOne-TRPV6_short und CHO-TetOne-TRPV6_long Zellen in Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_e$ und Induktion mit Doxzyklin. Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte in Medium mit 10% FCS und einer $[Ca^{2+}]_e$ von 0, 0,24 bzw. 5mM ausgesät. Mit der Aussaat erfolgte gleichzeitig die Induktion mit 100ng/ml Doxzyklin. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Mithilfe der Wachstumskurve wurde anschließend die Verdopplungszeit der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Das Säulendiagramm stellt den Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus n=3-5 Experimenten dar. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0,24mM $[Ca^{2+}]_e$) berechnet. ns = nicht signifikant, **P<0,01.

3.4 Fluorometrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in den hTRPV6-Zellmodellen

Die dynamische, zeitlich-räumliche Veränderung der Konzentration freier, intrazellulärer Calcium-Ionen $[Ca^{2+}]_i$ spielt eine entscheidende regulative Rolle in der Signaltransduktion vieler physiologischer Prozesse. Jede Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ resultiert in einer Beeinflussung Ca^{2+} -abhängiger Signalwege in nahezu allen zellulären Prozessen und in allen Gewebetypen. Die Quantifizierung von Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ stellt damit eine geeignete Methode dar, um die Funktion und Aktivität von Rezeptoren, Ionenkanälen und Ionenpumpen zu analysieren, die in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion involviert sind. Darüber hinaus dient es zur Identifizierung und Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten für diese Proteine, wodurch pharmakologisch eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erreicht und somit Ca^{2+} -abhängige Signalwege moduliert werden können. Zur Quantifizierung der $[Ca^{2+}]_i$ werden in Lebendzell-Messungen Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die in Abhängigkeit von Ca^{2+} ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern.

Prominente Beispiele für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in der Wirkstoffidentifizierung stellen G-Protein gekoppelte Rezeptoren und spannungs- oder ligandengesteuerte Ionenkanäle dar, deren Aktivität

mittels Messung des Ca^{2+} -Einstroms unter Verwendung Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe bestimmt wird. Die gegenüber Ca^{2+} -Einstrom empfindlichen Indikatoren ermöglichen nicht-invasive Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in lebenden Zellen. Die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit einhergehend die Änderung der Fluoreszenzintensität der Indikatoren können mittels Fluoreszenzplattenreadern über einen Photomultiplier detektiert oder mikroskopisch bestimmt werden (Calcium-Imaging). Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten bildgebenden Verfahrens beruht in der hohen zeitlich und räumlichen Sensitivität in der Bestimmung der Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie in der Möglichkeit der Einzelzellanalytik.

Für die vergleichenden Analysen der Aktivität der kurzen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals versus der langen Isoform mittels Bestimmung der Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde ein Flusskammermodell in speziellen μ -Slides der Firma Ibidi etabliert. Dies erlaubte eine einfache, reproduzierbare Zugabe und Wechsel von Medien, Puffern und Substanzen bei konstanter Flussrate. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikator Fluo-8® mikroskopisch bestimmt und analysiert. Der auf diese Weise entwickelte fluoreszenzmikroskopische Calcium-Assay diente in Folge der Arbeit für vergleichende funktionelle Analysen der kurzen sowie der langen Isoform der hTRPV6-Ionenkanäle in den entsprechend etablierten Zellmodellen. Dies umfasste (i) vergleichende Messungen des hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Abhängigkeit der hTRPV6-Expressionshöhe und einer Thapsigargin-Behandlung zur Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, (ii) Untersuchungen des hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ und des pH_e und (iii) Analysen von Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Abhängigkeit von hTRPV6-Antagonisten.

3.4.1 Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von hTRPV6-Überexpression und Thapsigargin-Behandlung

Zur funktionellen Charakterisierung der heterolog exprimierten hTRPV6-Isoformen in den Zellmodellen wurde die durch die hTRPV6-Ionenkanäle vermittelte Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit der Parameter „Expressionshöhe“ sowie „Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher durch Thapsigargin“ analysiert. Die Überexpression der beiden hTRPV6-Isoformen wurde über die Behandlung der Zellen mit dem Induktor Doxyzyklin reguliert und war ein grundlegender Parameter, um die kurze und lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals in den jeweiligen Zellmodellen zu generieren. Der Einfluss ansteigender Induktor-Konzentrationen und einem damit zu erwartenden Anstieg der heterologen hTRPV6-Expression auf die Änderung

der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde in beiden hTRPV6-Zellmodellen vergleichend untersucht. In Kombination wurde durch Inhibierung der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) durch Thapsigargin (Rogers *et al.*, 1995) zusätzlich analysiert, ob die Aktivität der beiden rekombinant exprimierten Isoformen der hTRPV6-Ionenkanäle durch Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des Endoplasmatischen Retikulums und nachfolgender Auslösung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE; Store-Operated Ca^{2+} Entry) aus dem Extrazellularraum unterschiedlich beeinflusst wird.

In der Vergangenheit wurde bereits in verschiedenen Zellmodellen gezeigt, dass die Aktivität der als konstitutiv-aktiv beschriebenen TRPV6-Ionenkanäle durch die Regulation ihrer Expression bzw. Translokation an die Plasmamembran moduliert werden kann (van de Graaf *et al.*, 2006 b). Darüber hinaus wurde in Prostata-Tumormodellen nachgewiesen, dass die Translokation der hTRPV6-Proteine an die Plasmamembran über den Orai1/TRPC1-vermittelten Ca^{2+} -abhängigen Annexin I/S100A11-Signalweg beeinflusst wird. Dies deutet auf eine Beteiligung der hTRPV6-Ionenkanäle an dem speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in den Prostata-Tumorzelllinien hin (Raphaël *et al.*, 2014).

In diesem Kontext war vor allem interessant, ob sich der durch die lange hTRPV6-Isoform vermittelte Ca^{2+} -Einstrom signifikant von der kurzen hTRPV6-Isoform unterscheidet und sich dadurch Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der beiden Isoformen der hTRPV6-Ionenkanäle ergeben, wenn experimentell die hTRPV6-Expressionshöhe verändert wird, sowie die Inhibierung von SERCA und damit Aktivierung von SOCE erfolgt. Die Messung der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde gemäß der Fragestellung in Abhängigkeit ansteigender Doxyzyklin-Konzentrationen sowie Behandlung mit 100nM Thapsigargin bzw. ohne Thapsigargin-Behandlung in den beiden hTRPV6-Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden die TRPV6-Zelllinien 24h vor Beginn der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit 10, 50, 100, 500 bzw. 1000ng/ml Doxyzyklin behandelt, um die Expression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoform zu induzieren. Als Kontrolle dienten die TRPV6-Zelllinien ohne Doxyzyklin-Behandlung. Die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt 700s. Bei Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ohne Zugabe von Thapsigargin wurden die Zellen für 400s mit Ca^{2+} -freiem Puffer überspült, um eine Beeinflussung der Aktivität der hTRPV6-Ionenkanäle durch extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen auszuschließen. Im Zeitintervall von 401-700s erfolgte dann das Überspülen mit Ca^{2+} -haltigem Puffer (2mM Ca^{2+}). Bei Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Thapsigargin-Behandlung wurden die Zellen während der ersten 80s mit Ca^{2+} -freiem Puffer überspült. Danach erfolgte bis 400s eine Behandlung mit 100nM Thapsigargin-Lösung in Ca^{2+} -freiem Puffer und danach von 401-700s mit Ca^{2+} -haltigen Puffer (2mM Ca^{2+}).

Mit den Analysen zur hTRPV6-Überexpression konnte gezeigt werden, dass mit der heterologen Überexpression der hTRPV6-Isoformen eine Erhöhung der maximalen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ einherging (Abbildung 39). Bei Induktion mit 10ng/ml Doxyzyklin und ohne Thapsigargin-Behandlung zeigten Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform eine maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von $6,5 \pm 1,1$ bzw. $8,4 \pm 1,9$. Bei Erhöhung der Doxyzyklin-Konzentration auf 100ng/ml wurde eine maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von $13,7 \pm 1,2$ in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform bzw. $14,8 \pm 0,8$ in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform ermittelt. In beiden Zellmodellen wurde bereits ab einer Doxyzyklin-

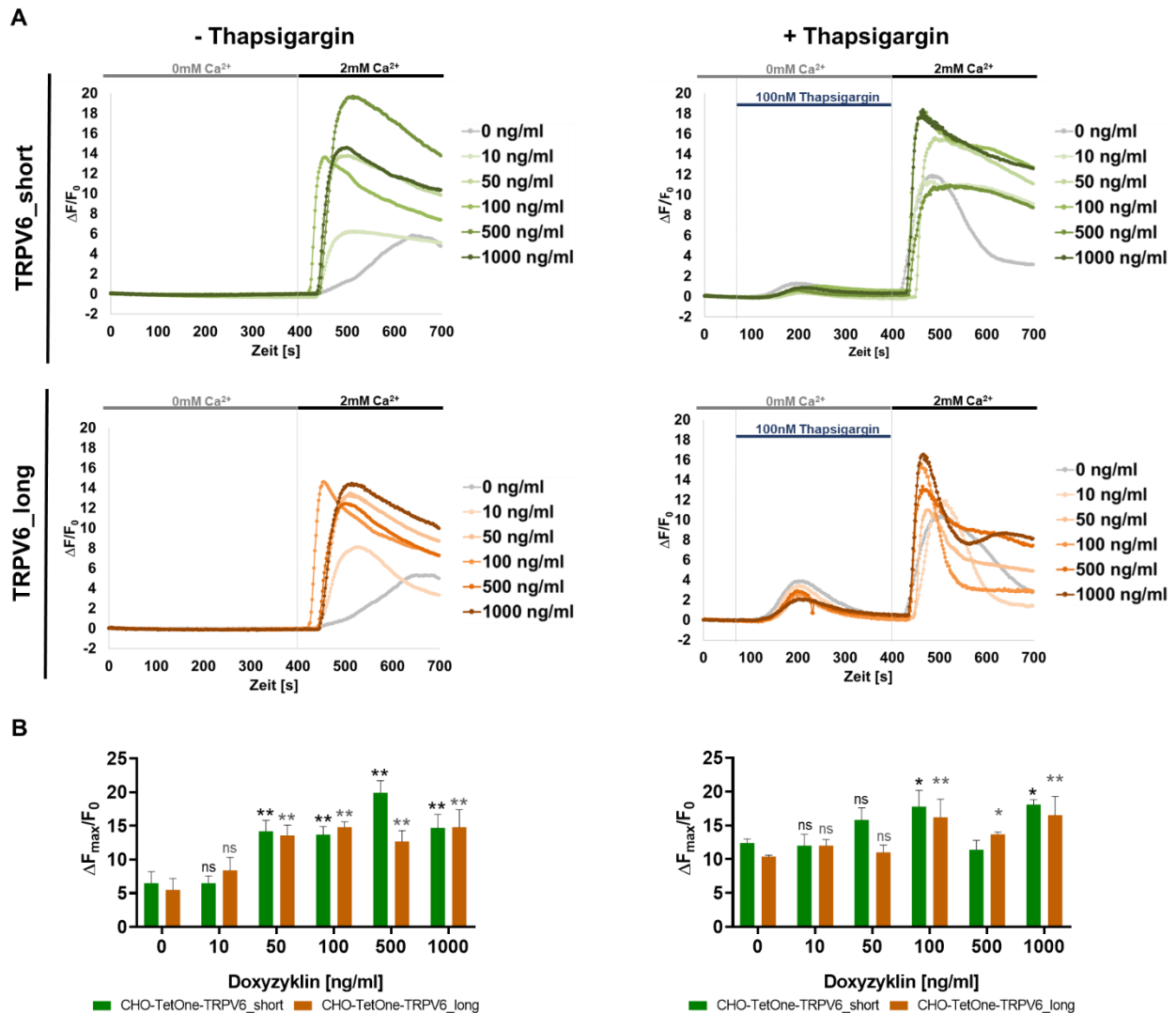


Abbildung 39: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Doxyzyklin-Konzentration und der Thapsigargin-Behandlung der hTRPV6-Zelllinien. 12.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen wurden pro Kanal eines Ibidi μ -Slides ausgesät und nach 24h mit aufsteigenden Doxyzyklin-Konzentrationen behandelt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit $2\mu M$ Fluo-8-AM in Ca^{2+} -freien Puffer beladen und die Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von $2mM Ca^{2+}$ mittels Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Um den Einfluss der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher auf das Ca^{2+} -Einstromverhalten vergleichend in den beiden TRPV6-Zellmodellen untersuchen zu können, wurden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ ohne Thapsigargin-Behandlung sowie mit $100nM$ Thapsigargin durchgeführt. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Ca^{2+} -Messung. B) Ermittelte $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte. Die Signifikanzen wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0ng/ml Doxyzyklin) berechnet. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Die Kurven sind repräsentativ aus $n=3$ Experimenten.

Konzentration von 50ng/ml Doxyzyklin und ohne Thapsigargin-Behandlung keine weitere maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ mehr erreicht. Dies korreliert mit den gemessenen mCherry-Fluoreszenzintensitäten in den beiden Zellmodellen in Abhängigkeit ansteigender Doxyzyklin-Konzentrationen (Abbildung 34 und Abbildung 33). In beiden hTRPV6-Zellmodellen stieg die maximale mCherry-Fluoreszenzintensität und somit die Expressionshöhe der kurzen bzw. langen hTRPV6-Proteinisoformen bei Doxyzyklin-Konzentrationen über 50ng/ml nicht mehr signifikant an. Insgesamt konnte bei Betrachtung der maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der hTRPV6-Expressionshöhe ohne eine Thapsigargin-vermittelte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit Expression der kurzen versus der langen hTRPV6-Isoform festgestellt werden.

Anhand des Ca^{2+} -Imaging der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit einer Behandlung der Zellen mit 100nM Thapsigargin konnte gezeigt werden, dass die maximale Änderung der Fluo-8-Intensität in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform durchschnittlich 1,4-fach und in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform durchschnittlich 1,3-fach im Vergleich zu den Messungen ohne Vorbehandlung mit Thapsigargin erhöht ist. Somit konnte bei einer Thapsigargin-vermittelten Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und trotz unterschiedlicher Expressionshöhen der beiden hTRPV6-Isoformen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ca^{2+} -Einstrom festgestellt werden, der jeweils durch die kurze oder lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals vermittelt wurde. Weiterhin war zu beobachten, dass Zellen ohne Doxyzyklin- aber mit Thapsigargin-Behandlung eine zweifache Erhöhung des Fluo-8-Signals im Vergleich zu Zellen, die weder mit Doxyzyklin noch mit Thapsigargin behandelt wurden, zeigten. Da in den hTRPV6-transgenen Zelllinien ohne Doxyzyklin-Behandlung keine TRPV6-Ionenkanäle exprimiert werden, könnte der Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenz auf den SOCE-Mechanismus, einem speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum mittels „Store-operated calcium channels“ (SOCCs) zurückgeführt werden. Durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum wird die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht und somit das Wiederauffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums über die SERCA-Pumpen erreicht. SOCCs sind Ionenkanäle in der Plasmamembran, deren Aktivität durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher reguliert wird. Infolge der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wandert das ER-membranständige Protein STIM1 (stromal interaction molecule-1) an spezifische Membrankontaktzonen zwischen ER und Plasmamembran, wo es mit dem Ca^{2+} -selektiven Ionenkanal Orai-1 bzw. Orai-2 oder anderen SOCCs (Hogan & Rao, 2015; Avila-Medina *et al.*, 2018) interagiert.

Obwohl zwischen den Zellen mit Expression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoform in Abhängigkeit der Thapsigargin-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der maximalen

Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration festgestellt werden konnten, wiesen die Kurvenverläufe der Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deutliche Unterschiede zwischen den beiden hTRPV6-Zellmodellen auf. In Zellen mit induzierter Expression (100ng/ml Doxozyklin) der kurzen hTRPV6-Isoform stieg die Fluo-8-Intensität nach Zugabe des Ca^{2+} -haltigen Puffers innerhalb von durchschnittlich 75s auf das Peak-Maximum an. Das Fluo-8-Signal fiel dann innerhalb der nächsten 225s um durchschnittlich 29,8% ab. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen nach induzierter Expression (100ng/ml Doxozyklin) der langen hTRPV6-Isoform und nach Zugabe des Ca^{2+} -haltigen Puffers ein um 10s schnellerer Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität auf das Peak-Maximum detektiert werden. Danach fiel innerhalb der nächsten 90s das Fluo-8-Signal durchschnittlich um 81,4% ab. Dies zeigt an, dass die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über Feedback-Mechanismen schneller inaktiviert wird als die kurze hTRPV6-Isoform. Die Ergebnisse könnten zusätzlich auf Signalwege hinweisen, die an einer Aktivierung der SOCE-Ionenkanäle gekoppelt und an der Regulation der hTRPV6-Ionenkanäle beteiligt sind.

Zusammenfassend wurde durch die Analysen gezeigt, dass in beiden TRPV6-Zellmodellen funktionelle hTRPV6-Ionenkanäle der jeweiligen Isoform gebildet wurden, über die ein hTRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgte. Bei Betrachtung der maximalen Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der hTRPV6-Expressionshöhe und einer Thapsigargin-Behandlung der Zellen als auch in Abhängigkeit ohne Thapsigargin-Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellmodellen mit Expression der kurzen bzw. der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals festgestellt werden. In beiden Zellmodellen wurde die gleiche maximale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detektiert, obwohl die kurze hTRPV6-Isoform zweifach stärker als die lange Isoform exprimiert wurde. Unter der Annahme, dass aufgrund der zweifach höheren Expression mehr hTRPV6-Ionenkanäle der kurzen als der langen Isoform an die Membran translozieren, würden die Ergebnisse auf eine geringere Aktivität der kurzen hTRPV6-Isoform bzw. der daraus gebildeten Ionenkanäle deuten. Alternativ könnten die Ergebnisse auch anzeigen, dass die Zellen die Überexpression der kurzen hTRPV6-Isoform über eine geringere Translokation an die Zellmembran regulieren und damit den durch die kurze TRPV6-Isoform vermittelten Netto- Ca^{2+} -Einstrom reduzieren. Die schnellere Abnahme der Fluo-8-Intensität in Zellen mit Expression der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals nach Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin weist auf einen schnelleren Inaktivierungsmechanismus hin, bei dem die verlängerte N-terminale Region des hTRPV6-Proteins wahrscheinlich involviert ist.

3.4.2 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Thapsigargin-Konzentration und -Behandlungsdauer

Um einen konzentrations- und Behandlungsdauer-abhängigen Effekt einer Thapsigargin-vermittelten Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher im Zusammenhang mit der hTRPV6-vermittelten Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration analysieren zu können, wurde in den TRPV6-Zelllinien die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Behandlung mit zwei verschiedenen Thapsigargin-Konzentrationen (1nM und 1000nM) sowie in Abhängigkeit einer 0,5- bzw. 24-stündigen Thapsigargin-Behandlungsdauer (1000nM) bestimmt. In der ersten Analyse wurden die TRPV6-Zelllinien 24h nach der Aussaat mit 100ng/ml Doxyzyklin zur Induktion der heterologen hTRPV6 Expression sowie zeitgleich mit 1nM bzw. 1000nM Thapsigargin inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen für das Ca^{2+} -Imaging für 400s mit Ca^{2+} -freiem Puffer überspült und anschließend die $[Ca^{2+}]_e$ für 300s von 0mM auf 2mM erhöht. Abbildung 40 verdeutlicht, dass in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform nach einer 24-stündigen Behandlung mit 1nM bzw. 1000nM Thapsigargin und bei Erhöhung der $[Ca^{2+}]_e$ von 0 auf 2mM Ca^{2+} bei beiden Thapsigargin-Konzentrationen eine sehr ähnliche Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu detektieren war, die signifikant größer als in Thapsigargin-unbehandelten Zellen war. Die 24-stündige Behandlung mit Thapsigargin bewirkte in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform offensichtlich einen größeren Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zu Thapsigargin-unbehandelten Zellen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war unter gleichen, oben genannten experimentellen Bedingungen die maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform in Abhängigkeit der Thapsigargin-Behandlung signifikant niedriger als in unbehandelten Zellen. Je höher dabei die eingesetzte Thapsigargin-Konzentration war, desto niedriger war der durch die lange hTRPV6-Isoform vermittelte Ca^{2+} -Einstrom. Wie im vorlaufenden Experiment bereits angezeigt, wird die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals durch eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher im Vergleich zur kurzen Isoform schneller inaktiviert, waron die um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminale Region beteiligt ist.

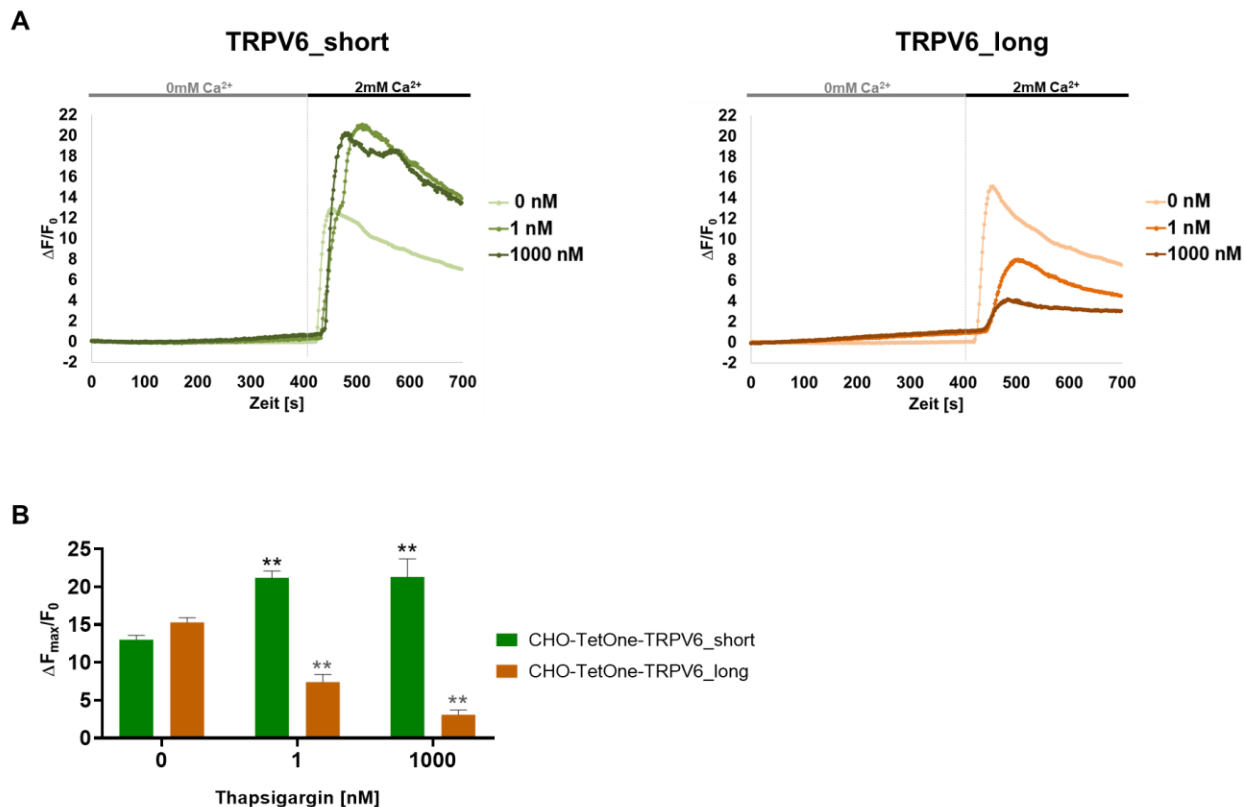


Abbildung 40: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Thapsigargin-Konzentration. 12.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen wurden pro Kanal eines Ibidi μ -Slides ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxozyklin sowie 0, 1 bzw. 1000nM Thapsigargin behandelt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit $2\mu M$ Fluo-8-AM in Ca^{2+} -freiem Puffer beladen und die Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von $2mM Ca^{2+}$ mittels Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie gemessen. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf des Ca^{2+} -Imaging. B) Ermittelte $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0nM Thapsigargin) berechnet. ** $P < 0,01$. Die Kurven sind repräsentativ aus $n=3$ Experimenten.

In der zweiten Analyse wurde die hTRPV6-vermittelte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Thapsigargin bestimmt. Dazu wurden die beiden TRPV6-Zelllinien über einen Zeitraum von 0,5h sowie 24h mit 1000nM Thapsigargin behandelt (Abbildung 41).

Im Vergleich zu Thapsigargin-unbehandelten Zellen wurde in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform bereits nach einer 0,5-stündigen Thapsigargin-Behandlung eine maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ erreicht. Bei der 24-stündigen Thapsigargin-Behandlung konnte keine weitere Änderung von $\Delta F_{max}/F_0$ beobachtet werden (Abbildung 41 B). Im Gegensatz dazu wurde in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform eine Erniedrigung von $\Delta F_{max}/F_0$ in Abhängigkeit der Thapsigargin-Behandlung beobachtet, die bei der 0,5-stündigen Thapsigargin-Behandlung noch nicht messbar war, sondern erst nach 24-stündiger Thapsigargin-Behandlung signifikant nachgewiesen werden konnte.

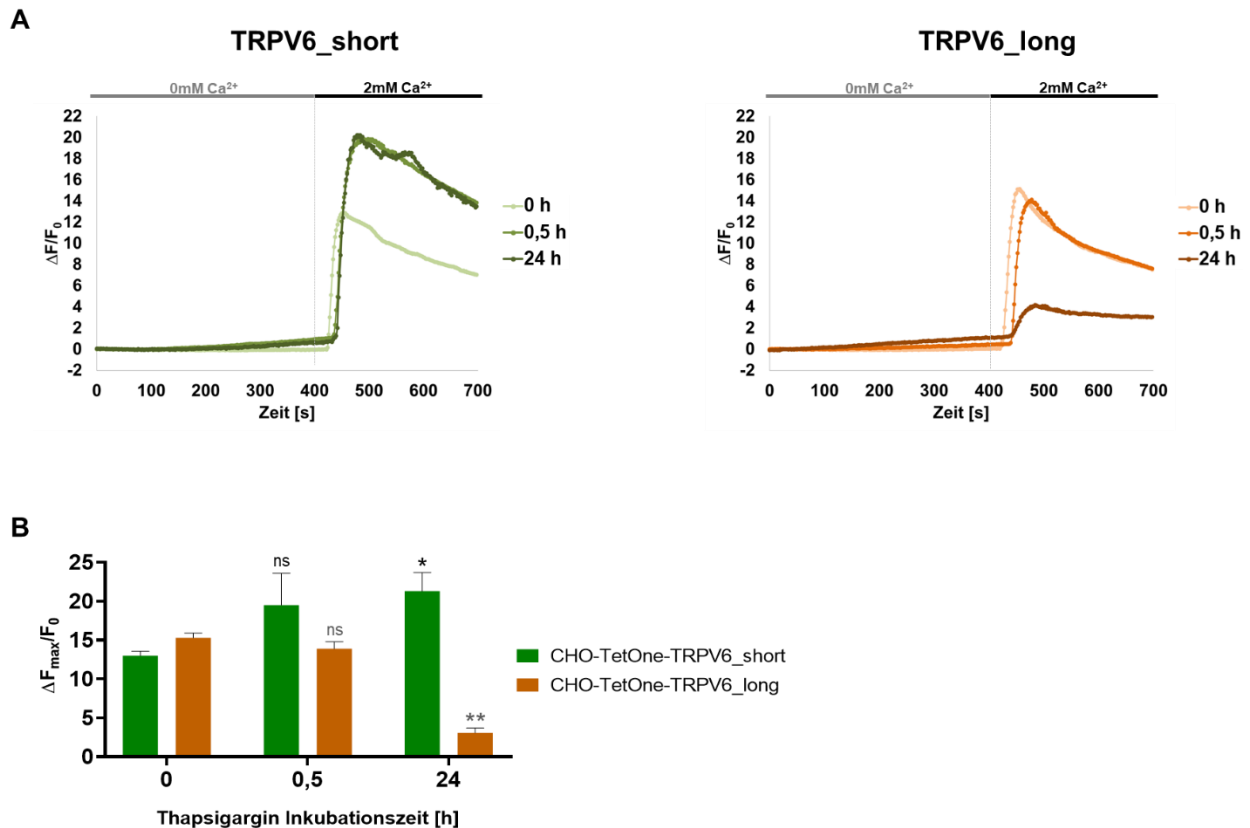


Abbildung 41: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit 1000nM Thapsigargin. 12.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen wurden pro Kanal eines Ibidi μ -Slides ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit 2 μ M Fluo-8-AM in Ca^{2+} -freiem Puffer beladen und die Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von 2mM Ca^{2+} mittels Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Um die Auswirkung der Thapsigargin-Inkubationsdauer untersuchen zu können, wurden die Zellen 0h, 0,5h bzw. 24h vor Beginn der Messung zusätzlich mit 1 μ M Thapsigargin behandelt. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Calcium-Messung. B) Ermittelte $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der Kontrolle (0h Thapsigargin Inkubationszeit) berechnet. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Die Kurven sind repräsentativ aus $n=3$ Experimenten.

Die vergleichenden Analysen der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin-Behandlung zeigten im Rahmen der experimentellen Bedingungen deutliche Unterschiede zwischen der kurzen und langen Isoform des TRPV6-Ionenkanals hinsichtlich der maximalen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Zellen mit heterologer Expression der kurzen hTRPV6-Isoform wiesen eine Erhöhung von $\Delta F_{max}/F_0$ bereits nach 0,5h Behandlung mit niedriger (1nM) bzw. hoher (1000 nM) Thapsigargin-Konzentration auf. Auch in der 24-stündigen Behandlung mit 1000nM Thapsigargin konnte keine Abnahme der maximalen Änderung $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, d.h. unabhängig von den eingesetzten Thapsigargin-Konzentrationen sowie der Dauer der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher ergab sich keine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Dies könnte auf eine nur sehr langsame oder fehlende Regulation der kurzen Isoform des TRPV6-Ionenkanals in Abhängigkeit der veränderten Ca^{2+} -Homöostase in dem Zellmodell hinweisen. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen mit heterologer Expression der langen Isoform des TRPV6-

Ionenkanals erst unter der 24-stündigen Thapsigargin-Behandlung ein Effekt beobachtet werden, der allerdings, gegenläufig zur kurzen Isoform, eine Inhibierung der Aktivität der langen Isoform der TRPV6-Ionenkanäle anzeigte.

3.4.3 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in den TRPV6-Zelllinien in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_e$

Die Regulierung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_e$ innerhalb eines engen Bereiches von 1,1 - 1,4mM ist ein essentieller Bestandteil der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beim Menschen. Zur Regulierung der Ca^{2+} -Homöostase sind vor allem der Darm, die Nieren und Knochen wichtig. Bei der Resorption von Ca^{2+} beispielsweise aus dem Darmlumen werden entlang des elektrochemischen Gradienten Calcium-Ionen durch die TRPV5- bzw. TRPV6-Ionenkanäle in die Epithelzellen aufgenommen. Der transzelluläre Ca^{2+} -Transport erfolgt in drei Schritten, innerhalb derer Calcium-Ionen an der dem Lumen zugewandten apikalen Membran durch die TRPV5- bzw. TRPV6-Ionenkanäle in die Zelle einströmen, anschließend an Calbindin-Proteine gebunden durch das Cytoplasma diffundieren und dann an der basolateralen Membran durch einen energieabhängigen, durch den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (*NCX1*) und/oder die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (*PMCA1b*) vermittelten Ausstrom aus der Zelle transportiert werden. Der passive Ca^{2+} -Einstrom an der apikalen Zellmembran wird durch die über 10.000-fach höhere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu $[Ca^{2+}]_i$ (50-100nM) angetrieben (Peng *et al.*, 2003; Nihenhuis *et al.*, 2005). Die Ca^{2+} -selektiven TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle stellen in der aktiven Resorption von Ca^{2+} einen limitierenden Faktor dar und werden daher als „Gatekeeper“ des transepithelialen Ca^{2+} -Transports bezeichnet (Hoenderop *et al.*, 2002). Trotz der engen Kontrolle der $[Ca^{2+}]_e$ können lokale Änderungen der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entstehen. Ca^{2+} -spezifische Sensorproteine, Ionenkanäle und Ca^{2+} -Bindeproteine vermitteln lokale Änderungen der extrazellulären Konzentration als Signal in die Zelle, wodurch intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden (Breitwieser, 2008).

Um in diesem Kontext den Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf den durch die hTRPV6-Isoformen vermittelten Ca^{2+} -Einstrom vergleichend zu analysieren, wurde in den TRPV6-Zellen die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit einer ansteigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (0,6mM; 1,25mM; 2,5mM; 5mM; 10mM; 20mM) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform in Ibidi-Durchflussskammern ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Die Doxyzyklin-

Induktion der heterologen hTRPV6-Expression erfolgte über 24h. Als Kontrolle wurden Zellen mit kurzer bzw. langer hTRPV6-Isoform ohne Doxyzyklin-Behandlung eingesetzt. Für das anschließende Ca^{2+} -Imaging wurden die Zellen über einen Zeitraum von 400s mit Ca^{2+} -freiem Puffer überspült und nachfolgend über eine Dauer von 300s in Ca^{2+} -haltigem Puffer entsprechend der oben angezeigten Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_e$: 0,6mM; 1,25mM; 2,5mM; 5mM; 10mM; 20mM) inkubiert.

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse des Ca^{2+} -Imaging mit Zellen ohne Doxyzyklin induzierter Expression der TRPV6-Ionenkanäle sowie mit Zellen, die entweder die kurze oder lange hTRPV6-Isoform exprimieren, zusammengefasst. Die Messungen zeigten in nicht-induzierten Zellen ohne hTRPV6-Expression als auch in induzierten Zellen mit hTRPV6-Expression einen Anstieg der maximalen Änderung der Fluo-8-Intensität ($\Delta F_{\text{max}}/F_0$) mit zunehmender $[\text{Ca}^{2+}]_e$. In Zellen ohne Doxyzyklin-Behandlung (- Doxyzyklin, Abbildung 42) wurde die heterologe Expression der hTRPV6-Ionenkanäle nicht induziert, so dass die ausgelösten biphasischen Ca^{2+} -Signale in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in diesen Zellen nicht auf einen durch hTRPV6-bedingten Einstrom von Ca^{2+} zurückzuführen sind. Die ausgelöste Änderung der Fluo-8-Intensität ist vermutlich durch einen speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) aufgrund der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ auf 2mM bedingt. Die Kurvenverläufe der gemessenen Fluo-8-Intensitäten zeigten in den nicht mit Doxyzyklin induzierten Zellen einen langsameren Anstieg zum initialen Peak als in den Kurvenverläufen der Zellen mit TRPV6-Expression zu beobachten ist.

In Zellen mit induzierter Expression der kurzen oder langen hTRPV6-Isoform stieg die Fluo-8-Intensität in Abhängigkeit zunehmender $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sehr steil zu einem initialen Peak an und fiel anschließend langsam wieder ab (+ Doxyzyklin, Abbildung 42). Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform wiesen nach Inkubation mit 1,25mM Ca^{2+} ein 5,7-fach höheres Fluo-8-Signal im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen auf. Mit zunehmender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration verringerten sich jedoch die Unterschiede in der Fluo-8-Signalintensität zwischen Zellen ohne Expression der hTRPV6-Ionenkanäle und Zellen mit Expression der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoform. Beispielsweise wiesen Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform nach Inkubation in 20mM Ca^{2+} -Puffer im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen nur noch ein 1,4-fach erhöhtes Fluo-8-Signal auf, welches jedoch immer noch signifikant war. Eine höhere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer stärkeren Aktivierung anderer Ca^{2+} -permeabler Ionenkanäle, wodurch ein zusätzlicher, hTRPV6-unabhängiger Ca^{2+} -Einstrom generiert wird. Somit gilt prinzipiell zu berücksichtigen, dass beim Ca^{2+} -Imaging die Ca^{2+} -Einströme, vermittelt durch die

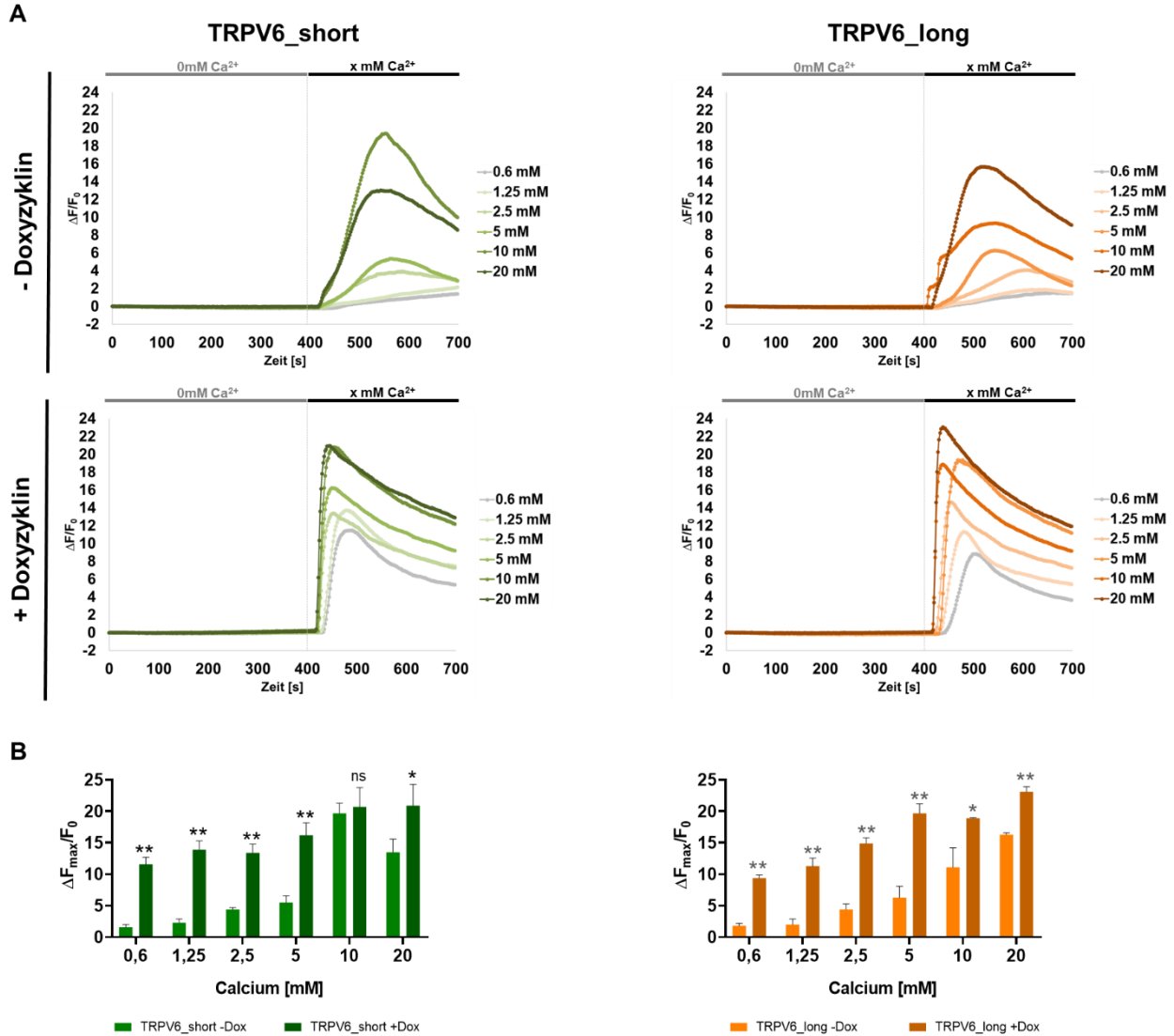


Abbildung 42: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_e$ in den hTRPV6-Zellmodellen. 12.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen pro Kanal eines Ibidi μ -Slides ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Als Kontrolle dienten Doxyzyklin-unbehandelte Zellen. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit $2\mu M$ Fluo-8-AM in Ca^{2+} -freien Puffer beladen und die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_e$ von 0mM auf 0,6 bis 20mM Ca^{2+} analysiert. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Ca^{2+} -Messung. B) Ermittelte $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle (nicht-induzierte Zellen) berechnet. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Die Kurven sind repräsentativ aus $n=3$ Experimenten.

hTRPV6-Ionenkanäle und durch weitere Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle zusammen in dem Fluo-8-Signal erfasst werden. Anhand der unterschiedlichen Kurvenverläufe der Fluo-8 Messungen von Zellen ohne hTRPV6-Expression im Vergleich zu Zellen mit Expression der hTRPV6-Isoformen ist trotzdem deutlich zu erkennen, dass die TRPV6-Ionenkanäle in Abhängigkeit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_e$ direkt an der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt waren, was durch die etwa 5-fach schnellere sowie fast 6-fach höhere Änderung der gemessenen Fluo-8-Intensität angezeigt wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression der beiden hTRPV6-Isoformen bereits bei geringen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,6mM zu einer

signifikant erhöhten Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte. In einem direkten Vergleich zwischen Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform versus der langen hTRPV6-Isoform war allerdings kein signifikanter Unterschied in der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit zur extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration festzustellen. In Abgrenzung zur kurzen hTRPV6-Isoform war damit mittels der durchgeführten Analyse kein spezifischer Zusammenhang zwischen den zusätzlichen 40 Aminosäuren der langen TRPV6-Isoform und dem Ca^{2+} -Ioneneinstrom in Abhängigkeit der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration festzustellen.

In Ergänzung der oben dargestellten Analyse wurde die Abhängigkeit des hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms von einer längeren, 24-stündigen Kultivierung der TRPV6-Zelllinien in Medium mit Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,24mM und 5mM sowie Ca^{2+} -frei untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Expression der kurzen bzw. langen TRPV6-Isoform in Ibidi-Durchflusskammern ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Zeitgleich wurde die Ca^{2+} -Konzentration des Mediums (0,24mM Ca^{2+} laut Herstellerangaben) durch die Zugabe einer 0,2M Calciumchlorid-Lösung auf 5mM Ca^{2+} erhöht bzw. durch die Zugabe einer 20 μ M EGTA-Lösung die Einstellung von Ca^{2+} -freiem Medium erreicht. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde das Ca^{2+} -Imaging durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 25min mit Fluo-8 beladen. Die Ca^{2+} -Konzentration des Beladungspuffers entsprach dabei der Ca^{2+} -Konzentration des Mediums während der vorhergehenden 24-stündigen Inkubation. Nach einem 25-minütigen Inkubationsschritt in Ca^{2+} -freiem Puffer wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_e$ auf 2mM erhöht und die resultierende Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den TRPV6-Zellen gemessen.

Die Analyse zeigte, dass in beiden, mit Doxyzyklin-induzierten hTRPV6-Zelllinien der Ca^{2+} -Einstrom bei Kultivierung in einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_e$ von 5mM im Vergleich zur Kultivierung in Medium mit einer $[\text{Ca}^{2+}]_e$ von 0,24mM signifikant verringert ist (Abbildung 43). Zellen, die die kurze TRPV6-Variante exprimierten, wiesen bei Kultivierung in einer $[\text{Ca}^{2+}]_e$ von 5mM im Vergleich zu 0,24mM ein um 81,8% erniedrigtes Fluo-8-Intensitätssignal auf. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform war das Fluo-8-Intensitätssignal bei 24-stündiger Kultivierung in einer $[\text{Ca}^{2+}]_e$ von 5mM um 95,8% niedriger als bei 24-stündiger Kultivierung in einer $[\text{Ca}^{2+}]_e$ von 0,24mM.

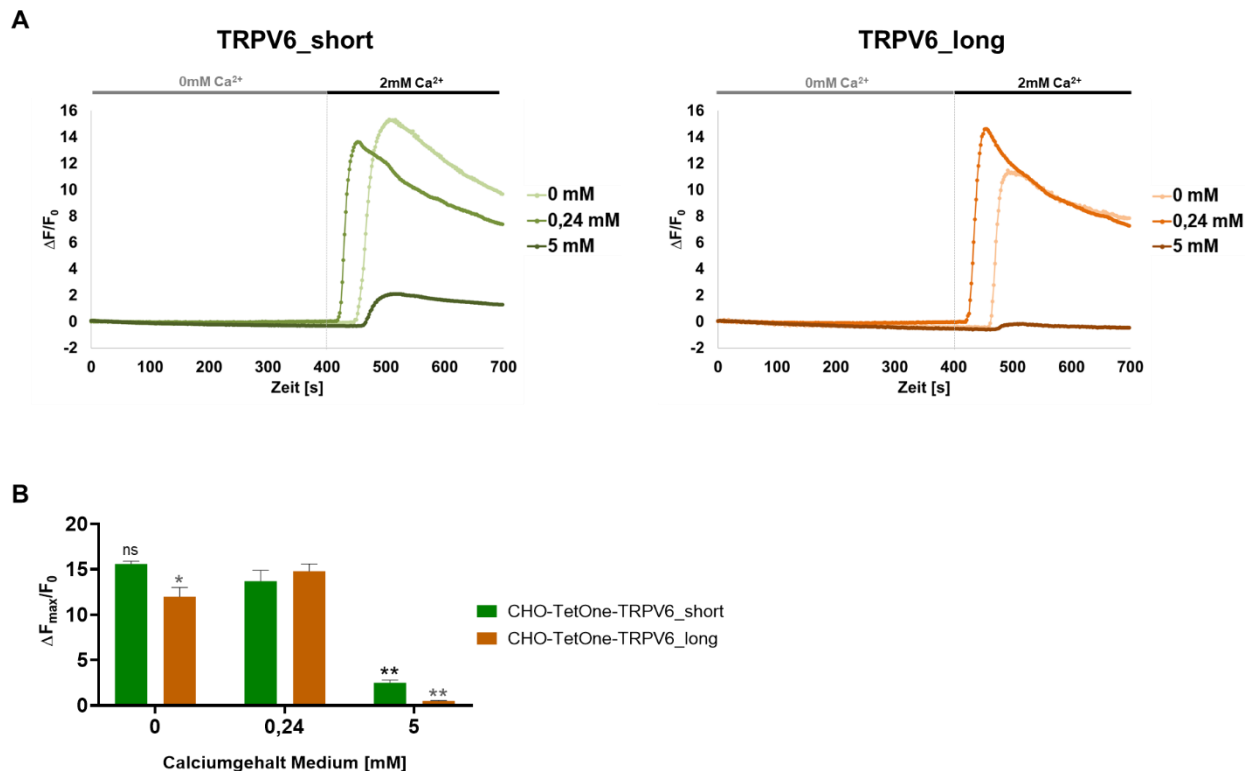


Abbildung 43: Abhängigkeit des TRPV6-vermittelten Ca²⁺-Einstroms von einer 24-stündigen Kultivierung der Zellen mit Expression der kurzen bzw. langen TRPV6 Isoform in Medium mit unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen. Zellen mit Doxyzyklin-induzierter Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform wurden in einer [Ca²⁺]_e von 0mM, 024mM und 5mM für einen Zeitraum von 24h kultiviert und die [Ca²⁺]_i analysiert. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Calcium-Messung. B) Ermittelte ΔF_{max}/F₀-Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle (Ca²⁺-Konzentration des Kulturmediums = 0,24mM Ca²⁺) berechnet. ns = nicht signifikant, *P<0,05, **P<0,01. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3 Experimenten.

Im Vergleich der Zellen mit Expression der kurzen versus der langen TRPV6 Isoform zeigten die Ergebnisse, dass der hTRPV6-vermittelte Ca²⁺-Einstrom bei einer 24-stündiger Kultivierung der TRPV6 Zellen mit einer [Ca²⁺]_e von 0mM und 0,24mM ähnlich ist. Erst bei einer [Ca²⁺]_e von 5mM war eine signifikante Reduktion des hTRPV6-vermittelten Ca²⁺-Einstroms zu detektieren, die bei den Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform stärker war als bei Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform. Diese Änderung wurde bei der kurzzeitigen Kultivierung der TRPV6-Zellen in einer [Ca²⁺]_e von 5mM nicht detektiert.

3.4.4 hTRPV6-vermittelter Ca²⁺-Einstrom in Abhängigkeit des extrazellulären pH-Wertes

Die aktive Calcium-Resorption in der Niere ist ein Hauptprozess der Ca²⁺-Homöostase. Der TRPV6-Ionenkanal als auch der homologe TRPV5-Ionenkanal stellen apikale Eintrittswege für Ca²⁺ in epithelialen Zellen dar und sind in diese Prozesse involviert. Für den TRPV5-Ionenkanal

wurde bereits in HEK293-Zellen gezeigt, dass eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) zu einer schnellen Rekrutierung von TRPV5 beinhaltenden Vesikeln an die Plasmamembran und folgender Membranfusion nach dem sogenannten „Kiss and Linger“-Mechanismus führt (Lambers *et al.*, 2007).

Da zwischen dem TRPV5- und dem TRPV6-Ionenkanal eine 75% Aminosäuresequenzhomologie sowie ähnliche Struktur vorliegt, wurde analog zu dem publizierten Effekt des extrazellulären pH-Wertes (pH_e) auf den TRPV5-Ionenkanal ein möglicher Einfluss des pH_e in den TRPV6-Zellmodellen vergleichend getestet. Dazu wurde in beiden TRPV6-Zelllinien zunächst die Überexpression der hTRPV6-Ionenkanäle mittels 24h Inkubation mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert und anschließend für 25min mit Fluo-8 in Ca^{2+} -freiem Puffer beladen. Als Kontrolle wurden CHO-K1-Wildtyp-Zellen eingesetzt. Um den Einfluss einer Änderung des pH_e auf den Ca^{2+} -Einstrom zu analysieren, wurden die Zellen nachfolgend kurzzeitig für 0,5h in Ca^{2+} -freiem Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten von pH 6, pH 7,4 sowie pH 8,5 inkubiert (basierend auf Lambers *et al.*, 2007). Für das Ca^{2+} -Imaging wurden die Zellen entsprechend des etablierten Protokolls für 400s mit Ca^{2+} -freiem Puffer überspült, wobei der Puffer jeweils entsprechend der oben genannten pH-Werte eingestellt war. Für die Messung des TRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Abhängigkeit des pH_e wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf 2mM erhöht, wobei in den 2mM Ca^{2+} -Pufferlösungen ebenso die oben aufgeführten pH-Werte jeweils beibehalten wurden.

Im Vergleich zwischen pH_e von 6 zu 7,4 wurde in CHO-K1-Kontrollzellen ohne TRPV6-Expression als auch in Zelllinien mit Überexpression der TRPV6-Isoformen bei einem pH_e von 6 ein signifikant niedrigeres Fluo-8 Signal als bei einem pH_e von 7,4 gemessen (Abbildung 44). Dies könnte darauf beruhen, dass bei einem sauren pH-Wert keine hTRPV6-Ionenkanäle in die Plasmamembran funktionell integriert wurden oder die Ionenkanäle unter diesen Bedingungen inaktiviert waren. Im Gegensatz dazu wurde bei einem erhöhten pH_e von 8,5 in CHO-K1-Kontrollzellen und in hTRPV6-exprimierenden Zellen ein signifikant höheres Fluo-8-Signal gemessen als bei einem pH_e von 7,4. Die CHO-K1-Kontrollzellen wiesen bei einem pH_e von 8,5 allerdings eine geringere Änderung der Fluo-8 Intensität auf als die Zellen mit hTRPV6-Überexpression. In Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform wurde eine 2,6-fache Erhöhung des Fluo-8-Signales gemessen, während Zellen mit Expression der langen TRPV6-Isoform nur eine 1,8-fache Erhöhung, also einen geringeren Ca^{2+} -Einstrom zeigten. Bei extrazellulären, sauren pH-Werten war der Ca^{2+} -Einstrom in allen Zellmodellen signifikant geringer war als bei neutralen pH-Werten. Im Gegensatz dazu war bei extrazellulären, alkalischen Bedingungen der hTRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom gegenüber neutralen pH-Werten in allen Zellmodellen signifikant erhöht. Zellen mit Expression

der kurzen hTRPV6-Isoform wiesen bei einem pH_e von 8,5 einen höheren Ca^{2+} -Einstrom auf als Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform, was auf eine unterschiedliche Regulierung der hTRPV6-Ionenkanalisoformen hinweist. In den CHO-K1 Wildtypzellen, die keine TRPV6-Ionenkanäle exprimieren, wurde die gleiche Abhängigkeiten des Ca^{2+} -Einstroms von dem extrazellulärem pH-Wert beobachtet, wenngleich aber weniger stark ausgeprägt. Hier wird der Ca^{2+} -Einstrom durch andere Ionenkanäle vermittelt und könnte auf dem SOCE-Mechanismus bzw. den „Store-operated“ Ca^{2+} Ionenkanälen (SOCCs) beruhen. In den Zellmodellen mit Überexpression der hTRPV6-Isoformen war der zusätzliche, durch die hTRPV6-Ionenkanäle vermittelte Ca^{2+} -Eintrag trotzdem sehr gut zu detektieren und von dem durch andere Ionenkanäle bedingten Ca^{2+} -Einstrom zu differenzieren.

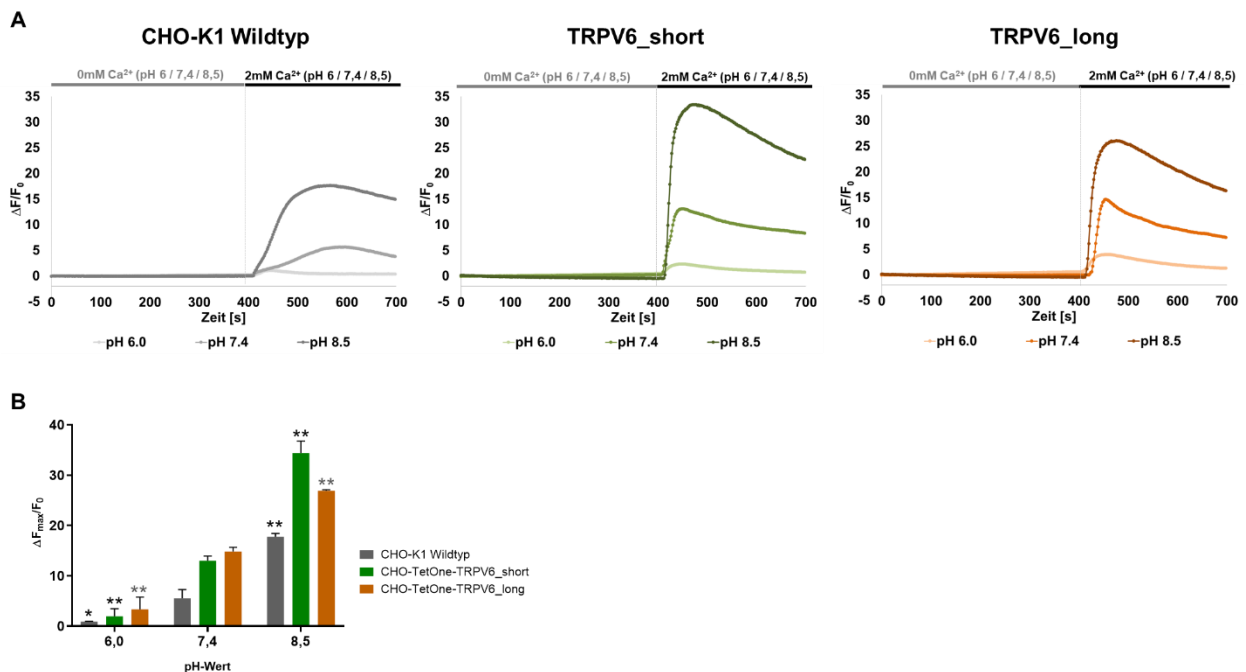


Abbildung 44: TRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in Abhängigkeit von dem pH_e . CHO-K1 Wildtypzellen und Zellen mit Doxyzyklin-induzierter Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform wurden in Medium für 0,5h mit extrazellulären pH-Werten von 6, 7,4 bzw. 8,5 inkubiert und anschließend mittels Calcium-Imaging analysiert. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Calcium-Messung. Ermittelte $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit dem physiologischen pH-Wert (pH 7,4) berechnet. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Die Kurven sind repräsentativ aus $n=3$ Experimenten.

Weitergehend wurde untersucht, ob sich bei einer längeren, 24-stündigen Kultivierung in Medium mit einem pH_e von 8,5 im Vergleich zu 7,4 und unter gleichzeitiger Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin-Behandlung signifikante Unterschiede im Ca^{2+} -Einstrom in den TRPV6-Zellmodellen ergeben.

Die CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen wurden in die Ibidi-Durchflusskammern ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Zeitgleich wurde das Medium gegen einen Puffer (110mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂, 10mM

NaOAc, 2mM NaH₂PO₄, 20mM HEPES (Lambers *et al.*, 2007)) mit pH 7,4 bzw. 8,5 ausgetauscht. Ein pH-Wert von 6,0 wurde nicht verwendet, da die Zellen eine 24-stündige Kultivierung in Medium mit einem pH-Wert von 6,0 nicht überlebten. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen zunächst 25min lang mit Fluo-8 in Ca²⁺-freiem Puffer (pH 7,4) beladen und anschließend 25min in Ca²⁺-freiem Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bzw. 8,5 sowie 100nM Thapsigargin inkubiert. Für die Messung des hTRPV6-vermittelten Ca²⁺-Einstroms in Abhängigkeit des pH_e wurde die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration auf 2mM erhöht, wobei in den 2mM Ca²⁺-Pufferlösungen entsprechend ein pH-Wert von 7,4 bzw. 8,5 eingestellt wurde.

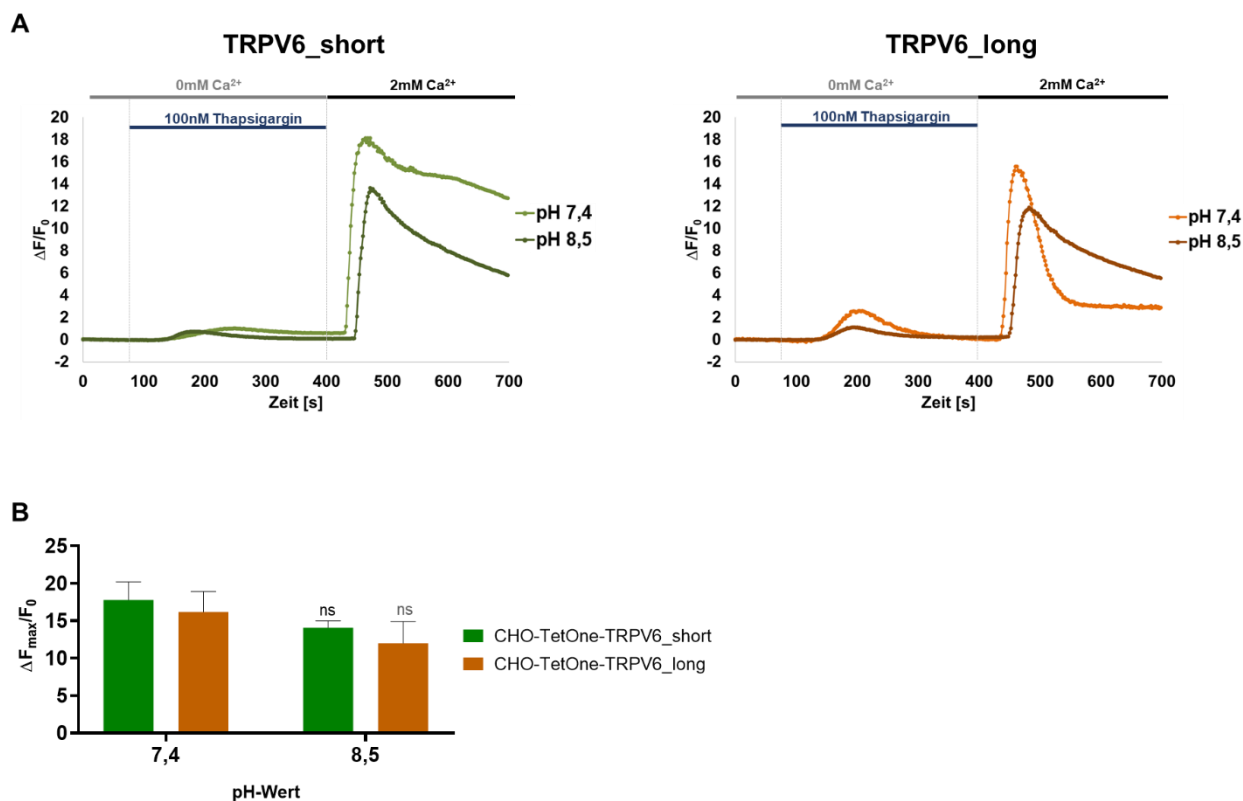


Abbildung 45: TRPV6-vermittelter Ca²⁺-Einstrom in Abhängigkeit von pH_e und Thapsigargin-Behandlung. Zellen mit Doxzyklin-induzierter Expression der hTRPV6-Isoformen wurden über einen Zeitraum von 24h mit pH_e 7,4 und 8,5 kultiviert sowie mit 100nM Thapsigargin behandelt und anschließend die Änderung der [Ca²⁺]_i mittels Calcium-Imaging ermittelt. A) Änderung der Fluo-8-Intensität im Verlauf der Calcium-Messung. B) Ermittelte ΔF_{max}/F₀-Werte. Die Signifikanzwerte wurden für den Vergleich mit dem physiologischen pH-Wert (pH 7,4) berechnet. ns = nicht signifikant. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3 Experimenten.

Die Messungen zeigten, dass bei Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes von 7,4 auf 8,5 und unter gleichzeitiger Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher der resultierende, durch TRPV6-vermittelten Ca²⁺-Einstrom in beiden hTRPV6 nur geringfügig verändert war (ΔF_{max}/F₀-Werte; Abbildung 45). Allerdings sind die Kurvenverläufe der Fluo-8 Messungen von Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform im Vergleich zur Expression der langen hTRPV6-Isoform deutlich unterschiedlich. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform fällt bei einem pH_e von 7,4 und Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher die Fluo-8-Intensität schneller ab als in

Zellen mit Expression der kurzen TRPV6-Isoform. Dies weist auf eine effektivere Beeinflussung der Aktivität der langen Isoform der hTRPV6-Ionenkanäle durch „Store-operated“ Ca²⁺-Ionenkanäle hin als bei der kurzen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals.

3.5 Analyse hTRPV6-mCherry positiver, intrazellulärer Vesikel

Ionenkanäle der TRP-Superfamilie stellen zelluläre Sensoren mit einer großen Bandbreite für physikalische und chemische Stimuli dar. Der durch TRP-Ionenkanäle vermittelte Ionenstrom wird durch die jeweilige Kanal-Leitfähigkeit, den Anteil an aktivierten Kanälen sowie der Gesamtmenge von Ionenkanälen in der Plasmamembran bestimmt. Die Aktivierung der Ionenkanäle bzw. die durch die einströmenden Ionen gekoppelten, zellulären Funktionen werden über den Transport der Ionenkanal-Proteine zur Membran oder zu intrazellulären Kompartimenten sowie über die räumlich-zeitliche Verteilung der Ionenkanäle genau reguliert. Für verschiedene Mitglieder der TRP-Familie, beispielsweise für TRPC, TRPV, TRPM und TRPA Ionenkanäle, wurde ein regulierter, vesikulärer Transport der Kanäle mittels Exo- und Endozytose beschrieben, wodurch die Anzahl von Ionenkanälen an der Plasmamembran kontrolliert wird (Hoenderop & Bindels, 2008).

In diesem Zusammenhang nehmen die TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle eine besondere Position ein, da beide Kanaltypen konstitutiv aktiv sind und eine hohe Ca²⁺-Selektivität aufweisen. Für den TRPV5-Ionenkanal wurde bereits sowohl eine Dynamin-vermittelte als auch eine Clathrin-vermittelte Endozytose gezeigt (de Groot *et al.* 2011; van de Graaf *et al.* 2006 a). Darüber hinaus wurde für die TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle eine direkte Interaktion mit der kleinen GTPase Rab11 beschrieben. Rab11 ist u.a. in der Regulation des Transports von verschiedenen Molekülen mittels Recycling-Endosomen an die Zelloberfläche involviert. Die Akkumulation von TRPV5 und TRPV6 in Endosomen könnte einen zellulären Mechanismus darstellen, über den die Zelle die Expression der beiden Kanaltypen an der Zelloberfläche reguliert. Weiterhin könnte eine Kontrolle der Anzahl von TRPV5- und TRPV6-Ionenkanälen und damit deren Aktivität auch auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgen (Abe & Puertollano, 2011).

Bisher ist relativ wenig über den Vesikeltransport des TRPV6-Kanals bekannt. In Kapitel 3.3.2 wurde mittels der durchgeführten Lokalisationsstudien gezeigt, dass die TRPV6-mCherry Fusionsproteine hauptsächlich in intrazellulären, vesikulären Strukturen lokalisiert waren, die nachfolgend als hTRPV6-positive Vesikel bzw. hTRPV6-enthaltende Vesikel bezeichnet werden. In den TRPV6-Zelllinien wurde neben der Lokalisationsanalyse TRPV6-positiver Vesikel der

Einfluss einer Veränderung von intra- und extrazellulären Faktoren auf die Anzahl, Größe und Lokalisation der TRPV6-positiven Vesikel analysiert.

3.5.1 Lokalisationsanalyse der Isoformen des hTRPV6-mCherry-Ionenkanals mittels endosomaler Markerproteine

Unter Nutzung der endosomalen Markerproteine Rab5, Rab7 und Rab11 wurden vergleichende Kolokalisationsanalysen mit den beiden hTRPV6-Isoformen durchgeführt. Damit sollte geprüft werden, ob die lange hTRPV6-Isoform im Vergleich zur kurzen Isoform eine unterschiedliche Assoziation mit endosomalen Vesikeln zeigt. Rab5 ist ein Marker endozytotischer Vesikel und früher Endosomen, welche nach der Vesikelbildung an der Zellmembran für eine Sortierung der jeweils beförderten Proteine sorgen. Von hier werden die Proteine entweder in Recycling-Endosome oder weiter über späte Endosome zum Abbau in Lysosomen befördert. Rab7 ist ein Marker für späte Endosomen und reguliert den endolysosomalen Vesikeltransport, während Rab11 Recycling-Endosomen markiert. Nach der Sortierung in frühe Endosomen können Membranproteine durch Recycling-Endosomen wieder an die Zellmembran transportiert werden.

Um die Kolokalisation der kurzen sowie langen TRPV6-Isoformen mit den endosomalen Markerproteinen Rab5, Rab7 und Rab11 zu untersuchen, wurden 150.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen auf sterile Deckgläschen ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen wie in Kapitel 2.4.9 beschrieben fixiert, permeabilisiert, mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und anschließend in Mowiol eingedeckt. Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen Rab5, Rab7 bzw. Rab11 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden entsprechende Alexa Fluor® 488-Antikörper verwendet. Anschließend wurden konfokale Aufnahmen der Proben mit einem 20xObjektiv angefertigt. Anhand der Resultate wurde die Lokalisation der TRPV6-mCherry-Proteine und der eingesetzten Alexa Fluor® 488-gefärbten Rab-Proteine visuell sowie mit Hilfe des Fiji-Plugin Coloc2 analysiert. Die Kolokalisation wurde in Form des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Rab5-positiven Vesikel in der Zelle zytoplasmatisch verteilt waren, mit einer erhöhten Lokalisation um den Zellkern (Abbildung 46 A). Dies könnte auf eine verstärkte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im Trans-Golgi-Netzwerk hinweisen. Insbesondere in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform konnte eine stärkere Lokalisation der Rab5-Proteine im perinukleären Bereich detektiert werden. Eine

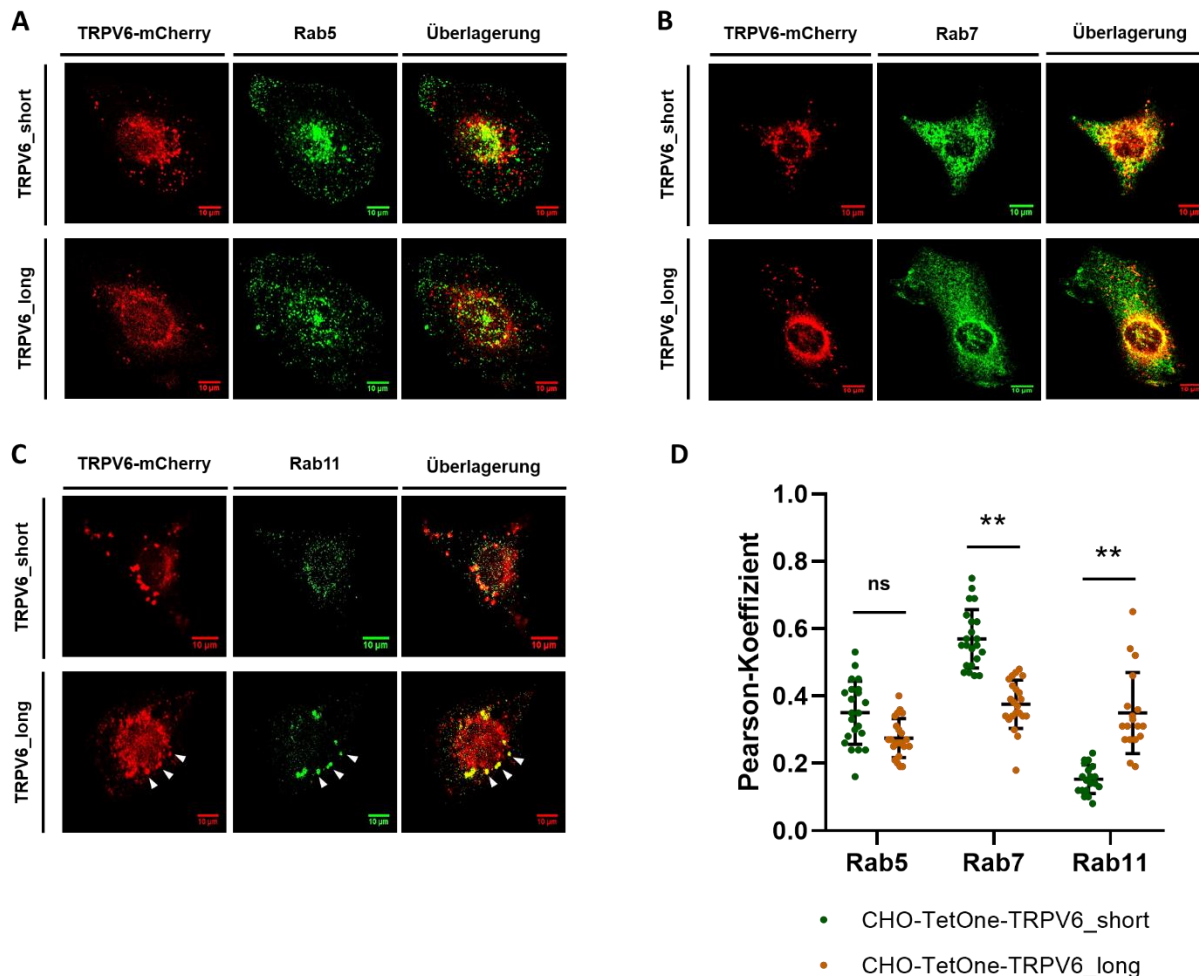


Abbildung 46: Kolokalisationsanalyse der kurzen und langen TRPV6-Isoformen mit endosomalen Markerproteinen. Nach Aussaat und Doxyzyklin-Induktion (24h, 100 ng/ml) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Alexa Fluor® 488-markierten Zweitantikörper. Nach dem Eindecken in Mowiol wurden Fluoreszenzaufnahmen mithilfe eines konfokalen Mikroskops angefertigt. Einzelfärbungen sowie zusammengesetzte Bilder sind gezeigt für A) TRPV6_short/long und Rab5, B) TRPV6_short/long und Rab7 sowie C) TRPV6_short/long und Rab11. D) Pearson-Koeffizient der Kolokalisationsanalyse von CHO-TetOne-TRPV6_short/long mit Rab5, Rab7 und Rab11. Die Signifikanzen wurden jeweils zwischen TRPV6_short- und TRPV6_long-exprimierenden Zellen berechnet. ** $P < 0,01$, ns = nicht signifikant.

spezifische Anreicherung der hTRPV6-Fusionsproteine in frühen Endosomen, die durch Rab5-Alexa Fluor® 488-Färbung markiert wurden, konnte dagegen weder bei der kurzen noch bei der langen hTRPV6-Isoform nachgewiesen werden. Dies bestätigten auch die berechneten Pearson-Korrelationswerte von $0,35 \pm 0,09$ (TRPV6_short) und $0,24 \pm 0,03$ (TRPV6_long). Auch für die Rab7-positiven Vesikel wurde eine gleichmäßige Verteilung im Zytosol detektiert (Abbildung 46 B). Auf Grundlage der Mikroskopie-Bilder könnte eine Kolokalisation zwischen der kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoform und Rab7 vorliegen. Die kurze hTRPV6-Isoform wies dabei bei rein visueller Betrachtung im Vergleich zur langen hTRPV6-Isoform eine stärkere Kolokalisation mit Rab7 auf. Dies bestätigten auch die berechneten, signifikant unterschiedlichen

Pearson-Korrelationswerte von $0,57 \pm 0,09$ (TRPV6_short) und $0,38 \pm 0,07$ (TRPV6_long). Bei der Rab11-Färbung war zu erkennen, dass die Rab11-Proteine in vesikulären Strukturen im Cytoplasma verteilt waren (Abbildung 46 C). Im Falle der kurzen hTRPV6-Isoform konnte bei rein visueller Betrachtung sowie mittels Analyse der Pearson-Korrelation ($0,15 \pm 0,04$) keine Kolokalisation beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte eine Kolokalisation vor allem von Rab11-Proteinen mit den großen Vesikeln, die in den Zellen mit Expression der langen TRPV6-Isoformen detektiert wurden, gezeigt werden (Pearson-Korrelationswerte $0,35 \pm 0,12$). Da die Rab11-Vesikel für den gesamten Recycling-Transport der Zelle zuständig sind und die Menge an TRPV6 enthaltenden Vesikeln dabei wahrscheinlich nur einen sehr geringen Anteil darstellt, wurde eine vollständige Kolokalisation nicht erwartet. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der Endosomentransport ein sehr dynamischer Prozess ist, weshalb kurzzeitige Kolokalisationen durch eine Momentaufnahme nur sehr begrenzt nachgewiesen werden können.

Zusammenfassend konnte anhand der Resultate gezeigt werden, dass sowohl die kurze als auch die lange hTRPV6-Isoform mit endosomalen Markerproteinen kolokalisierten. Allerdings unterschieden sich die beiden hTRPV6-Isoformen dahingehend, dass die kurze hTRPV6-Isoform verstärkt mit dem endolysosomalen Marker Rab7 kolokalisierte, während die lange hTRPV6-Isoform eine stärkere Kolokalisation mit Rab11, einem Marker für Recycling-Endosomen bzw. Exozytose, aufwies.

3.5.2 Vergleichende Analyse der Größe, Anzahl und Lokalisation der TRPV6-mCherry-positiven Vesikel

In einer vergleichenden Vesikelanalyse wurde geprüft, ob sich Unterschiede bei der Form, Größe oder Verteilung der Vesikel in Abhängigkeit von der Überexpression der kurzen oder der langen hTRPV6-Isoform in den Zellmodellen ergeben. Dazu wurden 50.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h mit 10, 100 bzw. 1000ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurde die Lokalisation der rekombinanten hTRPV6-mCherry-Proteine fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden weiterhin hinsichtlich folgender Parameter vergleichend analysiert: (i) Vesikelanzahl, (ii) Vesikelgröße, (iii) Abstand der Vesikel zum Zellkern, welcher als Maß für die Lokalisation der Vesikel diente, sowie (iv) mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel. Dabei wurden die genannten vier Parameter in Abhängigkeit der ansteigenden Doxyzyklin-Konzentrationen und damit ansteigender Expressionshöhe der kurzen sowie langen TRPV6-Isoform betrachtet.

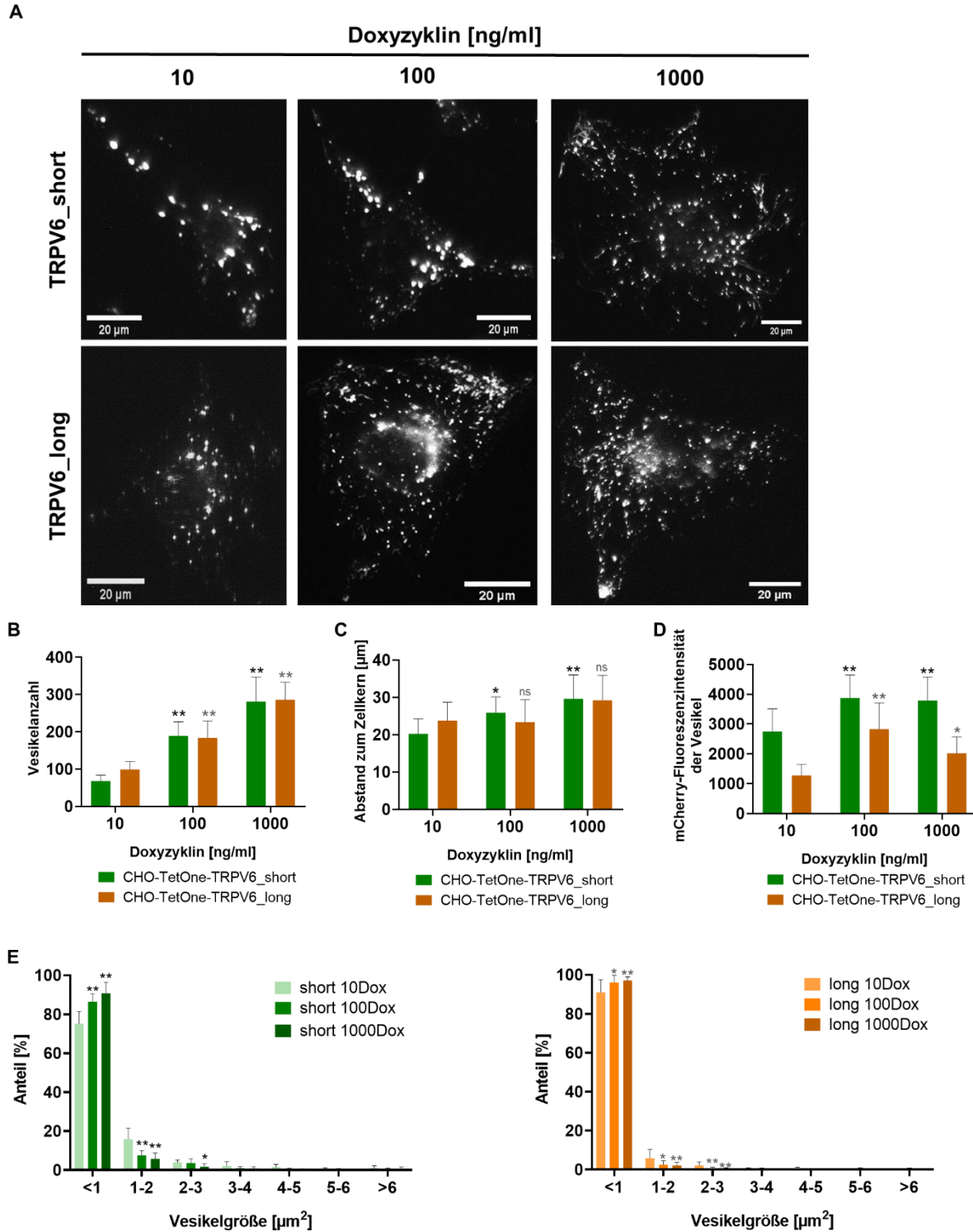


Abbildung 47: Analyse der TRPV6-mCherry-positiven Vesikel in Abhängigkeit der Doxyzyklin-Konzentration. Die hTRPV6 Zellen wurden mit aufsteigenden Doxyzyklin-Konzentrationen von 10ng/ml, 100ng/ml und 1000ng/ml zur Induktion der kurzen bzw. langen hTRPV6-mCherry Isoformen behandelt. Nach 24h wurden die Vesikel in den Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. A) Exemplarische Bilder der TRPV6-Vesikel. Einfluss der Induktion mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen auf die Vesikelanzahl (B), den Abstand der Vesikel zum Zellkern (C), die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel (D) sowie die Vesikelgröße (E) in den Zellen mit Expression der jeweiligen TRPV6-Isoform. Die Signifikanzwerte wurden jeweils in Bezug auf die 10ng/ml Doxyzyklin-Induktion berechnet. *P<0,05, **P<0,01, ns = nicht signifikant.

In Abhängigkeit zunehmender Doxyzyklin-Konzentrationen konnte ab 100ng/ml Doxyzyklin in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform signifikant ein Anstieg der Vesikelanzahl, eine Vergrößerung des Abstandes der Vesikel zum Zellkern, d.h. eine Lokalisation an der Peripherie, sowie eine stärkere mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel festgestellt werden. Weiterhin veränderte sich die Größenverteilung der Vesikel bei einer Doxyzyklin-Konzentration von 100ng/ml und 1000ng/ml im Vergleich zu der niedrigeren Doxyzyklin-Konzentration (10ng/ml). Die Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform zeigten einen signifikant steigenden Anteil von Vesikeln mit einer Größe $<1\mu\text{m}^2$, während der Anteil von Vesikeln mit einer Größe von $>1\mu\text{m}^2$ verringert war.

Vergleichend konnte auch in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform ein signifikanter Anstieg der Vesikelanzahl und der mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel sowie eine veränderte Größenverteilung der Vesikel bei zunehmender Doxyzyklin-Konzentration festgestellt werden. Die gemessene mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform war allerdings durchschnittlich 1,8-fach höher als in Vesikeln von Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform. Bei der Lokalisationsanalyse war in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform der Abstand der Vesikel zum Zellkern bei ansteigender Doxyzyklin-Konzentration nicht signifikant verändert, d.h. die Vesikel veränderten ihre Lokalisation nicht messbar. Mit zunehmender Doxyzyklin-Konzentration stieg auch in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform der Anteil an Vesikeln mit einer Größe $<1\mu\text{m}^2$, während der Anteil größerer Vesikel abnahm.

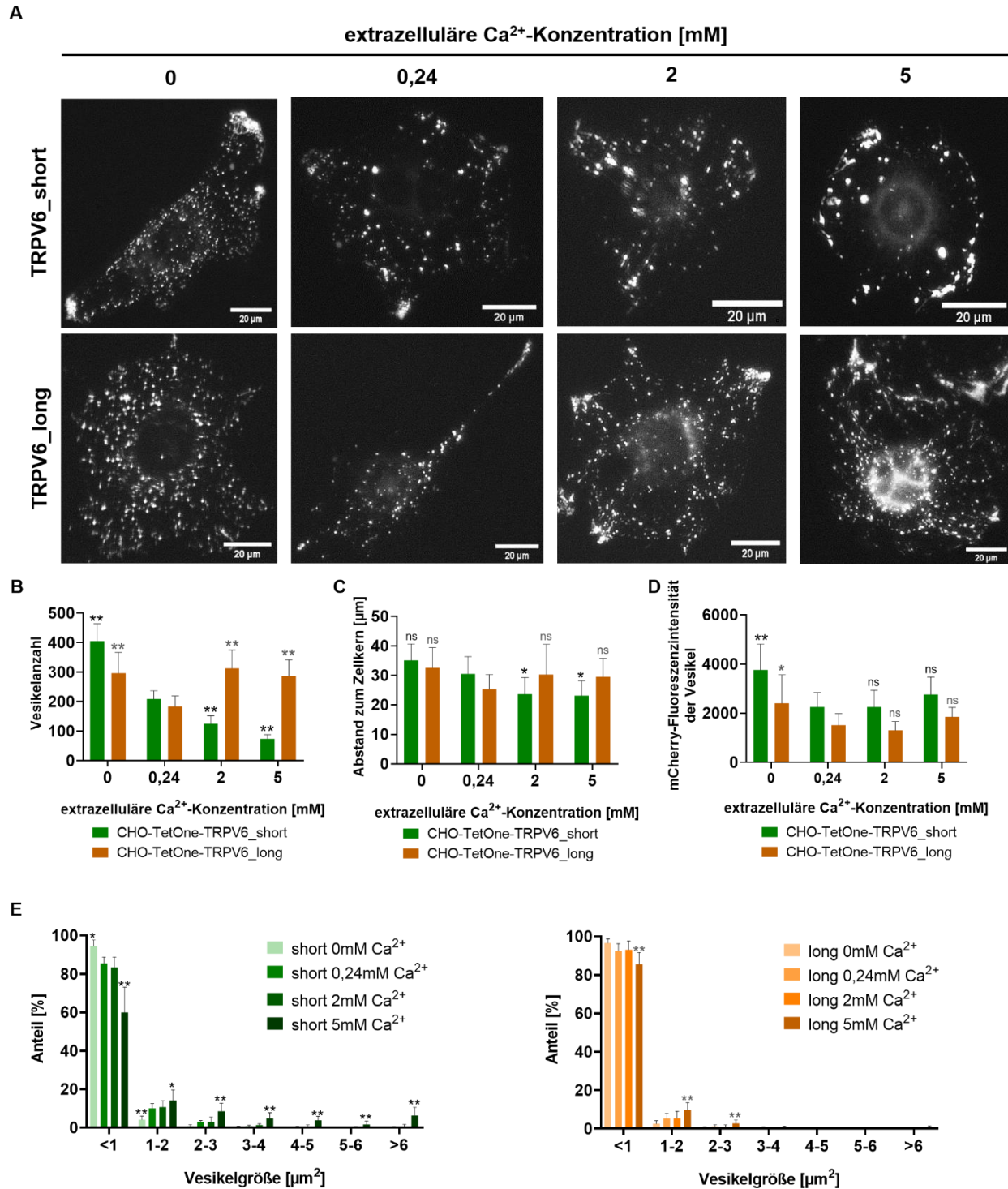
Im Vergleich zwischen der Überexpression der kurzen versus der langen hTRPV6-Isoform konnte nur bei der Größenverteilung der Vesikel sowie bei der mCherry-Fluoreszenzintensität ein Unterschied festgestellt werden. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform wurden durchschnittlich kleinere Vesikel detektiert, die im Vergleich zu Vesikeln in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform eine 1,8-fach niedrigere mCherry-Fluoreszenzintensität aufwiesen. Die Zunahme der Vesikelanzahl und Unterschiede in der Vesikelverteilung könnte aufgrund der Überexpression der hTRPV6-Isoformen resultieren, wie bereits für andere TRP-Überexpressionsmodelle beschrieben wurde (Abe & Puertollano, 2011). Insgesamt könnten die Ergebnisse aber auch als Hinweis bewertet werden, dass, ähnlich wie für den TRPV5-Ionenkanal gezeigt (van de Graaf *et al.*, 2008), auch der Transport der hTRPV6-Proteine hochdynamisch mittels endozytotischer Mechanismen erfolgt und die beiden hTRPV6-Isoformen jeweils unterschiedlichen Transportmechanismen unterliegen.

3.5.3 Einfluss der $[Ca^{2+}]_e$ auf TRPV6-mCherry-positive Vesikel

Die Regulation der für die transzelluläre Ca^{2+} -Absorption wichtigen, Ca^{2+} -selektiven TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle erfolgt auf verschiedenen Ebenen der Transkription und Translation sowie der Assemblierung und des Transportes der Ionenkanäle an die Plasmamembran. In diesem Kontext wurde der Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf TRPV6-enthaltende, intrazelluläre Vesikel in den TRPV6-Zellmodellen vergleichend zwischen kurzer und langer hTRPV6-Isoform untersucht. Dazu wurden 50.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Gleichzeitig wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$) durch die Zugabe einer 0,2M Calciumchlorid-Lösung von 0,24mM auf 2mM bzw. 5mM erhöht sowie eine Ca^{2+} -freie Umgebung durch Zugabe von EGTA in dem Medium erzeugt. Nach 24h Inkubation wurde die Lokalisation der TRPV6-mCherry-Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden dabei hinsichtlich folgender Parameter analysiert: (i) Vesikelanzahl, (ii) Vesikelgröße, (iii) Abstand der Vesikel zum Zellkern, welcher als Maß für die Lokalisation der Vesikel dient sowie (iv) mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel (Abbildung 48).

In Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform führte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_e$ auf 5mM zu einer starken Abnahme der Vesikelanzahl (Abbildung 48 A). Weiterhin konnte unter diesen Bedingungen eine Veränderung in der Größenverteilung der Vesikel festgestellt werden. Mit ansteigender $[Ca^{2+}]_e$ nahm der Anteil von Vesikeln mit einer Größe von $<1\mu m^2$ ab und der Anteil größerer Vesikel mit einer Größe von $1\mu m^2$ bis $>6\mu m^2$ nahm zu (Abbildung 48 E). Da die Anzahl der detektierten, kleinen Vesikel bei steigender $[Ca^{2+}]_e$ sinkt, könnten die größeren Vesikel möglicherweise späte Endosomen (multivesicular bodies, MVB) und / oder die Fusion mit Lysosomen darstellen. Die Lokalisation der hTRPV6-enthaltenden Vesikel war in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform nur bei einer $[Ca^{2+}]_e$ von 2mM und 5mM verändert. Unter diesen Bedingungen war der Abstand zum Zellkern leicht erniedrigt. Die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel veränderte sich bei ansteigender $[Ca^{2+}]_e$ nicht signifikant, war aber bei Ca^{2+} -freien Bedingungen am höchsten (Abbildung 48 D). Im Gegensatz zu diesen Resultaten war die Vesikelanzahl in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform in Ca^{2+} -freiem Medium sowie bei einer $[Ca^{2+}]_e$ von 2mM und 5mM im Vergleich zu der Ca^{2+} -Konzentration im Normalmedium (0,24 mM) signifikant bei allen drei Bedingungen erhöht (Abbildung 48 B). Ein signifikanter Einfluss auf die Größenverteilung der Vesikel war nur bei der höchsten $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM zu detektieren. Der Anteil von Vesikeln mit einer Größe $<1\mu m^2$ nahm ab und eine leichte Zunahme von Vesikeln mit einer Größe zwischen $1\mu m^2$ und $3\mu m^2$ war messbar. Die mCherry-Fluoreszenzintensität der langen hTRPV6-Isoform enthaltenden Vesikeln war nur bei Ca^{2+} -freien

Bedingungen signifikant gegenüber der im Normalmedium eingestellten $[Ca^{2+}]_i$ von 0,24mM erhöht. Auch die Lokalisation der Vesikel war in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform bei ansteigenden, extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen nicht verändert. Allerdings war bei zunehmender $[Ca^{2+}]_e$ eine stärkere mCherry-Fluoreszenzintensität des hTRPV6-mCherry Fusionsproteins im Bereich des Zellkerns zu detektieren. Zusammenfassend ergaben sich bei der Einstellung verschiedener extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen deutliche Unterschiede zwischen den beiden hTRPV6-Zellmodellen hinsichtlich der Anzahl und Größe sowie Verteilung der Vesikel im Cytoplasma, die auf eine unterschiedliche Regulierung des Transportes von hTRPV6-mCherry enthaltenden Vesikeln hinweisen könnten. Die Resultate aus dem Ca^{2+} -Imaging (Kapitel 3.4) hatten unter gleichen experimentellen Bedingungen gezeigt, dass in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform eine 6-fache Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms bei $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM im Vergleich zu $[Ca^{2+}]_e$ von 0,24mM zu verzeichnen war. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform wurde dagegen eine 24-fache Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms bei $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM im Vergleich zu $[Ca^{2+}]_e$ von 0,24mM gemessen. Bei gleicher $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM wurden in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform aber viel mehr hTRPV6-mCherry-positive Vesikel detektiert als in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform. Setzt man die Resultate des Calcium-Imaging mit denen der Vesikelanalyse in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_e$ in Kontext, könnte dies bedeuten, dass die Zellen entweder die Überexpression der kurzen versus langen Isoform der hTRPV6-Ionenkanäle generell unterschiedlich über den Vesikeltransport regulieren oder dass die lange TRPV6-Isoform möglicherweise aufgrund der N-terminalen Sequenz einem anderen Sortierungsprozess im Vesikeltransport unterliegt.



3.5.4 Einfluss einer Thapsigargin-vermittelten Ca²⁺-Speicherentleerung auf TRPV6-mCherry enthaltende Vesikel

In der Regulation der Ca²⁺-Homöostase stellt die Kompartimentierung von Ca²⁺ in verschiedene, als Ca²⁺-Speicher dienende, zytoplasmatische Organellen einen essentiellen Aspekt dar. Die Freisetzung von Ca²⁺ aus den großvolumigen Ca²⁺-Speichern des Endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns, des Golgi-Apparates sowie der Mitochondrien dient der Regulierung der Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu haben die kleinvolumigen Ca²⁺-Speicher der intrazellulären Vesikel, wie Lysosomen, Endosomen und sekretorische Granula, möglicherweise eine wichtigere Bedeutung in einer lokalen Ca²⁺-Freisetzung und damit gekoppelten Funktionen, wie beispielsweise lokale Prozesse des Membrantransports oder spezifische Vesikelbewegungen in der Zelle. In diesem Zusammenhang können intrazelluläre Vesikel auch als sekundäre Ca²⁺-Speicher in Zellen betrachtet werden. Über die Translokation der TRPV6-Proteine an die Plasmamembran können Zellen den TRPV6-vermittelten Ca²⁺-Einstrom regulieren. Die TRPV6-Translokation ist u.a. von Proteinen des SOCE-Prozesses beeinflusst (STIM1, Orai1, TPRC1). In der Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP konnte nach Entleerung der Ca²⁺-Speicher des ER durch Behandlung der Zellen mit Thapsigargin die Translokation von TRPV6-Proteinen an die Plasmamembran gezeigt werden (Raphaël *et al.*, 2014).

Um zu untersuchen, ob die hTRPV6-mCherry-positiven Vesikel in den Zellmodellen mit TRPV6 Überexpression analog zu den Prostatakrebs-Zelllinien durch eine Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher beeinflusst werden, wurden die hTRPV6 Zellen mit aufsteigenden Thapsigargin-Konzentrationen von 1nM bis 1000 nM behandelt. Weiterhin wurde vergleichend analysiert, ob bei Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher Unterschiede in der Anzahl, Größe, Lokalisation und mCherry-Fluoreszenz zwischen Vesikeln mit enthaltender kurzer hTRPV6-Isoform versus langer hTRPV6-Isoform zu detektieren waren.

Für die Analyse wurden 50.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit 100ng/ml Doxyzyklin sowie ansteigenden Thapsigargin-Konzentrationen von 1nM, 10nM, 100nM bzw. 1000nM behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen eingesetzt, die nicht mit Thapsigargin behandelt wurden. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Lokalisation der TRPV6-mCherry-Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden dabei hinsichtlich folgender Parameter analysiert: (i) Vesikelanzahl, (ii) Vesikelgröße, (iii) Abstand der Vesikel zum Zellkern, welcher als Maß für die Lokalisation der Vesikel dient sowie (iv) mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel.

In Zellen mit Überexpression der kurzen hTRPV6-Isoform bewirkten Thapsigargin-Konzentrationen von 10nM, 100nM und 1000nM eine signifikante Reduktion der Vesikelanzahl. Der Hauptanteil der hTRPV6-enthaltenden Vesikel hatte eine Größe von $<1\mu\text{m}^2$. Mit ansteigenden Thapsigargin-Konzentrationen konnten darüber hinaus auch mehr Vesikel mit Größen $>1\mu\text{m}^2$ detektiert werden (Abbildung 49). Die hTRPV6-enthaltenden Vesikel waren im gesamten Cytoplasma verteilt, wenn keine Thapsigargin-Behandlung vorlag, sowie auch, wenn Thapsigargin-Konzentrationen von 1nM bzw. 10nM eingesetzt wurden. Erst bei einer Thapsigargin-Konzentration von 100nM und 1000nM war der Abstand der hTRPV6-enthaltenden Vesikel zum Zellkern signifikant verringert. Auffallend war, dass bei diesen Bedingungen zusätzlich zu der mCherry-Fluoreszenz der hTRPV6-enthaltenden Vesikel eine im Cytoplasma verteilte, nicht in Vesikeln lokalisierte mCherry-Fluoreszenz sichtbar wurde und dass bei einer Konzentration von 1000nM Thapsigargin vergrößerte hTRPV6-enthaltende Vesikel um den Zellkern gruppierten. Insgesamt war die gemessene mCherry-Fluoreszenz der hTRPV6-enthaltenden Vesikel bei einer Thapsigargin-Konzentration von 10nM am höchsten.

Im Vergleich dazu war auch in Zellen mit Überexpression der langen hTRPV6-Isoform bei Thapsigargin-Konzentrationen zwischen 10nM und 1000nM die Anzahl von hTRPV6-enthaltenden Vesikeln stark erniedrigt. Bei der Größenverteilung der Vesikel, die im Hauptanteil in einer Größe von $<1\mu\text{m}^2$ vorlagen, waren zusätzlich bei einer Konzentration von 1000nM Thapsigargin TRPV6-enthaltende Vesikel mit Größen zwischen $1\mu\text{m}^2$ und $5\mu\text{m}^2$, aber auch $>6\mu\text{m}^2$ in den Zellen vorhanden. Bei der Lokalisation der Vesikel mit enthaltenden langen TRPV6-Isoformen konnte keine signifikante Veränderung in Abhängigkeit der Thapsigargin-Konzentration festgestellt werden. Die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel war bei allen Thapsigargin-Konzentrationen kaum verändert. Allerdings wurde bei Thapsigargin-Konzentrationen von 100nM bzw. 1000nM auch bei der langen TRPV6-Variante eine nicht in Vesikeln lokalisierte mCherry-Fluoreszenz im Zytoplasma detektiert.

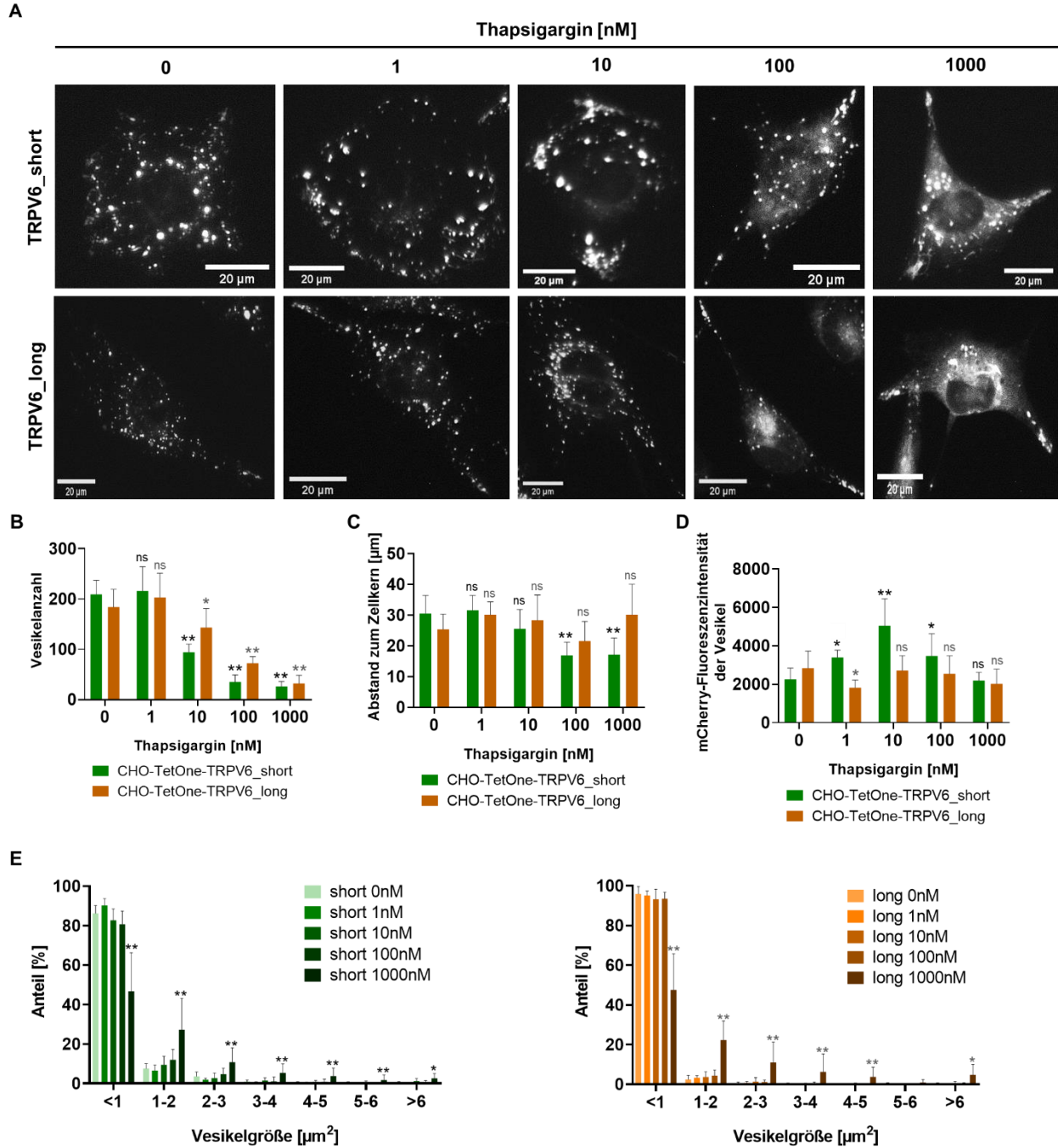


Abbildung 49: Einfluss einer Thapsigargin-vermittelten Ca^{2+} -Speicherentleerung auf die TRPV6-enhaltenden Vesikel. Die mit Doxozyklin induzierten hTRPV6 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24h mit unterschiedlichen Thapsigarginkonzentrationen von 0nM bis 1000nM behandelt, um die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu entleeren. Anschließend wurden die Vesikel in den TRPV6 Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Exemplarische Bilder der TRPV6-Vesikel. Einfluss der Thapsigargin-vermittelten Ca^{2+} -Speicherentleerung auf die Vesikelanzahl (B), den Abstand der Vesikel zum Zellkern (C), die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel (D) sowie die Vesikelgröße (E). Die Signifikanzen wurden jeweils in Bezug zur Kontrolle (0nM Thapsigargin) berechnet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ns = nicht signifikant.

Insgesamt zeigten die Resultate, dass der größte messbare Effekt, der durch die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des ER verursacht wurde, die Reduktion der hTRPV6-enthaltenden Vesikel mit einer Größe $<1\mu\text{m}^2$ sowie die Bildung größerer Vesikel bis zu $>6\mu\text{m}^2$ war. Dies konnte in beiden hTRPV6-Zellmodellen mit Expression der kurzen als auch der langen hTRPV6-Isoform festgestellt werden. In den Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform war eine ansteigende, in Vesikeln gebundene mCherry-Fluoreszenzintensität bis zu einer Thapsigargin-Konzentration von 10nM messbar, die dann bei höheren Thapsigargin-Konzentrationen wieder abfiel. Dieser Effekt konnte in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform nicht detektiert werden. Eine vermehrte Lokalisation hTRPV6-enthaltender Vesikel zur Peripherie der Zellen unter Thapsigargin-Behandlung als möglichen Hinweis für eine Translokation der hTRPV6-Proteine zur Zellmembran konnte in dieser Analyse nicht gezeigt werden.

3.5.5 Einfluss des pH_e auf die hTRPV6-mCherry-positiven Vesikel

Zelluläre Prozesse wie Endo- und Exocytose werden durch den extrazellulären pH-Wert (pH_e) beeinflusst. Damit einhergehend wurde für die Ionenkanäle TRPV5 und TRPV6 gezeigt, dass der intrazelluläre Transport als auch die Insertion funktioneller Ionenkanäle in die Plasmamembran vom extrazellulären pH-Wert abhängig ist. Beispielsweise wurde für TRPV5-positive Vesikel bei extrazellulären, alkalischen pH-Werten eine verstärkte Rekrutierung an die Plasmamembran nachgewiesen, was insgesamt zu einem erhöhten TRPV5-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen führte. Bei aziden pH-Werten wurden im Gegensatz dazu verstärkt TRPV5-positive Vesikel aus der Membran entfernt, wodurch eine Verringerung des TRPV5-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms resultierte (Lambers *et al.*, 2007). Weiterhin wurde in Jurkat T Zellen die Beeinflussung der TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle von aziden extrazellulären pH-Wert beschrieben, die mit einer Verringerung des durch die Ionenkanäle vermittelten Ca^{2+} -Einstroms einherging (Tomilin *et al.*, 2016).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob vergleichbar zu den beschriebenen TRPV5-Daten auch in den TRPV6-Zellmodellen ein Einfluss auf die hTRPV6-mCherry-enthaltenden Vesikel durch einen extrazellulären, alkalischen pH-Wert nachzuweisen ist. Weiterhin wurde vergleichend analysiert, ob sich unterschiedliche Effekte des extrazellulären pH-Wertes auf die Vesikel mit den kurzen versus langen hTRPV6-Isoformen ergaben.

Für die Analyse wurden 50.000 CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 bzw. CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurde das Medium gegen einen Puffer (110mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM MgCl_2 , 0,1mM CaCl_2 , 10mM NaOAc, 2mM NaH_2PO_4 , 20mM HEPES

(Lambers *et al.*, 2007)) mit pH 7,4 bzw. 8,5 ausgetauscht und die Zellen mit 100ng/ml Doxozyklin behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde die Lokalisation der TRPV6-mCherry-Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden dabei hinsichtlich folgender Parameter analysiert: (i) Vesikelanzahl, (ii) Vesikelgröße, (iii) Abstand der Vesikel zum Zellkern, welcher als Maß für die Lokalisation der Vesikel dient sowie (iv) mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel.

Bei einem pH_e von 7,4 bzw. 8,5 konnten deutliche Einflüsse auf die Größe sowie die Verteilung der hTRPV6-Vesikel nachgewiesen werden (Abbildung 50). Eine verstärkte Lokalisation der Vesikel an der Plasmamembran konnte unter diesen experimentellen Bedingungen dagegen nicht detektiert werden. Sowohl die Zellen mit Expression der kurzen als auch der langen hTRPV6-Isoform zeigten im Vergleich zu einem pH-Wert von 7,4 eine deutliche Abnahme der Vesikelanzahl. Die Anzahl der Vesikel mit der kurzen hTRPV6-Isoform war um das 4,6-fache und die der Vesikel mit der langen hTRPV6-Isoform um das 2,4-fache erniedrigt. Zusätzlich zur Verringerung der Vesikelanzahl war bei einem extrazellulären pH-Wert von 8,5 eine deutliche Erhöhung des Anteils von Vesikeln mit einer Größe von >1µm² zu verzeichnen. Die stark vergrößerten Vesikel füllten unter diesen Bedingungen das gesamte Cytoplasma aus. Bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 wurden keine Vesikel in dieser Größenverteilung und Lokalisation gebildet. Wenn die hTRPV6-Proteine aus diesen Vesikeln nicht mehr an die Plasmamembran transportiert werden, könnten bei einem extrazellulärem pH-Wert von 8,5 weniger funktionelle hTRPV6-Ionenkanäle in der Zellmembran inseriert sein. Die Resultate des durchgeführten Ca²⁺-Imaging in den hTRPV6-Zellmodellen unterstützen diese Hypothese (Abbildung 45). Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform, die für 24h in Medium mit einem pH-Wert von 8,5 kultiviert wurden, wiesen ein 1,3-fach (TRPV6_short) bzw. 1,4-fach (TRPV6_long) niedrigeres maximales Fluo-8-Signal im Vergleich zu Zellen auf, die in Medium mit einem pH-Wert von 7,4 kultiviert wurden.

Die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel sank zwar leicht mit einem Anstieg des extrazellulären pH-Wertes von 7,4 auf 8,5, allerdings war diese geringe Erniedrigung nur bei den Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform signifikant. Somit war der Einfluss des extrazellulären pH-Wertes bei 7,4 und 8,5 hinsichtlich der Beladung der Vesikel mit den kurzen bzw. langen hTRPV6-Isoformen nur geringfügig. Im Gegensatz zu den Analysen einer erhöhten Translokation von TRPV5-Ionenkanälen bei alkalischen extrazellulären pH-Werten konnte in den vorliegenden Resultaten weder eine verstärkte Lokalisation der hTRPV6-mCherry-enthaltenden Vesikel an der Plasmamembran nachgewiesen werden, noch war der hTRPV6-vermittelte Ca²⁺-Einstrom erhöht.

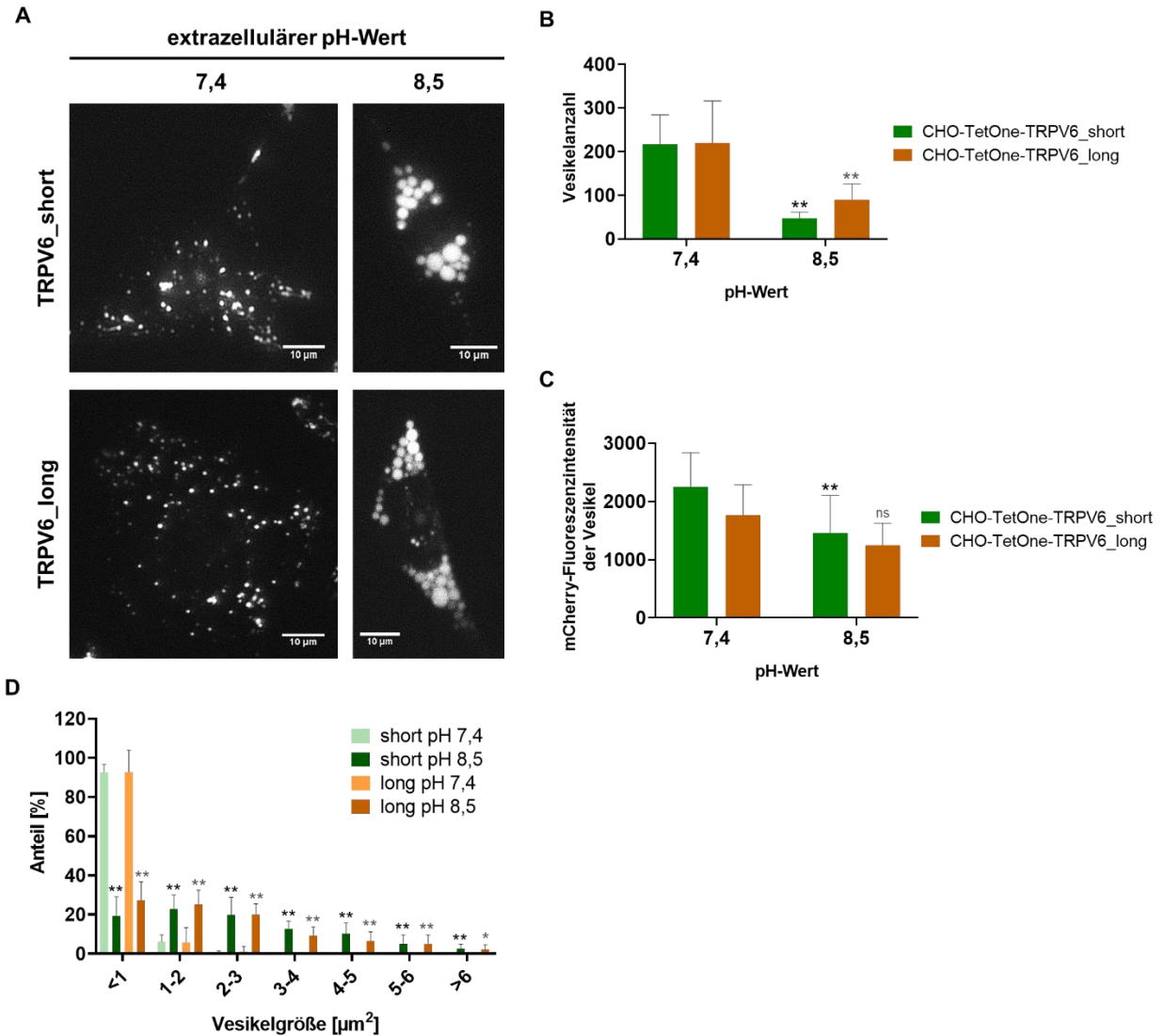


Abbildung 50: Einfluss einer 24-stündigen Kultivierung in Medien mit unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten auf die Vesikelanzahl, -größe sowie mCherry-Fluoreszenzintensität. Die mit Doxyzyklin induzierten TRPV6-Zellen wurden für 24h bei pH_e von 7,4 bzw. 8,5 kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. A) Exemplarische Bilder der TRPV6-Vesikel. Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf die Vesikelanzahl (B), die mCherry-Fluoreszenzintensität der Vesikel (C) sowie die Vesikelgröße (D). Die Signifikanzen wurden jeweils im Bezug zum physiologischen pH-Wert (pH 7,4) berechnet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ns = nicht signifikant.

3.6 Einfluss der hTRPV6-Überexpression hinsichtlich Migration und Invasion in den Zellmodellen

Änderungen der Aktivierung von Ionenkanälen oder ihrer Expression an der Plasmamembran beeinflussen Ca^{2+} -abhängige Signalprozesse, die für die Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielen. Gehen diese Veränderungen mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einher, resultiert dies häufig in einer gesteigerten Zellproliferation und -migration der Tumorzellen.

Für die Entwicklung der Zellmodelle mit hTRPV6-Überexpression wurden im Rahmen dieser Arbeit CHO-K1-Zellen eingesetzt, die kein Invasionspotenzial aufweisen. Um die funktionelle Bedeutung einer hTRPV6-Überexpression in den entwickelten Zellmodellen hinsichtlich einer möglichen Aktivierung tumorrelevanter Signalwege zu evaluieren, wurde daher beispielhaft die Aktivierung des NFAT-Transkriptionsfaktors mittels eines Luciferase-basierten NFAT-Reporterassay getestet. Weiterhin wurde die Zellmigration der hTRPV6-überexprimierenden Zellen in einem Migrationsassay analysiert, sowie das Invasionspotenzial der Zellen mit Überexpression der hTRPV6-Isoformen mittels Sphäroidkulturen in einem Invasionsassay bestimmt.

3.6.1 Die Überexpression von hTRPV6 in den Zellmodellen aktiviert den NFAT Signalweg

Die NFAT-Transkriptionsfaktoren regulieren zellphysiologische Prozesse wie Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese sowie Migration und Invasion (Rao *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2014). Eine Aktivierung des NFAT-Signalweges erfolgt über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und weitergehend einer Aktivierung des Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Signalweges. Dadurch wird nachfolgend die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Dies führt zur Freilegung des Kernlokalisierungssignalpeptids und somit zum Transport des NFAT in den Nukleus. Im Nukleus interagiert NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Transkription von Zielgenen, wie beispielsweise c-Myc, COX2 und cyclin D1, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebs spielen.

Um eine durch die hTRPV6-Überexpression vermittelte Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf die Aktivierung des NFAT-Signalweges zu untersuchen, wurde ein NFAT-Reporterassay, wie in Kapitel 2.4.10 beschrieben, durchgeführt. Der Assay basiert auf einem Luciferase-Reporterplasmid, das neben einem Minimalpromotor eine DNA-Bindestelle für den NFAT-Transkriptionsfaktor (NFAT

Response Element) enthält, wodurch die Aktivierung der Transkription des Reportergens Luciferase kontrolliert wird. Eine Aktivierung der NFAT-Signalkaskade führt zur Bindung des NFAT-Transkriptionsfaktors an das NFAT Response Element und somit zur Transkription des Luciferase-Enzyms. Die Höhe der NFAT-Aktivierung kann über die Höhe der enzymatischen Aktivität der Luciferase bestimmt werden.

Nach transienter Transfektion der CHO-K1-Zellen (Kontrollzellen) sowie der hTRPV6-Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid wurden die Zellen für 24h mit Doxyzyklin-freiem Medium bzw. mit Doxyzyklin-Konzentrationen von 50ng/ml, 100ng/ml bzw. 1000ng/ml zur Induktion der hTRPV6-Expression behandelt. Nach 24h Inkubation mit Doxyzyklin erfolgte die Zugabe des Luciferase-Substrates und die Messung der Luciferaseaktivität. Die Kontrollmessungen in CHO-K1-Zellen ohne hTRPV6-Expression zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit Doxyzyklin im Vergleich zu unbehandelten Zellen durchschnittlich zu einem 0,9-fachen Anstieg der NFAT-Aktivität führte. In Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform wurde bei Behandlung mit 50ng/ml, 100ng/ml und 1000ng/ml Doxyzyklin ein durchschnittlich 4-facher Anstieg der NFAT-

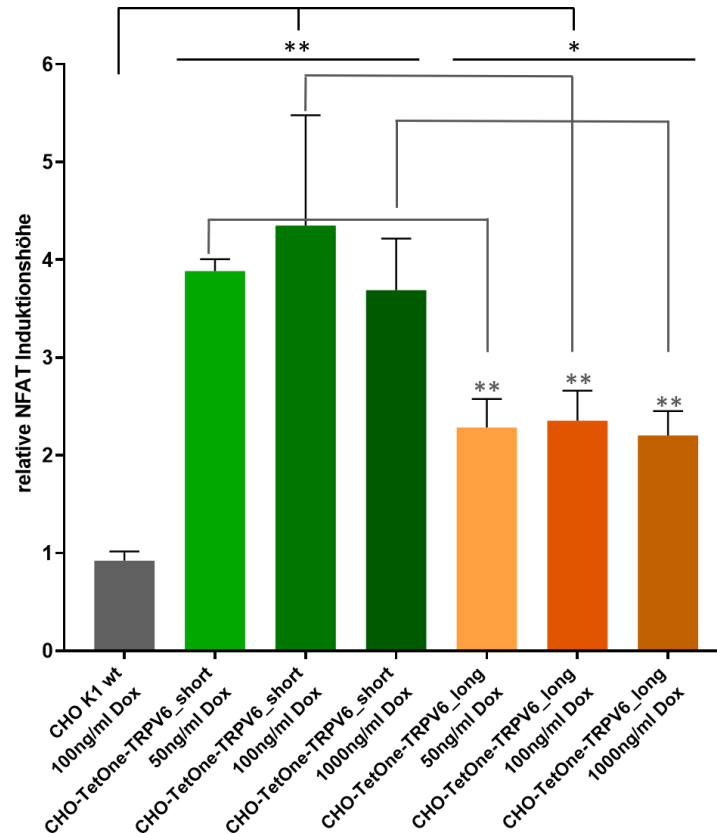


Abbildung 51: Einfluss der TRPV6-Überexpression auf die Aktivierung des NFAT Signalwegs. Die hTRPV6-Zelllinien wurden mit dem Luciferase-Reporterplasmid transfiziert und für 24h mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen von 50, 100 bzw. 1000ng/ml behandelt. Als Kontrolle wurden CHO-K1-Wildtypzellen, die den TRPV6-Ionenkanal nicht exprimieren, eingesetzt. Nach Zugabe des Luciferase-Substrates wurde die Lumineszenz mithilfe eines Plate-Readers gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die Abhängigkeit der Aktivierung des NFAT-Signalweges von der verwendeten Doxyzyklin-Konzentration an. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=4 Experimenten. Berechnete Signifikanzen: *P<0,05, **P<0,01, ns = nicht signifikant.

Aktivität ermittelt. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform war bei den drei Doxyzyklin-Konzentrationen ein durchschnittlich 2,3-facher Anstieg der NFAT-Aktivität messbar.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des Reporterassays gezeigt werden, dass die heterologe Überexpression der hTRPV6-Isoformen und die dadurch bedingte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Aktivierung des NFAT-Signalweges führte. Zudem konnte eine signifikant höhere 1,7-fache Aktivierung des NFAT-Signalweges in Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform im Vergleich zu Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform nachgewiesen werden.

3.6.2 Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf das Migrationspotenzial der TRPV6-Zelllinien

Der Zellmigration unterliegt ein koordiniertes Zusammenspiel von Motorproteinen, Zytoskelett und fokaler Adhäsionskontakte. Die hochdynamischen Prozesse werden durch transiente Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ räumlich und zeitlich reguliert. Zellen weisen während der Migration eine typische Polarisierung mit vorderem Pol (Lamellipodium) und hinterem Pol mit Zellkern und Organellen auf. Innerhalb der polarisierten Zellen besteht ein Ca^{2+} -Gradient mit niedrigem $[Ca^{2+}]_i$ im Lamellipodium und hohem $[Ca^{2+}]_i$ im hinteren Pol. Die Aktivierung von Myosin II zur Kontraktion und Retraktion des hinteren Pols sind Ca^{2+} /Calmodulin abhängig. Durch die niedrige $[Ca^{2+}]_i$ im vorderen Pol werden durch lokale Impulse intrazellulärer Ca^{2+} -Änderungen die Protrusion sowie die Retraktion des Lamellipodiums reguliert. Die Ca^{2+} -Mikrodomänen sind am vorderen Pol aktiver als am hinteren Pol und werden durch Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels TRP-Ionenkanäle und/oder durch einen SOCE-STIM1/Orai1-abhängigen Mechanismus gesteuert. Bei Störungen der Regulierung der Ca^{2+} -abhängigen Migration zeigen Tumorzellen eine erhöhte Migration und ein hohes Metastasierungspotenzial (Lambert *et al.*, 2017). Ein Zusammenhang zwischen einer TRPV6-Überexpression und damit einhergehender veränderter Zellmigration wurde in Pankreas- und Brusttumoren nachgewiesen. Darüber hinaus wurde in invasiven Bereichen von Brusttumoren eine höhere TRPV6-Expression detektiert als in nicht invasiven Gewebeanteilen. Durch siRNA-basierte Stilllegung der Genexpression von TRPV6 wurde in beiden Tumorarten die Zellmigration gehemmt (Song *et al.*, 2018; Lehen'kyi *et al.*, 2007).

Vor diesem Hintergrund wurde in einem Migrationsassay („Cell Exclusion Zone Assay“) vergleichend analysiert, ob durch die Überexpression der hTRPV6-Isoformen die Zellmigrationsrate in den Zellmodellen verändert wird. Dazu wurden zunächst 21.000 CHO-K1,

CHO-TetOne-TRPV6_short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Zellen in zwei gegenüberliegende, getrennte Reservoirs des Zellkulturträgers in zellspezifischem Medium mit 10% FCS-Zusatz ausgesät. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen in Medium ohne Doxyzyklin kultiviert bzw. mit 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Silikon-basierte Abtrennung zwischen beiden Reservoirs entfernt und das Zuwachsen des so entstandenen Spaltes mittels Time-Lapse-Mikroskopie bei 37°C und 5%iger CO₂-Begasung beobachtet. Hierbei wurden über einen Zeitraum von 24h im Abstand von 15min Phasenkontrastaufnahmen des zellfreien bzw. des von den migrierenden Zellen zuwachsenden Spaltes angefertigt und die zellfreie Fläche anschließend mit Hilfe von Fiji und Excel berechnet.

Die Resultate zeigten, dass CHO-K1-Wildtyp-Zellen, die keine TRPV6-Ionenkanäle exprimieren, ohne oder mit Doxyzyklin-Behandlung die gleiche Migrationsgeschwindigkeit aufwiesen (Abbildung 52). Demgegenüber wurde in Zellen mit Doxyzyklin-induzierter Expression der kurzen hTRPV6-Isoform eine signifikante 1,3-fach höhere Migrationsgeschwindigkeit als in hTRPV6-Zellen ohne Doxyzyklin-Induktion gemessen. In Zellen mit induzierter Expression der langen hTRPV6-Isoform war im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen ein signifikanter 1,5-facher Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit zu beobachten.

Zusammenfassend konnte mithilfe des „Cell Exclusion Zone Assays“ gezeigt werden, dass die Überexpression beider hTRPV6-Isoformen bei Kultivierung der Zellen mit 10% FCS im Medium zu einer signifikant erhöhten Migrationsgeschwindigkeit der Zellen führt. Dabei ist der Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit von induzierten Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen im Falle der langen hTRPV6-Isoform höher als im Falle der kurzen hTRPV6-Isoform.

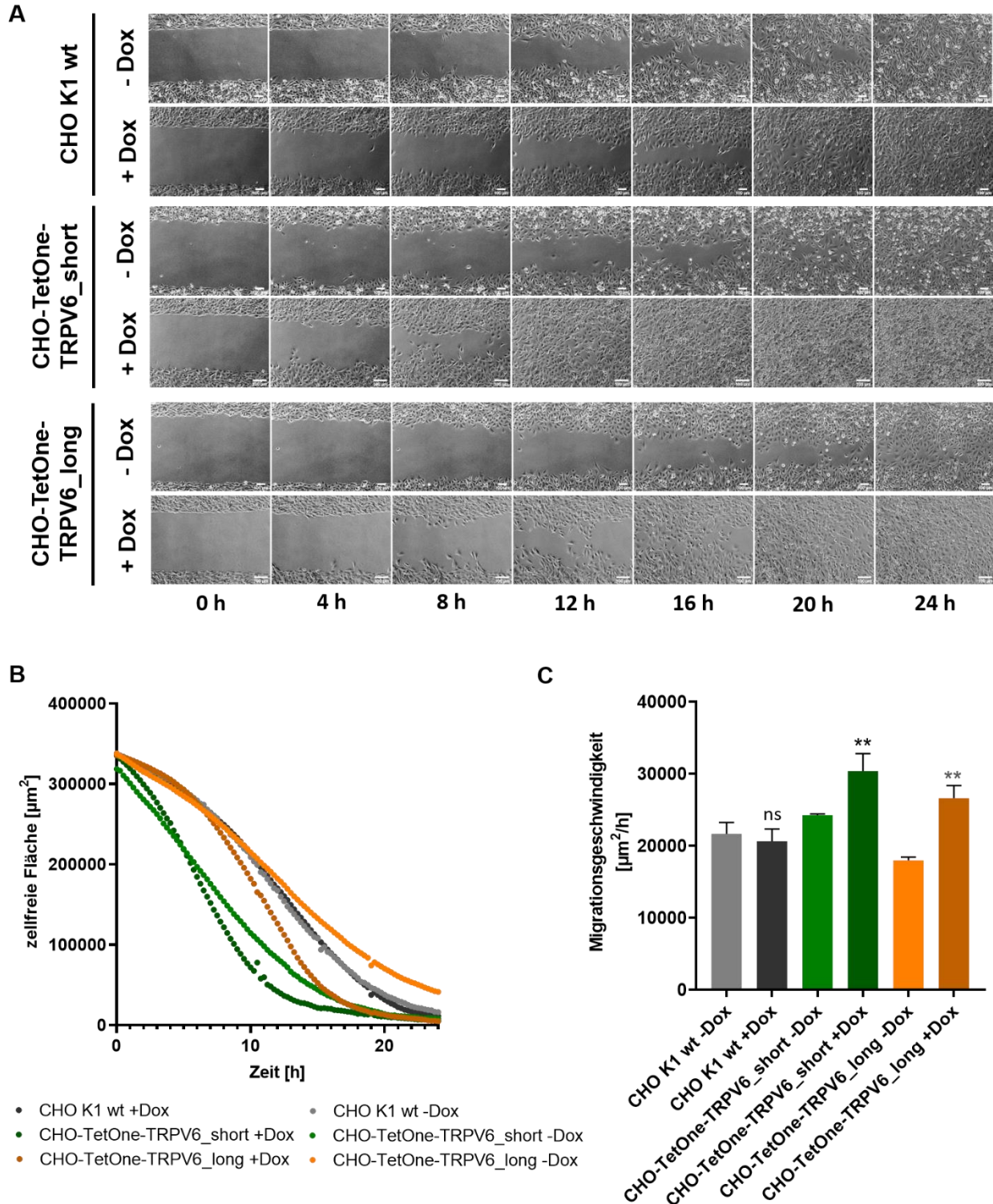


Abbildung 52: Migrationsverhalten von CHO-K1-Kontrollzellen und TRPV6-Zellen in Medium mit Zusatz von 10% FCS. Das Migrationspotenzial der mit Doxycyclin induzierten TRPV6-Zellen wurde mittels Zuwachsens eines 500 μ m großen, zellfreien Spaltes analysiert. Es wurden im Abstand von 15min Aufnahmen des Spaltes über einen Zeitraum von 24h gemacht. Die Zellen wurden während des gesamten Experimentes in Medium mit 10% FCS kultiviert. A) Bilder des Spaltes im Zeitabstand von 4h. B) Darstellung der gemessenen, zellfreien Fläche über die Zeit. C) Darstellung der aus den Kurven von B berechneten Migrationsgeschwindigkeit. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=4-5 Experimenten. Die Signifikanzen wurden jeweils im Bezug zur Kontrolle (0ng/ml Doxycyclin = „-Dox“) berechnet. *P<0,05, **P<0,01, ns = nicht signifikant.

Da Zellen, die in Medium mit 10% FCS-Zusatz kultiviert werden, neben der Migration auch proliferieren, wurde in einem nachgeschalteten Experiment zusätzlich der Einfluss des FCS-Gehaltes des Mediums auf die Migration analysiert. Dazu wurde der FCS-Gehalt des Mediums auf 0,5% verringert. Unter diesen Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied der Migrationsgeschwindigkeit zwischen Zellen mit Doxyzyklin-induzierter hTRPV6 Expression im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen festgestellt werden (Abbildung 53). Die Zellen mit hTRPV6-Überexpression wiesen zwar einen leichten Anstieg (1,10-facher Anstieg im Falle der kurzen TRPV6-Isoform und 1,09-facher Anstieg im Falle der langen TRPV6-Isoform) der Migrationsgeschwindigkeit auf, jedoch war dieser nicht signifikant. Dies würde darauf hindeuten, dass der zuvor beobachtete Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit bei Messungen in Medium mit 10% FCS mit einem Anstieg der Proliferationsrate der hTRPV6-exprimierenden Zellen einhergeht. Dies steht jedoch in Widerspruch zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.5, in denen das Wachstumsverhalten der Zellen in Abhängigkeit der hTRPV6-Expression untersucht wurde. Die Messungen hatten gezeigt, dass die Expression der beiden hTRPV6-Varianten keinen Einfluss auf die Verdopplungszeit der Zellen hat. Betrachtet man die einzelnen mikroskopischen Aufnahmen des Migrationsassays, so ist auch hier keine erhöhte Teilungsrate hTRPV6-exprimierender Zellen erkennbar. Möglicherweise beruht die Abnahme der Migration der hTRPV6-exprimierenden Zellen auf einer höheren Sensitivität ihres Metabolismus hinsichtlich der reduzierten FCS-Konzentration. Da die Zellmigration neben einer genauen Regulierung der $[Ca^{2+}]_i$ auch von weiteren extrazellulären Signalen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, beeinflusst wird, könnte die Reduzierung des FCS, als Quelle für externe Wachstumsfaktoren, in Verbindung mit der TRPV6-Überexpression die Zellmigration in den TRPV6-Zellen verringern.

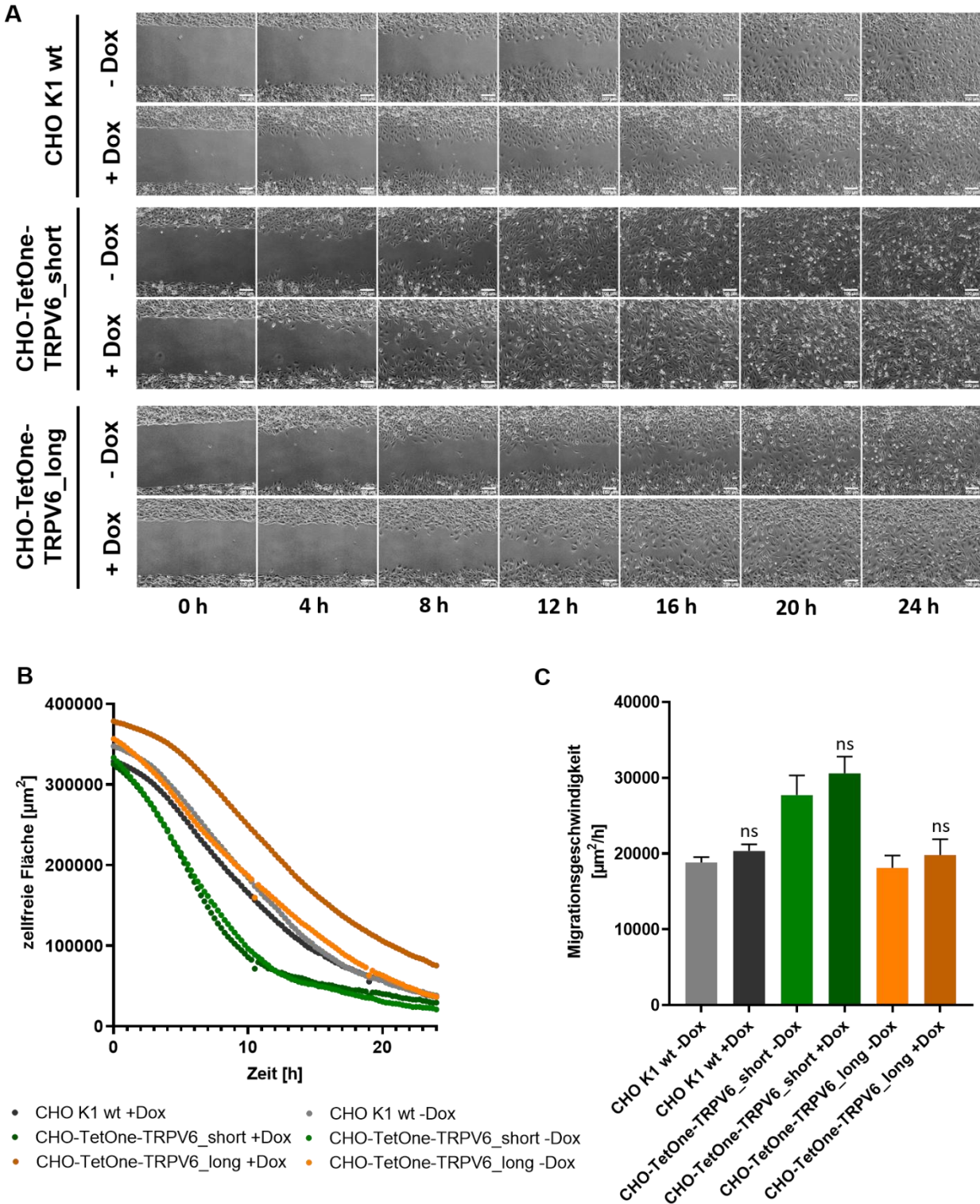


Abbildung 53: Migrationsverhalten von hTRPV6-Zellen in Medium mit 0,5% FCS-Zusatz. Das Migrationspotenzial der mit Doxyzyklin induzierten TRPV6-Zellen wurde mittels Zuwachsens eines 500µm großen, zellfreien Spaltes analysiert. Es wurden im Abstand von 15min Aufnahmen des Spaltes über einen Zeitraum von 24h gemacht. Die Zellen wurden während des gesamten Experimentes in Medium mit 0,5% FCS kultiviert. Es wurden im Abstand von 15min Aufnahmen des Spaltes über einen Zeitraum von 24h gemacht. Die Zellen befanden sich die gesamte Zeit über in Medium mit einem Zusatz von 0,5% FCS. A) Bilder des Spaltes im Zeitabstand von 4h. B) Darstellung der gemessenen, zellfreien Fläche über die Zeit. C) Darstellung der aus den Kurven von B berechneten Migrationsgeschwindigkeit. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=4-5 Experimenten. Die Signifikanzen wurden jeweils im Bezug zur Kontrolle (0ng/ml Doxyzyklin = „-Dox“) berechnet. *P<0,05, **P<0,01, ns = nicht signifikant.

3.6.3 Einfluss der hTRPV6-Überexpression auf das Invasionspotenzial der TRPV6-Zelllinien

Neben einer erhöhten Zellmigration spielt auch ein erhöhtes Invasionspotenzial bei der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle. Im Zuge der Invasion verlieren Krebszellen wichtige Zell-Zell-Interaktionen. Zudem setzen sie Substanzen, wie beispielsweise Matrix-Metalloproteasen, frei, mit denen die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix abgebaut werden können. Dies erlaubt es ihnen, den primären Tumor zu verlassen und in umliegendes Gewebe zu invasieren. Ein erhöhtes Invasionspotenzial beruht auf Veränderungen von Signalwegen, die die Migration der Zellen beeinflussen (Martin *et al.*, 2013). Beispielsweise wird über Aktivierung des NFAT-Signalwegs in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor AP1 sowie der Induktion von COX-2 und der Synthese von Prostaglandinen die Invasivität von Brustkrebzzellen erhöht (Yiu & Toker, 2006). Darüber hinaus führte das siRNA-basierte Ausschalten der TRPV6-Expression zu einer reduzierten Invasion in verschiedenen Zelllinien aus Pankreas- und Brusttumoren (Song *et al.*, 2018).

Um festzustellen, ob die hTRPV6 Überexpression in den entwickelten Zellmodellen das Invasionspotenzial erhöht, wurde ein Sphäroid-basierter Invasionsassay durchgeführt. Sphäroidkulturen haben den Vorteil, dass sie die diffusionslimitierte Verteilung von Sauerstoff, Nährstoffen, Metaboliten und Signalmolekülen sowie die 3D-Zell-Zell-Interaktionen besser widerspiegeln als zweidimensionale Monolayer-Kulturen (Bissell *et al.*, 1982; Pampaloni *et al.*, 2007; Weiswald *et al.*, 2015). Das Prinzip des Sphäroid-basierten Invasionsassays beruht auf einer Einbettung der Sphäroide in eine 3D extrazelluläre Matrix (BME, Basement Membrane-like Matrix). Die basalmembranartige Matrix aus Isolaten der murinen Sarkom-Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm (EHS-Zellen) ist bei 4°C flüssig und bildet bei 37°C ein Hydrogel aus. Das Einwandern invasiver Zellen in die BME-Matrix wird mikroskopisch detektiert. Nicht-invasive Zellen verbleiben im Sphäroid (Kramer *et al.*, 2013).

Für den 3D-Matrixinvasionsassay wurden 20.000 Zellen/Well in einem Endvolumen von 100µl in ULA-Platten für die Bildung der Sphäroide ausgesät (siehe 2.4.7). 96h nach der Aussaat der TRPV6-Zellen sowie der CHO-K1-Kontrollzellen wurden die entstandenen Sphäroide mit 100ng/ml Doxyzyklin bzw. mit Medium ohne Doxyzyklin behandelt. Nach 48-stündiger Behandlung mit Doxyzyklin wurden die Sphäroide in die BME-Matrix eingebettet und mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert bzw. Medium ohne Doxyzyklin als Kontrolle überschichtet. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde die Invasion der CHO-K1-Zellen sowie der Zellen mit TRPV6-Expression in die BME-Matrix mikroskopisch analysiert. Mit Hilfe der Programme Fiji und Excel wurde die Fläche des invasiven Bereichs bestimmt.

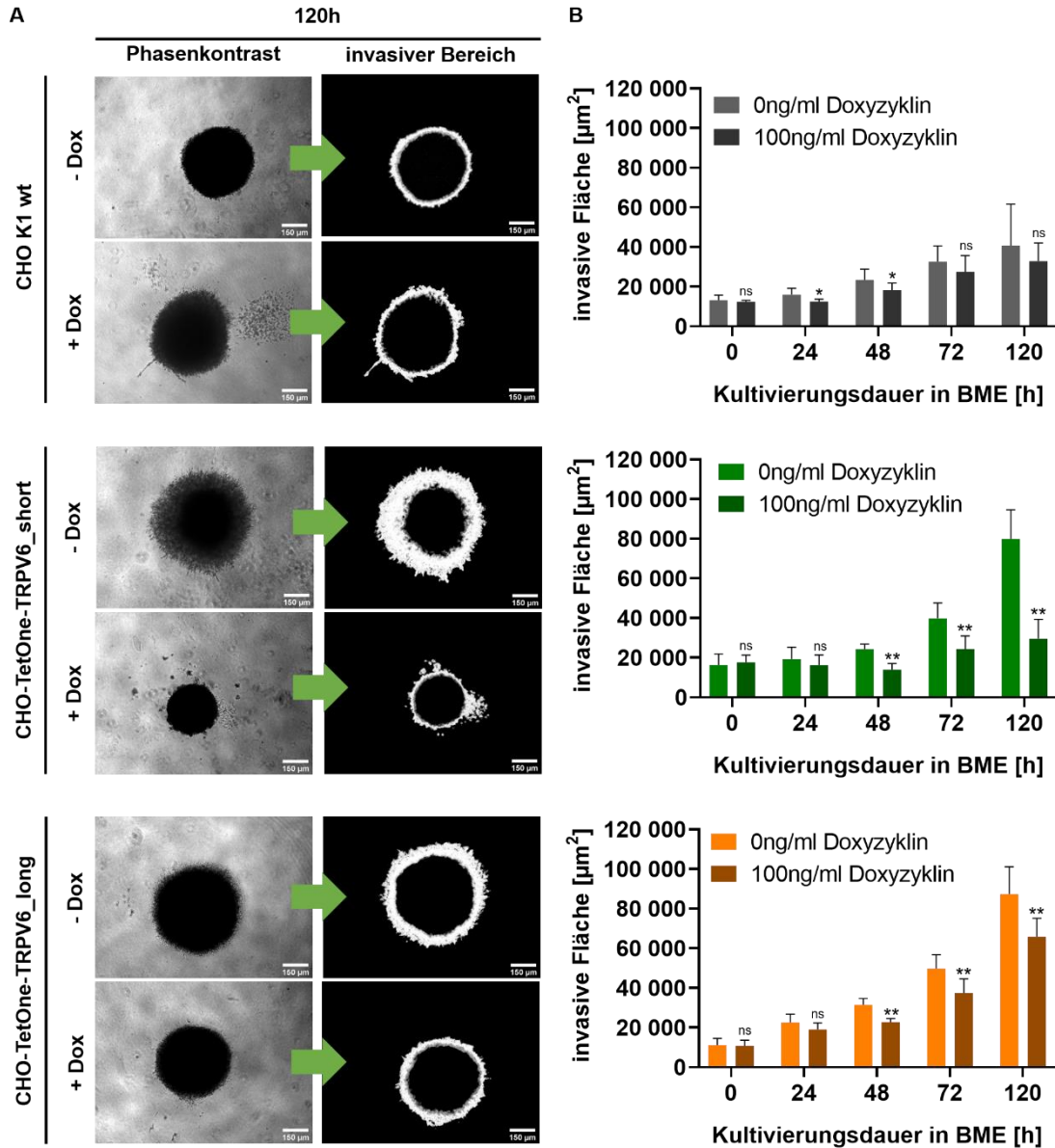


Abbildung 54: Analyse des Invasionspotenzials der TRPV6-Zellen und Kontrollzellen im 3D-Matrix-Invasionsassays. Für die Herstellung der Sphäroide wurden 20.000 Zellen pro Well einer zellabweisenden U-Bottom-96-Well-Platte ausgesät und im Anschluss daran zentrifugiert. Nach 96h wurden die Sphäroide mit 0 bzw. 100ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach weiteren 48h wurden die Sphäroide in BME eingebettet. Im Zeitverlauf von insgesamt fünf Tagen wurden mikroskopische Aufnahmen der Sphäroide gemacht. A) Mikroskopische Aufnahmen der Sphäroide nach 120h Kultivierung in BME. B) Fläche des invasiven Bereichs der CHO-K1 wt, CHO-TetOne-TRPV6-short 2.6 und CHO-TetOne-TRPV6_long 1.8 Sphäroide im Verlauf der fünf Messtage. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung aus n=3 Experimenten. Die Signifikanzen wurden jeweils im Bezug zur Kontrolle (0ng/ml Doxyzyklin) berechnet. *P<0,05, **P<0,01, ns = nicht signifikant.

Bei allen Sphäroiden war nur eine relativ kleine Zone invasierender Zellen zu erkennen, die im Zeitraum bis 120h jeweils zunahm. Insgesamt zeigten die nicht mit Doxyzyklin-behandelten Sphäroide eine etwas größere Fläche invasierender Zellen als die mit Doxyzyklin-induzierten Sphäroide. Die Analyse der CHO-K1-Sphäroide, die keine TRPV6-Ionenkanäle exprimieren, zeigte, dass die Doxyzyklin-Behandlung nur bei 24h und 48h einen geringen Einfluss auf das

Invasionsverhalten der Zellen hatte. Bei den weiteren Messpunkten war kein signifikanter Einfluss der Doxyzyklin-Behandlung zu detektieren (Abbildung 54). Weiterhin ergab sich bei den Sphäroiden mit induzierter Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform bis 24h Kultivierung in der BME-Matrix kein Unterschied in der Invasion im Vergleich zu nicht induzierten Zellen.

Bei 48h Kultivierung in der BME-Matrix wurde eine signifikant geringere Invasion bei Sphäroiden mit Expression der kurzen wie der langen hTRPV6-Isoformen im Vergleich zu nicht-induzierten Sphäroiden festgestellt. Bei 120h Kultivierung in der BME-Matrix war bei Sphäroiden mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform insgesamt eine 63%ige Reduktion der Fläche mit invasierenden Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen zu beobachten. Sphäroide mit Expression der langen hTRPV6-Isoform zeigten ebenfalls bei 120h Kultivierung in der BME-Matrix eine signifikant verringerte Fläche von invasierenden Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen. Allerdings war die Reduktion hier weniger stark als bei den Sphäroiden mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform und lag bei 20%.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass Zellen mit Expression der hTRPV6-Ionenkanäle ein geringeres Invasionspotenzial im 3D-Matrix-Invasionsassay aufwiesen als Zellen ohne TRPV6-Expression. Ein Unterschied zwischen der kurzen versus der langen hTRPV6-Isoform ergab sich durch das etwas höhere, relative Invasionspotenzial der langen TRPV6-Isoform.

3.7 Pharmakologische Inhibition der hTRPV6-Isoformen

Eine Überexpression des Ca^{2+} -selektiven TRPV6-Ionenkanals tritt bei vielen epithelialen Tumorarten und in malignen hämatologischen Erkrankungen auf. Die aberrante Regulation des TRPV6-Ionenkanals führt zu Störungen der Ca^{2+} -Homöostase und nachfolgend zu Veränderungen von Ca^{2+} -abhängigen Prozessen, wie beispielsweise eine erhöhte Zellproliferation oder eine Inhibierung der Apoptose (Lehen'kyi *et al.*, 2012). Eine pharmakologische Inhibition der TRPV6-Ionenkanäle würde daher eine zielgerichtete therapeutische Strategie („targeted therapy“) für die Behandlung von Tumoren mit Überexpression des TRPV6-Ionenkanals bedeuten (Bowen *et al.*, 2013). Bisher steht nur eine begrenzte Anzahl von niedermolekularen und Peptid-Inhibitoren für den TRPV6-Ionenkanal zur Verfügung, die aber aktuell nicht in der klinischen Routine einsetzbar sind. Nur mit dem SOR-C13 Peptid wurde aktuell eine klinische Phase I Studie zur Bestimmung der maximal verträglichen Dosis an Patienten mit fortgeschrittenen epithelialen Tumoren durchgeführt (Fu *et al.*, 2017).

Für eine Dosis-Wirkungsanalyse wurden die hTRPV6-Zellmodelle mit vier bekannten TRPV6-Antagonisten (Ruthenium Red, La^{3+} , 2-APB, SOR-C13) behandelt und die Potenz der Wirkstoffe (IC_{50} -Werte) sowie die Effizienz (Maximalwirkung) bestimmt. Der anorganische Ruthenium-Amin-Komplex Ruthenium Red (RR), das Seltenerdmetall Lanthan (La^{3+}) und der IP_3 -Rezeptor-Inhibitor 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborat) repräsentieren unspezifische TRPV6-Antagonisten, die neben der Inhibition des TRPV6-Ionenkanals auch andere TRP- und weitere Ionenkanäle beeinflussen können. Im Gegensatz dazu ist das eingesetzte Peptid SOR-C13 der einzige, zur Verfügung stehende TRPV6-spezifische Inhibitor.

Ruthenium Red (RR) ist ein nicht kompetitiver Inhibitor aller TRP Kanäle, der wahrscheinlich die wässrige Pore blockiert (Vriens *et al.*, 2009).

Der anorganische Ca^{2+} -Ionenkanal-Blocker Lanthan (La^{3+}) hemmt abhängig von der eingesetzten Konzentration sehr viele Ca^{2+} -Kanäle aufgrund seines zu Ca^{2+} ähnlichen Ionenradius und der starken Interaktion mit Ca^{2+} -Bindestellen von Membranproteinen, einschließlich mitochondrialer sowie bakterieller Ca^{2+} -Ionenkanäle. Allerdings werden innerhalb der Familie der TRP-Ionenkanäle einige Ionenkanäle, die TRPC4 und TRPC5 sowie die heteromeren TRPC1–TRPC5 Ionenkanäle, durch La^{3+} aktiviert (Kovacs *et al.*, 2011; Bouron *et al.*, 2015).

2-APB ist ein zellpermeabler, allosterischer TRPV6-Antagonist, der mittels Bindung zwischen den S1-S4-Transmembranhelices auf der cytoplasmatischen Seite spezifische Protein-Lipid-Wechselwirkungen an dieser Position verändert und dadurch den geschlossenen Zustand induziert. 2-APB könnte die Aktivität weiterer TRPV-Ionenkanäle in ähnlicher Weise modulieren. Der jeweilige Kanal-Lipid-Komplex sowie die Funktion der Lipide im „gating“ Mechanismus des Ionenkanals führt entweder zur Aktivierung oder Hemmung des jeweiligen Ionenkanals bzw. zeigt keinen Einfluß auf die Ionenkanalaktivität. Eine Aktivierung von TRP-Ionenkanälen durch 2-APB wurde bisher für TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPA1 und TRPM6 nachgewiesen, während eine antagonistische Wirkung für TRPV6, TRPM2, TRPM7, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 beschrieben wurde. Darüber hinaus inhibiert 2-APB den IP_3 -Rezeptor im ER und moduliert „store-operated“ Ca^{2+} -Ionenkanäle abhängig von der Bildung homomerer oder heteromerer Proteinkomplexe von STIM1 und STIM2 sowie der interagierenden Proteine für die Porenbildung Orai1, -2 und -3 (Oh-Hora *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2018).

SOR-C13 ist ein synthetisches Tridekamer-Peptid, abgeleitet vom C-Terminus des paralytischen Peptids Soricidin, das aus der Speicheldrüse der Nördlichen Kurzschwanzspitzmaus (*Blarina brevicauda*) isoliert wurde. Die TRPV6-spezifische Inhibierung von TRPV6 durch SOR-C13 wurde in prä-klinischen und Phase I klinischen Studien des Ovarialkarzinoms sowie weiteren epithelialen Tumoren nachgewiesen (Xue *et al.*, 2018).

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte („half maximal inhibitory concentration“) und der Effizienzen der Inhibitoren wurden die mit Doxzyklin-induzierten Zelllinien mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform über einen Zeitraum von 30 min mit dem zu testenden Antagonisten behandelt. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der [Ca²⁺]_i. Auf der Basis der gemessenen, maximalen Änderungen der Fluo-8-Intensität wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und die entsprechenden IC₅₀-Werte ermittelt (Abbildung 55).

In beiden Zellmodellen mit Expression der hTRPV6-Isoformen führte die Behandlung mit den Antagonisten zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der gemessenen maximalen Änderung der Fluo-8-Intensitäten (Abbildung 55). Für die unspezifischen TRPV6-Antagonisten 2-APB, La³⁺ und Ruthenium Red wurde in beiden hTRPV6-Zellmodellen der gleiche inhibitorische Effekt festgestellt. In Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform wurden für den jeweiligen Antagonisten ähnliche IC₅₀-Werte und Effizienzen ermittelt. Für La³⁺ wurden IC₅₀-Werte von 10,4 ± 10,5µM für die kurze hTRPV6-Isoform (Effizienz 51%) und 5,9 ± 2,9µM für die lange hTRPV6-Isoform (Effizienz 39%) gemessen. Ruthenium Red hatte eine halbmaximale Wirkung bei einer Konzentration von 12,0 ± 2,2µM bei der kurzen hTRPV6-Isoform mit einer maximalen Effizienz von 50%, während bei der langen hTRPV6-Isoform ein IC₅₀-Wert von 2,3 ± 3,4 µM mit einer maximalen Effizienz von 49% festgestellt wurde. 2-APB wies mit 41,7 ± 10,2µM für die kurze hTRPV6-Isoform bzw. mit 51,2 ± 15,1µM für die lange hTRPV6-Isoform die höchsten IC₅₀-Potenzen auf, zeigte jedoch die höchste Effizienz aller getesteten Antagonisten, 91% für die kurze Variante und 90% für die lange Variante (Tabelle 12).

Tabelle 12: Gemessene IC₅₀-Werte und Effizienzen der TRPV6-Antagonisten La³⁺, 2-APB, Ruthenium Red und SOR-C13. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus n=3-4 Experimenten.

Antagonist	hTRPV6-short		hTRPV6-long		Signifikanz	
	IC ₅₀	Effizienz (%)	IC ₅₀	Effizienz (%)	IC ₅₀	Effizienz (%)
La ³⁺	10,4 ± 10,5µM	51,2 ± 9,7	5,9 ± 2,9µM	39,2 ± 9,7	n.s.	n.s.
2-APB	41,7 ± 10,2µM	91,0 ± 0,4	51,2 ± 15,1µM	89,7 ± 1,4	n.s.	n.s.
Ruthenium Red	12,0 ± 2,2µM	49,0 ± 1,9	2,3 ± 3,4 µM	50,2 ± 4,8	p<0.05 (*)	n.s.
SOR-C13	21,3 ± 5,8nM	56,9 ± 3,3	1495,5 ± 79,9nM	38,4 ± 8,3	p<0.01 (**)	p<0.05 (*)

Im Gegensatz zu den unspezifischen Antagonisten ergaben sich für den TRPV6-spezifischen Peptid-Inhibitor SOR-C13 deutliche Unterschiede der gemessenen IC₅₀-Werte und der Effizienzen in Zellen mit Expression der kurzen versus der langen hTRPV6-Isoform. Der ermittelte IC₅₀-Wert für die kurze hTRPV6-Isoform (21,3 ± 5,8nM) war 71-fach niedriger und damit signifikant unterschiedlich im Vergleich zu dem IC₅₀-Wert für die lange hTRPV6-Isoform (1495,5 ± 79,9nM). Die Effizienz des SOR-C13 Peptids war für beide Varianten signifikant unterschiedlich und betrug 57% für die kurze bzw. 38% für die lange hTRPV6-Isoform (Tabelle 12).

Basierend auf den ermittelten IC_{50} -Werten konnte folgende Wirksamkeitsreihenfolge für die vier Antagonisten erstellt werden: SOR-C13 > Lanthan > Ruthenium Red > 2-APB für Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform und SOR-C13 > Ruthenium Red > Lanthan > 2-APB für die lange hTRPV6-Isoform.

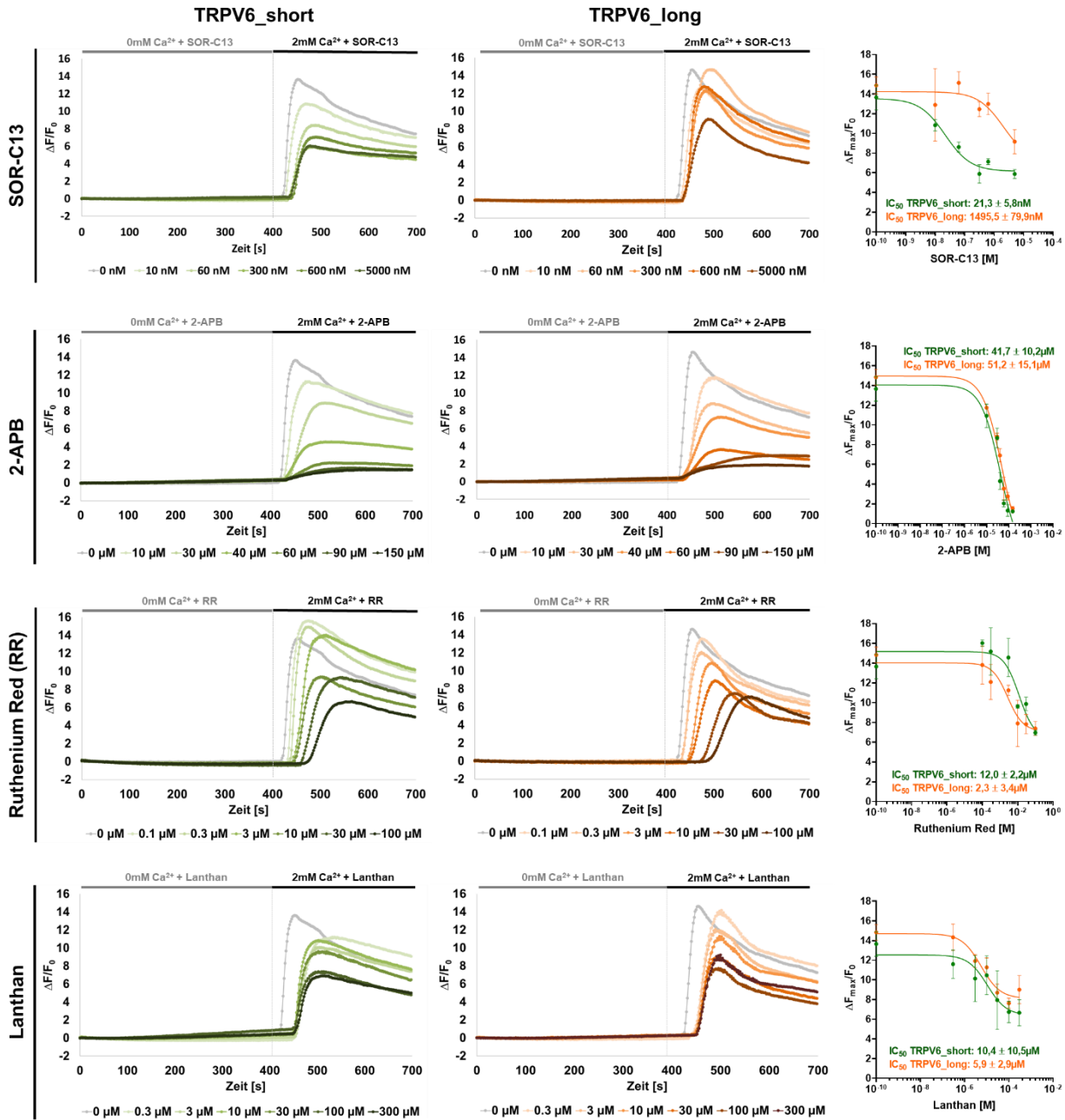


Abbildung 55: Calcium-Imaging und Dosis-Wirkungskurven der getesteten Antagonisten. Die mit Doxyzyklin induzierten Zellen mit Expression der kurzen bzw. der langen hTRPV6-Isoform wurden mit den Antagonisten für 30min. behandelt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität vor und nach Erhöhung der $[Ca^{2+}]_e$ von 0mM auf 2mM. TRPV6-Antagonisten: 2-APB, Ruthenium Red, Lanthan (La^{3+}), SOR-C13. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3-4 Experimenten.

4 Diskussion

Eines der auffälligsten Merkmale des TRPV6- als auch des zu 75% homologen TRPV5-Ionenkanals beruht in deren hohen Ca^{2+} -Selektivität ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$) im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der TRP-Ionenkanäle, die deutlich weniger Ca^{2+} -selektiv sind ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 1-10$). Spezifische Unterschiede in der Sequenz der Selektivitätsfilter gekoppelt mit einer relativ starren Struktur der äußeren Porenregion führen zu einer höheren Ca^{2+} -Selektivität der TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle gegenüber beispielsweise TRPV1-4 (van Goor *et al.*, 2017). Weiterhin zeigen TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle in Abhängigkeit der Membranlipid-Zusammensetzung eine konstitutive Aktivität bei niedrigen, intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (Vennekens *et al.*, 2000; Lehen'kyi *et al.*, 2007).

Eine weitere Besonderheit des TRPV6-Ionenkanals in der Klasse der Säugetiere besteht in der Translationsinitiation des TRPV6-Proteins an einem nicht-kanonischen ACG-Start-Codon. Das ACG-Codon lokalisiert 120bp „in-frame“ stromaufwärts des in der UniProt-Datenbank annotierten, kanonischen AUG-Startcodons (UniProtKB/Swiss-Prot Q9H1D0). Für das humane sowie das murine *TRPV6*-Gen wurde in einzelnen Geweben exemplarisch nachgewiesen, dass *in vivo* ausschließlich das vom ACG-Codon startende, größere TRPV6-Protein gebildet wird. Das bisher fast ausschließlich für Überexpressionsmodelle und Analysen genutzte, um 40 Aminosäuren kleinere TRPV6-Protein, beruht nur auf der bioinformatischen Vorhersage des offenen Leserasters auf Transkript-Ebene unter Berücksichtigung eines kanonischen Start-Codons (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Neben dem alternativen Spleißen und dem Transkriptionstart an alternativen Promotoren trägt auch die Nutzung alternativer Start-Codons bei der Translation zur Diversität des Proteoms in höheren Eukaryoten bei. Durch Ribosomen-Profiling und RNA-Sequenzierung des humanen Transkriptoms wurden sowohl im 5'UTR, ORF (Open Reading Frame) und 3'UTR für tausende von Genen putative alternative Start-Codons bzw. alternative ORFs im gleichen Transkript vorhergesagt. Diese können die Translation des primären ORFs positiv oder negativ regulieren, die Lokalisation der Protein-Isoformen beeinflussen oder können beispielsweise in biologisch relevante Peptide translatiert werden (de Klerk & 't Hoen, 2015; Kearse & Wilusz, 2017; Ivanov *et al.*, 2011). In der Klasse der Säugetiere führt das nicht kanonische ACG-Startcodon im 5'UTR des TRPV6-Transkripts zu der Bildung eines sogenannten uORF (upstream Open Reading Frame), der aber im gleichen Leseraster mit dem ersten, möglichen AUG überlappt und dadurch zu einer N-terminal verlängerten TRPV6-Proteinisoform führt. In „patch clamp“-Versuchen und Calcium-Imaging Analysen wurden ähnliche Ca^{2+} -Einströme durch die lange im Vergleich zur kurzen TRPV6-Isoform in Überexpressionsmodellen

nachgewiesen. Die mögliche Funktion der verlängerten N-terminalen Region konnte bisher aber nicht umfassend geklärt werden (Fecher-Trost *et al.*, 2013).

Der TRPV6-Ionenkanal ist hauptsächlich in apikalen Membranen von Ca^{2+} -transportierenden Epithelien verschiedener Gewebe wie beispielsweise im Darm, Pankreas und Prostata exprimiert und ist entscheidend an der Ca^{2+} -Resorption im Darm und somit an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt (Hoenderop *et al.*, 2002). Die klinische Relevanz einer veränderten, oft erhöhten TRPV6-Expression wurde vor allem in Knock-out und transgenen Mausmodellen gezeigt, in denen Symptome einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase resultierten, wie beispielsweise eine fehlerhafte Ca^{2+} -Resorption im Darm, verringertes Körpergewicht oder beeinträchtigte Fruchtbarkeit. Eine Überexpression des TRPV6-Ionenkanals wurde im Ovarialkarzinom und weiteren epithelialen Tumoren von Kolon, Brust, Prostata und Schilddrüse nachgewiesen. In Prostatatumoren korreliert eine Mengenzunahme der exprimierten TRPV6-mRNA positiv mit dem Malignitätsgrad und einem hohen Metastasierungspotenzial. Eine Hemmung der TRPV6-Aktivität mit therapeutischer Wirksamkeit konnte durch verminderte Expression des Ionenkanals oder durch pharmakologische Intervention in vier Krebsarten, Adenokarzinome von Brust, Eierstock, Prostata und Bauchspeicheldrüse, nachgewiesen werden. Der TRPV6-Ionenkanal stellt somit eine Zielstruktur für die Identifizierung und Entwicklung von Antagonisten dar, die für einen erfolgreichen klinischen Einsatz verschiedene Anforderungen, wie beispielsweise niedrige IC_{50} -Werte, hohe Spezifität für TRPV6, geringe Toxizität und Biostabilität, erfüllen müssen (Stewart, 2020; Leanza *et al.*, 2016).

Im Fokus der vorliegenden Dissertation stand eine vergleichende, funktionelle Analyse der langen TRPV6-Isoform mit der kurzen, N-terminalen Deletionsvariante des TRPV6-Ionenkanals in einem CHO-K1-Überexpressionsmodell mit regulierbarer Expression der entsprechenden humanen TRPV6-Transkripte. In Abhängigkeit verschiedener, experimenteller Parameter, wie der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, der Veränderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des extrazellulären pH-Wertes sowie der pharmakologischen Testung von Antagonisten, wurden deren Auswirkungen auf intrinsische Eigenschaften der hTRPV6-Isoformen in den Überexpressionsmodellen analysiert. Die festgestellten Unterschiede zwischen den beiden TRPV6-Isoformen in Bezug auf den TRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, auf die Vesikelverteilung sowie das Migrations- und Invasionspotenzial sollen einen Beitrag zur Aufklärung möglicher Funktionen des um 40 Aminosäuren verlängerten N-terminalen Bereiches des langen TRPV6-Ionenkanals leisten.

4.1 CHO-K1 Überexpressionsmodell mit Tet-On regulierbarer hTRPV6-Expression

CHO-K1 als zellulärer Hintergrund. CHO-Expressionssysteme werden aktuell bei über 70% der hergestellten Biopharmazeutika, häufig rekombinante Antikörper, eingesetzt (Lalonde & Durocher, 2017). Darüber hinaus gehören CHO (Chinese Hamster Ovary) -Zellen neben HEK293 (Human Embryonic Kidney), BHK-21 (Baby Hamster Kidney) und COS-7 (CV-1 in Origin Simian-7; Green Monkey) zu den Zelllinien, die vorwiegend für die rekombinante Expression von humanen, meist komplex glykolysierten Membranproteinen genutzt werden (Andréll & Tate, 2013). Das TRPV6-Protein weist ein spezifisches N-Glykosylierungsmuster auf, durch welches die Assemblierung und die Aktivität des Ionenkanals beeinflusst wird (Stewart, 2020). Da CHO-Zellen bei der Synthese rekombinanter Proteine N-Glykanstrukturen erzeugen, die dem N-Glykosylierungsmustern humaner Proteine ähnlich sind, waren sie zur rekombinanten Expression des hTRPV6 geeignet. Ein weiterer Aspekt für den Einsatz der CHO-K1-Zellen als zellulären Hintergrund für das TRPV6-Überexpressionsmodell war, dass in CHO-Zellen keine endogene Expression von TRPV6 (CAT1) detektiert werden konnte (Bai *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2013). Dies war für die Analyse der hTRPV6-Isoformen im Überexpressionsmodell vorteilhaft, da die Versuchsergebnisse auf die rekombinant exprimierten Ionenkanäle zurückgeführt werden konnten.

Regulierbare Überexpression. Das humane *TRPV6*-Gen wird vorwiegend in Epithelien und in Organen exprimiert, die in den transzellulären Ca^{2+} -Transport involviert sind, wie Zwölffingerdarm, Dünndarm, Dickdarm und Niere, sowie in exokrinem Gewebe wie Bauchspeicheldrüse, Brustdrüse, Schweißdrüse und Speicheldrüse. Die endogene Expression von TRPV6 ist in gesundem Gewebe meist relativ niedrig, mit Ausnahmen beispielsweise in Dünn- und Dickdarm, Schweißdrüsen, Plazenta und Pankreas. Im Gegensatz dazu ist die TRPV6-Expression in verschiedenen Tumoren, wie Pankreas-, Prostata- und Brustkrebs deutlich erhöht (Übersicht in: Lehen'kyi *et al.*, 2012 und The Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org).

Das im Rahmen der Dissertation entwickelte Überexpressionsmodell ermöglichte vergleichende Analysen zwischen der kurzen TRPV6-Deletionsvariante und der langen TRPV6-Isoform, da prinzipiell eine höhere Expression der hTRPV6-Isoformen durch die rekombinante Überexpression erreicht wurde und darüber hinaus die kurze hTRPV6-Isoform nach aktuellem Verständnis in Säugetierzellen nicht endogen exprimiert wird (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Die Überexpression der kurzen sowie der langen TRPV6-Isoform im gleichen zellulären Hintergrund (CHO-K1) stellte eine grundlegende Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit der Resultate aus den Funktionsanalysen der hTRPV6-Ionenkanäle dar. Bei einer konstitutiven Überexpression

eines Fusionsproteins von TRPV6, mCherry und der Membranankerdomäne des Transferrin-Rezeptors wurde gezeigt, dass die Anzahl der TRPV6-Ionenkanäle in der Plasmamembran zu gering war, um sie mittels konfokaler Lasermikroskopie zu detektieren. Allerdings konnte durch Oberflächenbiotinylierung nachgewiesen werden, dass der Anteil von Plasmamembran-assoziierten TRPV6-Proteinen der langen Isoform ungefähr doppelt so hoch im Vergleich der kurzen Isoform war (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Auch in den Lokalisationsstudien in dieser Arbeit konnten die überexprimierten TRPV6-mCherry-Fusionsproteine nicht bzw. nur gering an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die rekombinante TRPV6-Expression war aber in den entwickelten Zellmodellen bei einer Doxyzyklin-Induktion von 100ng/ml hoch genug, um die Funktionsanalysen der hTRPV6-Ionenkanäle mittels Messungen der Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Calcium-Imaging durchführen zu können.

Regulierbare Überexpressionsmodelle für den humanen TRPV6 Ionenkanal wurden laut aktueller Literaturrecherche bisher nicht entwickelt. Die in der Literatur beschriebenen Modelle mit heterologer TRPV6-Expression wurden als transiente oder stabile Zellmodelle mit konstitutiver TRPV6-Expression etabliert, wie beispielsweise in den Zelllinien LNCaP (lymph node prostate cancer; androgen-dependent), PC3 und DU145 (human prostate cancer, hormone-refractory) HEK (Human Embryonic Kidney) RBL (Rat Basophilic Leukemia) und auch CHO (Chinese Hamster Ovary) (Bödding *et al.*, 2003; Fecher-Trost *et al.*, 2013; Raphaël *et al.*, 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das regulierbare TetOne-Expressionssystem eingesetzt, bei dem im Gegensatz zum vorhergehenden Tet-On-System der Doxyzyklin-abhängige Transaktivator und das Zielgen auf einem Expressionsplasmid gemeinsam exprimiert werden. Vorteile eines regulierbaren Expressionssystems lagen zum einen in der Vermeidung zytotoxischer Effekte, die bei konstitutiver Überexpression eines Ionenkanals in einem stabilen Zellmodell durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom prinzipiell möglich sind. Zum anderen konnte auf Basis des TetOne-Systems die Expressionshöhe der hTRPV6-mCherry-Isoformen in Abhängigkeit der Konzentration des Induktors Doxyzyklin sowie der Induktionszeit für die vergleichenden Analysen verändert werden. Aufgrund der Doxyzyklin-Abhängigkeit des Transaktivator-Proteins war weiterhin die Etablierung einer idealen, internen Kontrolle möglich. Rekombinante hTRPV6-Zellen, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, wiesen keine unspezifische Basalexpression der hTRPV6-mCherry Proteine auf.

Die Behandlung der Zellen mit dem Induktor Doxyzyklin verursachte keine negativen Effekte auf die Zellviabilität. Weiterhin war die Verdopplungszeit der Zellen mit induzierter Expression der kurzen bzw. langen TRPV6-Isoform versus der nicht-induzierten Kontrollen unverändert, so dass

ein durch die TRPV6-Überexpression vermittelter Einfluss auf die Proliferation ausgeschlossen werden konnte.

Translatierte hTRPV6-mCherry-Fusionsproteine konnten bereits bei einer Doxyzyklin-Konzentration von 10ng/ml immunhistochemisch in Western Blot-Analysen als auch über die mCherry-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Eine maximale Induktion wurde in beiden Zellmodellen bei einer Doxyzyklin-Konzentration von 100ng/ml erreicht (Kapitel 3.3.3). Im Western Blot wurde eine 115kDa große Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 115kDa nachgewiesen als auch eine 127kDa große Bande, die wahrscheinlich die glykosylierte Form des Fusionsproteins darstellt. Weiterhin wurde eine 90kDa große Bande detektiert, die vermutlich ein Degradationsprodukt des Fusionsproteins darstellt. Die N-Glykosylierung des TRPV6-Proteins an der Aminosäure-Position 397 stellt eine wichtige posttranslationale Modifikation dar, die zur Stabilisierung des Kanals in der Plasmamembran und somit zu einem erhöhten, TRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom führt (Peng *et al.*, 1999; Hoenderop *et al.*, 2003).

In den Zellmodellen war die Expression der kurzen TRPV6-mCherry Isoform bei gleicher Doxyzyklin-Konzentration (100ng/ml) und 48-stündiger Inkubation 3,1-fach höher als die Expression der langen TRPV6-Isoform. Unterschiede in der Expressionshöhe verschiedener TRPV6-Proteinvarianten wurden auch in einem Überexpressionsmodell mit HEK293-Zellen gezeigt, in dem für die kurze TRPV6-Isoform im Vergleich zur langen Isoform eine 5-fach höhere Expression nachgewiesen wurde (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Dies könnte auf einer geringeren Translationseffizienz des nicht-kanonischen ACG-Startcodons in der langen TRPV6-Isoform beruhen. In Reporterstudien wurde gezeigt, dass ein ACG-Startcodon im Vergleich zum AUG-Startcodon nur eine 40%ige Translationsinitiationseffizienz aufweist. Allerdings beeinflussen die um das Startcodon liegenden Nukleotide an den Positionen -3 und +4 die Translationseffizienz insbesondere bei nicht-kanonischen Startcodons, da sie stabilisierende Interaktionen mit dem 43S-Präinitiationskomplex ausbilden können (Kearse & Wilusz, 2017). Ist beispielsweise an der Position -3 relativ zum ersten Nukleotid des Start-Codons ACG ein Purin (A/G) vorhanden, führt dies zu einer dreifachen Erhöhung der Translationseffizienz. Befindet sich an der Position +4, gezählt ab dem ersten Nukleotid des Startcodons ACG, ein G, ist die Translationseffizienz 7-fach erhöht (Kearse & Wilusz, 2017). In der Sequenz des humanen *TRPV6*-Gens ist das nicht-kanonische ACG-Startcodon in einer konservierten Kozak-Sequenz lokalisiert (-GAGACGGG-). Da in der vorliegenden Arbeit die Sequenz der langen hTRPV6-Isoform aber erst ab dem ACG-Startcodon kloniert wurde, ist die +4 Position zwar vorhanden, aber es fehlt die -3 Position in dem Klonierungskonstrukt für eine mögliche, zusätzliche Stabilisierung der Translationsinitiation. Die

ein kanonisches AUG-Startcodon flankierenden Nukleotide haben einen geringeren Einfluss auf die Translationseffizienz, als die umgebenden Nukleotide bei nicht-kanonischen Startcodons (Kearse & Wilusz, 2017), was die höhere Expression der kurzen hTRPV6-Isoform im Vergleich zur langen Isoform in den Zellmodellen erklären könnte.

Zusammenfassend war die Expression der hTRPV6-Isoformen in den Zellmodellen mittels des TetOne-Systems sehr gut durch die Behandlung der Zellen mit dem Induktor Doxyzyklin regulierbar. Eine unspezifische hTRPV6-Basalexpression („leakiness“) konnte nicht detektiert werden. Insgesamt wurde in den entwickelten Überexpressionsmodellen eine sehr gute Standardisierung der rekombinanten hTRPV6-Expression erreicht, was grundlegend für die vergleichenden Funktionsanalysen der hTRPV6-Ionenkanäle in den Zellmodellen mit Expression der kurzen gegenüber der langen hTRPV6-Isoform war.

4.2 Vergleichende Funktionsanalysen der hTRPV6-Isoformen im Überexpressionsmodell

Durch die Auswahl experimenteller Parameter, die den Strom durch die Ca^{2+} -selektiven TRPV6-Ionenkanäle beeinflussen, wurde das Ziel verfolgt, funktionelle Unterschiede zwischen den Eigenschaften der Isoformen der hTRPV6-Ionenkanäle zu analysieren. Dies geschah unter der Annahme, dass der um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminale Anteil die intrinsischen Eigenschaften der langen hTRPV6-Isoform beeinflusst. Der für die Überexpression von hTRPV6-Ionenkanälen entwickelte Calcium-Assay wurde hinsichtlich seiner Sensitivität und Datenreproduzierbarkeit optimiert und evaluiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Ca^{2+} -abhängige, zellphysiologische Prozesse wie Vesikeltransport, Migration und Invasion bei Überexpression der hTRPV6-Ionenkanälen beeinflusst werden und sich dabei Unterschiede zwischen der kurzen und der langen Isoform ergeben.

4.2.1 Der Einfluss der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher auf die Aktivität der hTRPV6-Isoformen

Store-Operated Ca^{2+} Entry, SOCE. Bei Stimulierung von Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionswegen erfolgt typischerweise nach Aktivierung von Oberflächenmembranrezeptoren eine transiente Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern sowie ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem

Extrazellularraum. Durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wird der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom (Store-Operated Ca^{2+} Entry, SOCE) zur Auffüllung der Ca^{2+} -Speicher aktiviert. Die Ca^{2+} -bindenden Proteine STIM1 und STIM2 (stromal interaction molecule 1 und 2) sind als Ca^{2+} -Sensoren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher maßgeblich an der Regulierung des Ca^{2+} -Einstroms beteiligt. STIM1 aktiviert den hochselektiven Ca^{2+} -Orai1-Ionenkanal, einem „ Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel (CRAC)“ und interagiert auch mit den speichergesteuerten, Kationen-permeablen SOC-Kanälen, die aus Orai1-Untereinheiten und TRPC1-Proteinen zusammengesetzt sind (Lopez *et al.*, 2020; Bulla *et al.*, 2019; Soboloff *et al.*, 2012). Die I_{CRAC} -Ionenkanäle sind hochselektiv für Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 1000$), während die I_{SOC} -Kanäle eine geringere Ca^{2+} -Selektivität aufweisen (Krizova *et al.*, 2019). Durch alternatives Spleißen werden unterschiedliche Transkripte bzw. Proteinvarianten von STIM1, STIM2 und Orai1 in verschiedenen Zelltypen gebildet, was zu einer zellspezifischen Variabilität der Regulationsmechanismen des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms führt (Rosado *et al.*, 2016).

Thapsigargin-Behandlung. Die Aktivität des TRPV6-Ionenkanals wird durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ strikt reguliert. Eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirkt einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom durch den TRPV6-Ionenkanal, während eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Inaktivierung des Ionenkanals bedingt. Die Behandlung von Zellen mit Thapsigargin, einem irreversiblen, spezifischen Inhibitor der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), führt über die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu einer Aktivierung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) aus dem Extrazellularraum.

Durch die Thapsigargin-Behandlung wird die Interaktion zwischen STIM1 und Orai1 verstärkt und die Aktivierung der CRAC-Ionenkanäle initiiert (Yeromin *et al.*, 2006). In Prostata-Tumorzellen wurde gezeigt, dass der TRPV6-Ionenkanal durch den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst wird, da eine graduelle Translokation des TRPV6-Ionenkanal an die Plasmamembran durch Thapsigargin-induzierte Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des ER ausgelöst wird (Raphaël *et al.*, 2014).

In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich der TRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom bei einer Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zwischen der kurzen und langen TRPV6-Isoform unterscheidet und ob darauf beruhend ein spezifischer Einfluss des verlängerten N-Terminus der langen hTRPV6-Isoform auf die Eigenschaften des Ionenkanals messbar ist.

Calcium-Imaging. Das bildgebende Verfahren zur Quantifizierung von intrazellulärem Ca^{2+} in lebenden Zellen mittels Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzindikatoren ist eine etablierte Methode zur Analyse von Ca^{2+} -Ionenkanälen. Ionenkanäle schalten zwischen einem Offen- und einem

Geschlossenzustand (gating) im Millisekundenbereich. Für die Bestimmung der hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einströme wurde eine zeitliche Auflösung von 2sec gewählt, wodurch die resultierenden Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich der beiden hTRPV6-Isoformen gut aufgelöst werden konnte. Prinzipiell muss bei einer Analyse der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ berücksichtigt werden, dass dabei das Resultat aller Ca^{2+} -abhängigen Prozesse mit Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zum Zeitpunkt der Messung abgebildet wird. Die parallele Analyse der Kontrollzellen (Zellen ohne Induktion der hTRPV6-Expression) im Vergleich zu Zellen mit induzierter hTRPV6-Expression ermöglichte eine spezifische Bestimmung von durch hTRPV6-Ionenkanäle vermittelte Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Heterolog überexprimierte TRPV6-Ionenkanäle weisen eine konstitutive Aktivität in den Zellmodellen auf (Vennekens *et al.*, 2000). Um die Aktivität der Ionenkanäle dennoch messen zu können, wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) erniedrigt bzw. die Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. Eine anschließende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ auf 2mM führte zu einer Aktivierung der hTRPV6-Ionenkanäle, die durch Calcium-Imaging in den Zellmodellen analysiert wurde (Chow *et al.*, 2007).

Die Aktivität der hTRPV6-Ionenkanäle bzw. die hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einströme wurde über die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bestimmt. In Abhängigkeit der Induktion der hTRPV6-Expression durch unterschiedliche Doxyzyklin-Konzentrationen und einer fünfminütigen Thapigargin-Behandlung (100nM) konnte nachgewiesen werden, dass in den Überexpressionsmodellen funktionelle hTRPV6-Ionenkanäle gebildet wurden, über die ein hTRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgte.

Ein signifikanter Unterschied in der maximalen Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta F_{\text{max}}/F_0$) wurde zwischen der kurzen und der langen hTRPV6-Isoform nicht festgestellt, obwohl die kurze hTRPV6-Isoform 3-fach stärker als die lange Isoform exprimiert wurde. Ein ähnlicher Effekt wurde mit überexprimierten TRPV6-Varianten in HEK293-Zellen beschrieben, in denen eine 5-fach geringere Expression einer langen TRPV6-Variante die gleiche Ca^{2+} -Amplitude im Vergleich zu einer kurzen TRPV6-Variante erzeugte (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Dies könnte auf eine niedrigere Translokationsrate oder geringere Assemblierung von Ionenkanälen der kurzen hTRPV6-Isoform an der Plasmamembran deuten. Aus Sicht der langen TRPV6-Isoform, die sich von der kurzen Isoform nur um den 40 Aminosäuren langen N-terminalen Bereich unterscheidet, wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die lange TRPV6-Isoform aufgrund der verlängerten N-Region möglicherweise eine höhere Effektivität bei der Bindung von Ca^{2+} -Ionen aufweisen könnte.

Die internen Kontrollzellen (0ng/ml Doxyzyklin), bei denen die hTRPV6-Expression der jeweiligen Isoform nicht induziert wurde, zeigten ohne Thapsigargin-Behandlung eine schwache Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die nicht hTRPV6-vermittelt war. Der hier gemessene Anstieg der Fluo-8 Fluoreszenz

wurde vermutlich durch andere Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle erzeugt, die durch das verwendete Messverfahren aktiviert wurden (Inkubation in Ca^{2+} -freiem Medium und anschließende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ auf 2mM). Bei Betrachtung der nicht-induzierten, internen Kontrollzellen unter Thapsigargin-Behandlung fiel auf, dass im Vergleich zu Thapsigargin-freien Bedingungen eine stärkere Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu verzeichnen war. Dies könnte auf den SOCE-Mechanismus bzw. auf endogene CRAC-Ionenkanäle zurückgeführt werden, die durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden.

Bei Thapsigargin-Behandlung und einer Induktion der hTRPV6-Expression mit Doxyzyklin-Konzentrationen von 100ng/ml bzw. 1µg/ml war bei beiden hTRPV6-Isoformen eine signifikant höhere Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollzellen zu beobachten. In den entwickelten Überexpressionsmodellen war somit aufgrund der internen Kontrollzellen sowie der regulierbaren Transgen-Expression eine Unterscheidung zwischen einem hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom von nicht-hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einströmen möglich.

Die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bewirkte einen unterschiedlichen Effekt in den Zellen mit Überexpression der kurzen hTRPV6-Isoformen im Vergleich zu den Zellen mit Expression der langen Isoform. Dies drückte sich nicht in signifikant unterschiedlichen $\Delta F_{\text{max}}/F_0$ -Werten aus, sondern in unterschiedlichen Kurvenverläufen der gemessenen Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Resultate zeigten, dass die lange Isoform der hTRPV6-Ionenkanäle unter Behandlung mit Thapsigargin schneller inaktiviert wurde als die kurze hTRPV6-Isoform. Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere Analyse einer Thapsigargin-Behandlung (1µM) in Abhängigkeit einer 0,5- bzw. 24-stündigen Thapsigargin-Inkubation ergänzt. Ein deutlicher Unterschied zwischen den hTRPV6-Isoformen konnten erst bei einer 24-stündigen Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin-Behandlung der Zellen festgestellt werden. In Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform war der $\Delta F_{\text{max}}/F_0$ -Wert unabhängig von den eingesetzten Thapsigargin-Konzentrationen (1nM und 1µM) sowie der Dauer der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher gleich hoch, d.h. die kurze Isoform des hTRPV6-Ionenkanals wurde durch die Thapsigargin-Behandlung nicht beeinflusst. Dies war in Übereinstimmung mit Ganzzell-Patch-Clamp („whole-cell patch-clamp“) – Untersuchungen von HEK- (human embryonic kidney) and RBL- (at basophilic leukemia) Zellen mit transienter Überexpression der kurzen Isoform des humanen TRPV6-Ionenkanals. Eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher beeinflusste die Aktivität der überexprimierten hTRPV6-Ionenkanäle in beiden Zelllinien nicht (Bödding *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu war bei einer 24-stündigen Thapsigargin-Behandlung in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform die gemessene maximale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant niedriger

als in Thapsigargin-unbehandelten Zellen. Je höher dabei die eingesetzte Thapsigargin-Konzentration war, desto niedriger war der durch die lange hTRPV6-Isoform vermittelte Ca^{2+} -Einstrom bzw. der gemessene $\Delta F_{\text{max}}/F_0$ -Wert. Gegenläufig zu den Ergebnissen der kurzen TRPV6-Isoform zeigte dies eine Inhibition der Aktivität der langen TRPV6-Isoform bei 24-stündiger Thapsigargin-Behandlung an. Die starke Verringerung des über die lange hTRPV6-Isoform vermittelten Ca^{2+} -Einstroms bei hoher Thapsigargin-Konzentration ($1\mu\text{M}$) sowie 24-stündiger Ca^{2+} -Speicherentleerung könnte auf einen spezifischen Inaktivierungsmechanismus der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals hinweisen, an dem der um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminalen Bereich essentiell beteiligt ist.

Bisher ist nur für die kurze Variante des TRPV6-Kanals bekannt, dass die intrazelluläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3, an den Aminosäuren Leu-409, Val-411 und Thr-412, in der Inaktivierung des Ionenkanals involviert ist. In HEK239-Zellen mit Überexpression einer kurzen TRPV6-Variante wurde mit Hilfe von gezielter Mutagenese und Patch-Clamp Versuchen gezeigt, dass der cytoplasmatische N-terminale Bereich nicht an der Inaktivierung des Ionenkanals beteiligt war (Nilius *et al.*, 2002). Für die lange Isoform des TRPV6-Ionenkanals sind in diesem Zusammenhang bisher keine Daten in der Literatur beschrieben.

Aufgrund der im vorliegenden Experiment festgelegten Messpunkte (0,5h und 24h) war nicht ersichtlich, ob die Inaktivierung der langen hTRPV6-Isoform bereits früher als nach einer 24-stündigen Thapsigargin-Behandlung einsetzt. Dazu müsste zukünftig eine höhere zeitliche Auflösung der Messung der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Thapsigargin-Behandlung erfolgen. Weiterhin gilt zu berücksichtigen, dass durch Thapsigargin ein maximaler, nicht-physiologischer speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) erfolgt, da die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) irreversibel gehemmt und damit eine Auffüllung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher verhindert wird. Eine weitere Validierung der Ergebnisse könnte daher unter physiologischeren Bedingungen durchgeführt werden, indem reversible SERCA Inhibitoren, wie beispielsweise Cyclopiazonsäure (CPA) oder Benzohydroquinon (DBHQ), eingesetzt werden (Michelangeli & East, 2011).

Zusammenfassend belegen die gezeigten Resultate, dass in den Überexpressionsmodellen die kurze als auch die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals funktionell exprimiert wurden, wodurch eine vergleichende Funktionsanalyse der beiden Isoformen möglich war. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen signifikante, funktionelle Unterschiede zwischen der kurzen und der langen hTRPV6-Isoform hinsichtlich der Effektivität der TRPV6-vermittelten Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Beeinflussung durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher sowie der damit zusammenhängenden, für die lange hTRPV6-Isoform spezifischen Inaktivierungsmechanismen.

Da sich die kurze hTRPV6-Isoform zur langen Isoform nur durch das Fehlen des 40 AS langen N-terminalen Bereiches unterscheidet und dadurch faktisch eine Deletionsvariante darstellt, ist ersichtlich, dass die zusätzlichen 40 Aminosäuren die spezifischen Eigenschaften der langen hTRPV6-Isoform beeinflussen.

4.2.2 Einfluss der extrazellulären Parameter $[Ca^{2+}]_e$ und pH_e auf den hTRPV6-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom

Auch extrazelluläre Signale, wie die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$) und der extrazelluläre pH-Wert (pH_e), steuern die Aktivität der TRPV6-Ionenkanäle. Die Konzentration von ionisiertem Calcium in der extrazellulären Flüssigkeit sowie im Blut liegt beim Menschen zwischen 1.1 - 1.4 mM Ca^{2+} und wird in diesem Bereich eng kontrolliert (Breitwieser *et al.*, 2008). Der extrazelluläre pH-Wert erreicht in normalem Gewebe und Blutplasma einen Wert von 7.2 - 7.5, wobei abhängig von der Organfunktion auch davon abweichende pH-Werte charakteristisch sind (Pankreassaft, pH 8,2; Magenlumen pH bis \approx 1).

In verschiedenen Mausmodellen, in denen inaktivierende Mutationen der TRPV6-Kanäle eingefügt wurden, ein Knock-out des Vitamin D Rezeptors (VDR) erfolgte oder heterolog das humane *TRPV6*-Gen überexprimiert wurde bzw. eine Expression von hTRPV6 und gleichzeitigem knock-out des VDR erfolgte, wurde nachgewiesen, dass der TRPV6-Ionenkanal den apikalen Ca^{2+} -Einstrom in die Enterozyten vermittelt (Cui *et al.*, 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass der durch TRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in Kolonozyten in Abhängigkeit der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird, wobei eine durch den aktivierten calciumsensitiven Rezeptor CaSR (calcium sensing receptor) vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Inaktivierung der TRPV6-Ionenkanäle führte (Lee *et al.*, 2019).

$[Ca^{2+}]_e$. Der Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$) auf die Aktivität der beiden hTRPV6-Isoformen wurde über eine fünfminütige sowie eine 24-stündige Kultivierung der Zellen unter Ca^{2+} -freien-Bedingungen und bei $[Ca^{2+}]_e$ von 0,6mM, 1,25mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM analysiert. Auffällig war, dass in den nicht-induzierten Kontrollzellen, die die hTRPV6-Ionenkanäle nicht exprimieren, eine steigende $[Ca^{2+}]_e$ zu einem Anstieg der $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte führte. Die gemessene Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) ist in den Kontrollzellen nicht hTRPV6-vermittelt. Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_e$ kann den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) aktivieren. In einer Analyse von primären Osteoblasten der Ratte wurde über eine ähnliche Inkubation mit verschiedenen $[Ca^{2+}]_e$ nachgewiesen, dass eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -

Konzentration zu einer Induktion von SOCE in Abhängigkeit einer Aktivierung des calciumsensitiven Rezeptor CaSR/PLC/IP3-Signalweges führte (Hu *et al.*, 2014).

In Zellen mit induzierter Expression der kurzen oder langen hTRPV6-Isoform resultierte eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_e$ nach einem kurzen Peak in einem langsamen Abklingen der $[Ca^{2+}]_i$ in beiden hTRPV6-Zellmodellen. Die $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte waren bei $[Ca^{2+}]_e$ von 0,6mM bis 20mM signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Dies bedeutet, dass zusätzlich zu dem SOCE-bedingten Ca^{2+} -Einstrom ein zusätzlicher hTRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom zu detektieren war. Zwischen den beiden hTRPV6-Isoformen war allerdings kein signifikanter Unterschied in der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit zur $[Ca^{2+}]_e$ festzustellen, der auf eine spezifische Beteiligung des 40 AS langen N-terminalen Bereiches hinweisen würde. Erst bei einer 24-stündigen Inkubation in $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM war eine fast vollständige, signifikante Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Basislinie zu detektieren, d.h. sowohl der hTRPV6-vermittelte als auch der SOCE-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom war inhibiert. Der inhibitorische Effekt war bei den Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform stärker als bei Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform.

Die Analysen zeigten keinen vergleichbar großen Unterschied, der zuvor zwischen den hTRPV6-Isoformen bei der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher nachgewiesen wurde. Der einzige auffällige Unterschied war eine stärkere Inaktivierung der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals bei einer 24-stündigen Inkubation in Medium mit einer $[Ca^{2+}]_e$ von 5mM.

pH_e. Bei allen bisher analysierten Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen wurde eine gleiche grundlegende pH-Sensitivität festgestellt. Eine extrazelluläre Azidifikation reduziert und eine Alkalisierung erhöht den einwärts gerichteten Ca^{2+} -Einstrom. Ein allgemein verbreiteter Ca^{2+} -Einstrom-Mechanismus in Säugetierzellen ist der speichergetriebene Ca^{2+} -Einstrom (SOCE), der durch einen niedrigen extrazellulären pH-Wert verringert wird. Die hohe pH-Sensitivität ist für verschiedene physiologische Prozesse von Bedeutung, beispielsweise für die Aktivierung von Immunzellen oder die Mineralisierung von Odontoblasten. Die auf der Azidifikation beruhende Inhibition der CRAC-Kanäle stellt einen essentiellen Faktor in der Aktivierung von Immunzellen dar (Beck *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2018). Häufig sind veränderte Ca^{2+} -Signale und pH-Werte aber auch mit pathologischen Zuständen, wie beispielsweise Tumoren, korreliert. Die Tumormikroumgebung vieler Tumore liegt im sauren pH-Bereich zwischen 6.5 to 6.9 (Glitsch, 2011).

In elektrophysiologischen Untersuchungen mit Überexpression des TRPV6-Kanals der Ratte wurde die Inhibition der TRPV6-Aktivität bei einem pH-Wert von 6,0 im Vergleich zu einem pH-Wert von 7,4 nachgewiesen (Vennekens *et al.*, 2001). Extrazelluläre Protonen bewirkten eine Hemmung

des zu 75% homologen TRPV5-Ionenkanals in „whole patch-clamp“ Versuchen mit Überexpression in CHO-Zellen durch eine Konformationsänderung des Kanalproteins (Yeh *et al.*, 2003).

Die kurzzeitige, 0,5-stündige Inkubation der hTRPV6-Zellen sowie der CHO-K1-Kontrollzellen, die keine TRPV6-Ionenkanäle exprimieren, in Medium mit einem pH_e von 6, 7,4 oder 8,5 führte zu den erwarteten Resultaten. Bei extrazellulären, sauren pH-Werten war der durch die hTRPV6-Ionenkanäle-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in den Zellmodellen signifikant geringer als bei neutralen pH-Werten. Im Gegensatz dazu war bei extrazellulären, alkalischen Bedingungen der hTRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom gegenüber neutralen pH-Werten in allen Zellmodellen signifikant erhöht. In den CHO-K1-Kontrollzellen beruhten die gemessenen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$, vermutlich auf dem I_{CRAC} . Dieser war entsprechend der Angaben in der Literatur bei einem niedrigen pH-Wert von 6,0 inaktiviert. Im Vergleich zu den Zellen mit induzierter Überexpression der hTRPV6-Isoformen war der spezifische, durch die hTRPV6-Ionenkanäle vermittelte Ca^{2+} -Einstrom von dem Ca^{2+} -Eintrag durch SOCE bei den Messungen sehr gut zu unterscheiden. Die $\Delta F_{max}/F_0$ -Werte der Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform waren bei einem pH_e von 8,5 höher als in Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform, was auf eine unterschiedliche Regulierung der hTRPV6-Ionenkanalisformen hinweist. Bei der 24-stündigen Messung in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher war in beiden hTRPV6-Zellmodellen die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ bei pH 8,5 deutlich reduziert und sank unter die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ bei pH 7,4. Die Kurvenverläufe der gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zwischen den beiden TRPV6-Zellmodellen waren deutlich unterschiedlich. In Zellen mit Expression der langen hTRPV6-Isoform fiel bei einem pH_e von 7,4 und Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher die Fluo-8-Intensität schneller ab als in Zellen mit Expression der kurzen TRPV6-Isoform. Dies zeigt, dass die lange Isoform des hTRPV6 unter den experimentellen Parametern schneller inaktiviert wurde.

4.2.3 Vergleichende Analysen der subzellulären Lokalisation und Vesikelverteilung der hTRPV6-Isoformen

Exocytotische- sowie endocytotische Transportwege sind in der Zelle für den Vesikeltransport (vesicle trafficking) verantwortlich. Zwei Proteinklassen sind hierbei hauptsächlich in den intrazellulären Transport von Vesikeln involviert: SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) und Rab-Proteine (Ras-related in brain). Rab-GTPasen weisen eine spezifische Lokalisation sowie Funktion in den unterschiedlichen Endosomen auf und eignen sich daher als Markerproteine für die Untersuchung von Proteinen und deren

Vesikeltransport in der Zelle (Stenmark, 2009). Beispielsweise assoziiert das Rab5-Protein mit frühen Endosomen, während Rab7 den Transport vom späten Endosom zum Lysosom reguliert. Rab11 ist in den Transport von Recycling-Vesikeln an die Plasmamembran involviert (de Souza & Ambudkar, 2014).

Der Transport der TRP-Ionenkanäle an die Plasmamembran ist eine vergleichbar wichtige Einflussgröße für die Kanal-Funktion wie das Kanalschaltverhalten („gating“) und die Permeationsmechanismen von Ionen. Für verschiedene Mitglieder der TRP-Ionenkanal-Familie wurde der Einbau der Ionenkanäle aus intrazellulären Vesikeln nach deren Translokation in die Plasmamembran beschrieben. Eine kontrollierte Translokation von Ionenkanälen mit konstitutiver Aktivität ist ein wichtiger Aspekt in der Regulierung des Ca^{2+} -Einstroms durch die Ionenkanäle und der dadurch gesteuerten Ca^{2+} -sensitiven Signalwege.

Zwischen dem TRPV6-Ionenkanal und der GTPase Rab11a erfolgt eine direkte Interaktion, die zur Translokation von TRPV6 aus Recycling-Endosomen an die Plasmamembran und dadurch zur Modulation der Ionenkanalaktivität führt (van de Graaf *et al.*, 2006 b). Darüber hinaus wurde in Pankreas-Tumormodellen nachgewiesen, dass die Translokation der hTRPV6-Proteine an die Plasmamembran über den Orai1/TRPC1-vermittelten Ca^{2+} -abhängigen Annexin I/S100A11-Signalweg beeinflusst wird (Raphaël *et al.*, 2014).

Weiterhin wurde für den homologen TRPV5-Ionenkanal eine Translokation an die Plasmamembran in einem HEK293-Zellmodell beschrieben, die bei erhöhten extrazellulären pH-Werten beschleunigt war und zu einer Membranfusion nach dem sogenannten „Kiss and Linger“-Mechanismus führte (Lambers *et al.*, 2007). Die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und einem dadurch induzierten Orai1-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom beeinflusste die Translokation des TRPC1-Kanals an die Plasmamembran (Cheng *et al.*, 2011). Eine kontrollierte Translokation von Ionenkanälen mit konstitutiver Aktivität, eine spezifische Eigenschaft der TRPV5- und TRPV6-Ionenkanäle, ist ein wichtiger Aspekt in der Regulierung des Nettoergebnisses des Ca^{2+} -Einstroms durch die Ionenkanäle und der dadurch gesteuerten Ca^{2+} -sensitiven Signalwege. Der Transport der TRPV6-Proteine an die Plasmamembran ist daher ein wichtiger Schritt in der Regulation des über die TRPV6-Ionenkanäle vermittelten Ca^{2+} -Einstroms.

Auf der Basis der mCherry-Fluoreszenz der hTRPV6-mCherry-Fusionsproteine und Rab-spezifischen Antikörper wurde die Kolo-kalisation der hTRPV6-Isoformen mit den endosomalen Markerproteinen Rab5, Rab7 und Rab11 sowie die Verteilungsmuster hTRPV6-positiver Vesikel analysiert. Um mögliche Funktionsunterschiede zwischen der kurzen im Vergleich zur langen hTRPV6-Isoform zu untersuchen, wurden dieselben experimentellen Parameter wie beim Calcium-Imaging der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eingesetzt (Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_e$, Thapsigargin-Behandlung, pH_e).

Subzelluläre Lokalisation und Kolokalisation mit Rab7 und Rab11. Die heterologe Expression der beiden mit mCherry-fusionierten TRPV6-Isoformen zeigte ein sehr ähnliches subzelluläres Lokalisationsmuster. Beide exprimierten Isoformen waren überwiegend in intrazellulären, vesikulären Strukturen lokalisiert, was auch in anderen Überexpressionsmodellen von TRPV6 beschrieben wurde (Hellwig *et al.*, 2005). Bei beiden hTRPV6-Isoformen konnte keine bzw. nur geringe Lokalisation an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Dies könnte einen generellen Regulationsmechanismus der Zelle darstellen, bei dem die TRPV6-Ionenkanäle abhängig von physiologischen Signalen nur temporär in Vesikeln an die Plasmamembran transloziert werden. In diesem Kontext konnten Bezzerides und Kollegen mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie, Oberflächenbiotinylierung und Patch-Clamp-Versuchen an transfizierten HEK293-Zellen sowie primären Neuronen nachweisen, dass der TRPC5-Kanal infolge der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF innerhalb von 2min an die Plasmamembran transportiert wird (Bezzerides *et al.*, 2004).

Die Resultate der Kolokalisationsstudien zeigten im Vergleich zwischen kurzer und langer hTRPV6-Isoform, dass die kurze Isoform des hTRPV6-Kanals stärker mit dem Rab7 kolokalisierte, während die lange hTRPV6-Isoform eine stärkere Kolokalisation mit Rab11 aufwies. Die GTPase Rab7 vermittelt die Reifung später Endosomen und Phagosomen als auch deren Fusion mit Lysosomen. Rab11 vermittelt das langsame Recycling durch die Recycling-Endosomen, die über das Trans-Golgi-Netzwerk bzw. über perinukleäre Recycling-Endosomen zur Plasmamembran transportiert werden. Recycling-Endosomen sind typischerweise im Zytoplasma verteilt, lokalisieren aber in höherer Konzentration in der perinukleären Region (Stenmark, 2009). Die Unterschiede in den Kolokalisationsstudien könnten darauf hinweisen, dass sich der Vesikeltransport zwischen den beiden hTRPV6-Isoformen unterscheidet. Das könnte bedeuten, dass eine spezifische Translokation der langen hTRPV6-Isoform zu einer effektiveren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zur kurzen Isoform führt (siehe Kapitel 3.4.1). Da der Vesikeltransport ein sehr dynamischer Prozess ist, war die zeitliche und räumliche Auflösung in diesem Experiment nicht hoch genug, um die Ergebnisse weitergehend interpretieren zu können. Durch eine Inhibierung von Rab7 oder Rab11 und anschließendem Calcium-Imaging könnten funktionelle Unterschiede zwischen den beiden hTRPV6-Isoformen in diesem Zusammenhang weitergehend dargestellt werden.

Vesikelverteilung bei Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher sowie Änderung der $[Ca^{2+}]_e$ und des pH_e . Für die vergleichenden Analysen zwischen der kurzen und langen hTRPV6-Isoform wurden die Verteilungsmuster sowie die Größe der hTRPV6-positiven Vesikel in Abhängigkeit einer Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher sowie einer Änderung der $[Ca^{2+}]_e$ und des pH_e untersucht.

Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher. Bei Inhibierung von SERCA durch den Thapsigargin-Stimulus findet kein SERCA-vermittelter Ca²⁺-Einstrom in das ER statt. Da die Calcium-Imaging Ergebnisse zeigten, dass die lange TRPV6-Isoform unter Behandlung mit Thapsigargin schneller inaktiviert wurde als die kurze hTRPV6-Isoform (siehe Kapitel 3.4.2), wurde die subzelluläre Verteilung und die Größenverteilung der Vesikel vergleichend analysiert. Der einzige, detektierbare Effekt bei dieser Analyse war eine Reduktion der hTRPV6-mCherry positiven Vesikel mit einer Größe <1µm² sowie die Bildung größerer Vesikel bis zu >6µm². Eine verringerte Anzahl von Vesikeln könnte im Zusammenhang mit dem Inaktivierungsmechanismus stehen. Allerdings war zwischen der kurzen und langen hTRPV6-Isoform diesbezüglich kein Unterschied zu erkennen.

[Ca²⁺]_e. Im Vergleich zwischen Vesikeln, die die kurze hTRPV6-Isoform beinhalten zu Vesikeln, die positiv für die lange hTRPV6-Isoform waren, wurde eine unterschiedliche Vesikelanzahl als auch ein deutlich verändertes subzelluläres Verteilungsmuster beobachtet. Mit steigender [Ca²⁺]_e nahm die Vesikelanzahl der kurzen hTRPV6-Isoform um das 6-fache ab. Gleichzeitig erhöhte sich die Vesikelgröße und die Vesikel lagerten sich verstärkt an der Zellperipherie an. Ob die verringerte Vesikelanzahl ursächlich an dem reduzierten Ca²⁺-Einstrom bei 5mM [Ca²⁺]_e oder nur eine Folge davon war, konnte in diesem experimentellen Set-up nicht aufgelöst werden. Im Gegensatz dazu stieg bei der langen hTRPV6-Isoform die Vesikelanzahl mit zunehmender [Ca²⁺]_e an. Die Vesikel waren bei erhöhter [Ca²⁺]_e nicht an der Peripherie der Zelle lokalisiert, sondern in der Nähe des Zellkerns. Im Calcium-Imaging Experiment war in Zellen mit Expression der langen TRPV6-Isoform bei einer 24-stündigen Kultivierung in [Ca²⁺]_e von 5mM der hTRPV6-vermittelte Ca²⁺-Einstrom nahezu vollständig inhibiert. Dies würde in Bezug auf die Vesikelverteilung bedeuten, dass entweder keine TRPV6-positiven an die Plasmamembran transportiert oder die TRPV6-Ionenkanäle an der Plasmamembran inhibiert wurden. Für eine genaue Aussage über die Bedeutung des veränderten Verteilungsmusters bei [Ca²⁺]_e von 5mM müssten umfassendere Rab-GTPase-Kolokalisationsstudien oder eine Inhibierung einzelner Komponenten des Vesikeltransportsystems erfolgen.

pH_e. In Studien zum Vesikeltransport des TRPV5-Ionenkanals wurde bei extrazellulären, alkalischen pH-Werten eine verstärkte Rekrutierung der TRPV5-positiven Vesikel an die Plasmamembran nachgewiesen, was insgesamt zu einem erhöhten TRPV5-vermittelten Ca²⁺-Einstrom in die Zellen führte. Bei aziden pH-Werten wurden im Gegensatz dazu verstärkt TRPV5-positiv Vesikel aus der Membran entfernt, wodurch eine Verringerung des TRPV5-vermittelten Ca²⁺-Einstroms resultierte (Lambers *et al.*, 2007). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Vesikelverteilung bei einem pH_e von 8,5 wurde keine verstärkte Lokalisation

der Vesikel an der Plasmamembran detektiert. In beiden Zellmodellen nahm die Vesikelanzahl deutlich ab, die Vesikel waren stark vergrößert und füllten das gesamte Cytoplasma aus. Bei den vergrößerten Vesikeln in den hTRPV6-Zellen könnte es sich um vergrößerte Endosomen bzw. Fusionen von Endosomen handeln, die möglicherweise aufgrund der hTRPV6-Überexpression und dem alkalischen pH-Wertes im Cytoplasma durch eine gestörte Reifung der Endosomen entstehen könnten. Durch Rab-spezifische Antikörper könnte überprüft werden, ob sich bei den großen Vesikeln um Fusionen aus verschiedenen Endosomen handelt.

4.3 NFAT-Aktivierung, Migration und Invasion bei hTRPV6-Überexpression

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren reguliert verschiedene zelluläre Funktionen wie das Überleben, die Proliferation, die Migration, die Invasion und die Angiogenese. Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren (nuclear factor of activated T cells) besteht aus fünf Mitgliedern, NFAT1–5, von denen NFAT1-4 durch einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aktiviert werden, entweder über Aktivierung des PLC- γ -Signalweges oder des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE). Die NFAT-Isoformen 1-4 liegen im Zytoplasma in inaktivem, hyperphosphoryliertem Zustand vor. Intrazelluläres, freies Ca^{2+} bindet in der Zelle an den Calciumsensor Calmodulin, welcher wiederum die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Diese dephosphoryliert NFAT, was zur Freilegung des Kernlokalisierungssignalpeptids und somit zum Transport des NFAT in den Zellkern führt. Im Zellkern interagiert NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren, um die Transkription der Zielgene zu initiieren. In verschiedenen Tumoren sind NFAT-Transkriptionsfaktoren konstitutiv aktiviert bzw. überexprimiert (Rao *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2014). In Prostata Tumoren wird vermutlich der NFAT Promoter durch einen TRPV6-vermittelten Ca^{2+} Einstrom verstärkt aktiviert (Lehen'kyi *et al.*, 2007). Eine weitere NFAT-Aktivierung kann durch eine NFAT-basierte positive Rückkopplung erzeugt werden, was über eine Aktivierung von IP3 zur Auslösung eines speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms durch CRAC-Ionenkanäle und in Folge zur weiteren Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs führt. Eine Hemmung der Phosphatase Calcineurin oder die Rephosphorylierung von NFAT führt dagegen zu einer Reduktion der NFAT-Aktivität (Qin *et al.*, 2014).

Da in den entwickelten hTRPV6-Zellmodellen eine regulierbare Überexpression der hTRPV6-Isoformen induziert werden kann und die lange hTRPV6-Isoform durch den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst wurde (siehe Kapitel 3.4.2), wurde eine mögliche Aktivierung des NFAT-Signalwegs mit Hilfe eines Luciferase-basierten Reporterassays analysiert. Die

Resultate zeigten, dass durch eine Überexpression der hTRPV6-Isoformen eine Aktivierung des NFAT-Signalweges erfolgte. Dabei führte die Expression der kurzen hTRPV6-Isoform zu einem 4-fachen Anstieg der NFAT-Aktivität, während die Expression der langen hTRPV6-Isoform zu einem 2-fachen Anstieg der NFAT-Aktivität führte. Da die NFAT-Aktivierung Ca^{2+} -abhängig ist, würden die Resultate anzeigen, dass in den Zellen mit Expression der kurzen Isoform ein höherer hTRPV6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom erfolgt. Die kurze hTRPV6-Isoform war zwar 3-fach stärker als die lange hTRPV6-Isoform in dem Zellmodell exprimiert, aber die maximale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war zwischen der kurzen und der langen Isoform nicht signifikant unterschiedlich (siehe Kapitel 3.4.1). Da in den vorlaufenden Experimenten gezeigt wurde, dass die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals nach einem Ca^{2+} -Einstrom schneller als die kurze Isoform inaktiviert wurde, könnte dadurch eine geringere NFAT-Aktivierung resultieren. In Abgrenzung zu den beschriebenen Resultaten hatten Thebault *et al.* gezeigt, dass die Proliferation von primären Prostatakrebszellen durch einen SOCE-unabhängigen Ca^{2+} -Einstrom und eine anschließende Aktivierung des NFAT-Transkriptionsfaktors angetrieben wird (Thebault *et al.*, 2006). Auch Lehen'kyi und Kollegen konnten in LNCaP-Zellen mit endogener TRPV6-Expression zeigen, dass der TRPV6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom an der Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen NFAT-Transkriptionsfaktors beteiligt ist. Sie postulierten daher, dass der TRPV6-Kanal durch den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und eine anschließende Aktivierung des NFAT-Signalwegs in die erhöhte Proliferation der Prostatakrebs-LNCaP-Zellen involviert sein könnte (Lehen'kyi *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu wurde in dem hTRPV6-Überexpressionsmodell bei Induktion der hTRPV6-Expression keine erhöhte Proliferation gemessen. In diesem Zusammenhang muss der unterschiedliche zelluläre Hintergrund berücksichtigt werden. Die unterschiedliche NFAT-Aktivierung belegte einen weiteren, signifikanten Unterschied zwischen der kurzen und der langen hTRPV6-Isoform, der auf eine spezifische Funktion des um 40 Aminosäuren längeren N-Terminus hinweist.

Die Expression des *TRPV6*-Gens ist im Vergleich zum Normalgewebe in Brust-, Darm-, Eierstock- sowie Prostata- und Schilddrüsenkrebs erhöht. Neben der veränderten Genexpression wurden erhöhte Konzentrationen des TRPV6-Proteins auch in kanzerogenem Gewebe der betroffenen Organe nachgewiesen. Bei fortgeschrittenem Prostatakrebs korrelierte die TRPV6-Überexpression mit den Gleason-Scores, einem klinischen Beurteilungssystem der Malignität von Prostatakarzinomen. Eine gesteigerte TRPV6-Expression war dementsprechend auch in den Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 detektierbar (Hirnet *et al.*, 2003; Bödding, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2010). Weiterhin wurde in Brustkarzinomen eine 2- bis 15-fach erhöhte TRPV6-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu gesundem Brustgewebe gemessen (Prevarskaya *et al.*, 2010). Das TRPV6-Protein lokalisierte in 93% der Biopsien vermehrt in den

invasiven Bereichen des Tumors (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Brustkarzinome mit erhöhter TRPV6-Expression klassifizieren klinisch in den basalen Subtyp und sind Östrogen-Rezeptor-negativ. Die erhöhte TRPV6-Expression korreliert mit einer schlechteren Überlebensrate der Patientinnen im Vergleich zu Patientinnen mit niedrigerer TRPV6-Expression (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2014).

Die Mechanismen, die zur Überexpression des *TRPV6*-Gens führen, als auch die Rolle des TRPV6-Kanals in der Tumorprogression sind nur in wenigen Aspekten erforscht. Die rekombinante Überexpression des TRPV6-Gens führte zu einer erhöhten Apoptose-Resistenz in der Prostatakrebszelllinie LNCaP, die zur Induktion der Apoptose mit 1µM Thapsigargin sowie 20µM Cisplatin behandelt wurde (Raphaël *et al.*, 2014). Weiterhin führte die stabile Expression von TRPV6 in HEK293-Zellen zu einer erhöhten Proliferation der Zellen führte (Schwarz *et al.*, 2006), während der „Knockdown“ von endogenem TRPV6 in der Prostatakrebszelllinie LNCaP bzw. der Brustkrebszelllinie T-47D eine verringerte Proliferation verursachte (Lehen'kyi *et al.*, 2007; Bolanz *et al.*, 2008). Der Zusammenhang zwischen der TRPV6-Expression und der Migration als auch der Proliferation wird widersprüchlich in der Literatur diskutiert. Während Peter *et al.*, eine Erhöhung der Migration infolge des Knockdowns von endogenem TRPV6 in der Brustkrebszelllinie T-47D beobachteten (Peters *et al.*, 2012), wiesen Dhennin-Duthille *et al.*, in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 eine reduzierte Migrationsrate infolge des TRPV6-Knockdowns (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011) nach. In den Brusttumorzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wurde kein Einfluss der TRPV6-Expression auf das Proliferationsverhalten der Zellen ermittelt (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu beobachteten Bolanz *et al.*, eine Abnahme der Zellproliferation infolge des Knockdowns von endogenem TRPV6 in T-47D Zellen (Bolanz *et al.*, 2008).

In diesem Kontext wurde im Rahmen dieser Arbeit das hTRPV6-Überexpressionsmodell eingesetzt, um das Migrationspotenzial und die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen bei induzierter hTRPV6-Expression zu analysieren. Dabei stand vor allem der Vergleich der kurzen hTRPV6-Isoform zur langen Isoform im Vordergrund, um mögliche Auswirkungen der zusätzlichen 40 Aminosäuren des N-Terminus auf Funktionseigenschaften des hTRPV6-Ionenkanals zu identifizieren. Die Resultate des Migrationsassays zeigten, dass sowohl Zellen mit Expression der kurzen hTRPV6-Isoform als auch Zellen, die die lange hTRPV6-Isoform exprimierten, eine signifikant erhöhte Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zu Zellen ohne TRPV6-Expression aufwiesen. Der Unterschied zwischen dem Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit bei der kurzen und der langen TRPV6-Isoform war allerdings nicht sehr stark ausgeprägt. Die Resultate stimmten zumindest tendenziell mit den Beobachtungen von

Dhennin-Duthille überein, welche eine 52%ige (MDA-MB-231) bzw. 40%ige (MCF-7) Reduktion der Migration infolge des TRPV6-Knockdowns erhielten (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Zu berücksichtigen ist dabei, dass im Überexpressionsmodell in der vorliegenden Arbeit CHO-K1-Zellen als zellulärer Hintergrund eingesetzt sind. Im Gegensatz dazu sind die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 Brusttumorzelllinien. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist daher aufgrund des unterschiedlichen zellulären Hintergrundes nur sehr begrenzt möglich. Bei der Analyse der Verdopplungszeit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression der hTRPV6-Isoformen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat (siehe Kapitel 3.3.5). Dies war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des durchgeführten Migrationsassays, in dem die Zellen mit Expression der kurzen bzw. oder langen hTRPV6-Isoform keine erhöhte Teilungsrate aufwiesen.

Da durch die Überexpression der hTRPV6-Isoformen die NFAT-Aktivierung und die Migrationsgeschwindigkeit erhöht war, wurde weitergehend untersucht, ob die Überexpression der hTRPV6-Isoformen auch das Invasionspotenzial der Zellen beeinflusst. Die Analyse der Zellen in einem 3D-Matrix-Invasionsassay zeigten in einem Zeitraum von 120h keinen signifikanten Einfluss der überexprimierten hTRPV6-Isoformen auf das Invasionspotenzial der Zellen. Im Gegensatz dazu beschreiben Dhennin-Duthille und Kollegen, dass sich das Invasions-/Migrationsverhältnis von MDA-MB-231-Zellen, die den TRPV6-Ionenkanal endogen exprimieren, infolge einer siRNA-Behandlung in einem Transwell-Invasionsassay von 33% auf 5% reduziert (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Die MDA-MB-231-Brustkrebs-Zelllinie repräsentiert den Triple-negativen Subtyp, der ein hohes Metastasierungspotenzial besitzt. In Tumoren, in denen eine aberrante Aktivität von NFAT vorliegt, sind eine Vielzahl von NFAT-Zielgenen mit Funktionen im Zellzyklus dereguliert, die insgesamt zu dem Invasionsverhalten der Zellen beitragen. Da die CHO-K1 Zellen des Überexpressionsmodells nicht invasiv sind, fehlen den CHO-Zellen die transformierenden Eigenschaften von Tumorzellen. In Gen-Ontologie- und „Pathway“-Analysen mit 325 Genen, die in Genexpressionsanalysen von Tumoren mit NFAT-Deregulation einen mindestens 2-fachen Unterschied in der Expressionshöhe zeigten, wurden eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert, die in der Invasion der triple-negativen Brusttumoren beteiligt sind (Quang *et al.*, 2015). Das hTRPV6-Überexpressionsmodell könnte als geeignetes Testmodell eingesetzt werden, um die einzelnen Kandidatengene in den hTRPV6-Zelllinien zu co-exprimieren und das Invasionspotenzial zu überprüfen.

4.4 Vergleich von IC₅₀-Werten der Inhibitoren Ruthenium Red, La³⁺, 2-APB und SOR-C13 in den hTRPV6-Zellen

Für einen pharmakologischen Vergleich der kurzen und der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals wurden die entwickelten hTRPV6-Zellmodelle mit vier bekannten TRPV6-Antagonisten (Ruthenium Red, La³⁺, 2-APB, SOR-C13) behandelt und Dosis-Wirkungskurven erstellt. Ruthenium Red (RR), Lanthan (La³⁺) und 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborat) sind unspezifische TRPV6-Antagonisten, die neben der Inhibition des TRPV6-Ionenkanals auch andere TRP- und weitere Ionenkanäle beeinflussen können. Im Gegensatz dazu ist das eingesetzte Peptid SOR-C13 der einzige, aktuell verfügbare TRPV6-spezifische Inhibitor.

Nach Behandlung der hTRPV6-Zellen mit den Antagonisten wurden die Zellen entsprechend des etablierten Messprotokolls in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert und anschließend die Ionenkanäle durch eine Erhöhung der [Ca²⁺]_e auf 2mM aktiviert. Die Dosis-Wirkungskurven wurden auf Basis der gemessenen, maximalen Änderungen der Fluo-8-Intensität erstellt und die Potenz der Wirkstoffe (IC₅₀-Werte) sowie die Effizienz (Maximalwirkung) bestimmt (Tabelle 13).

Bei Betrachtung der Effizienzen der vier Antagonisten war auffällig, dass nur der Inhibitor 2-APB den Ca²⁺-Einstrom um 90% inhibierte, während Ruthenium Red, La³⁺ und SOR-C13 den Ca²⁺-Einstrom lediglich um etwa 50% inhibierten. 2-APB hat eine antagonistische Wirkung für die Ionenkanäle TRPV6, TRPM2, TRPM7, TRPC3, TRPC6 und TRPC7. Weiterhin inhibiert 2-APB aber auch den IP3-Rezeptor im ER und moduliert „store-operated“ Ca²⁺-Ionenkanäle (Oh-Hora *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2018). Bei der Aktivierung der hTRPV6-Ionenkanäle werden durch den Wechsel von Ca²⁺-freien Bedingungen zu einer [Ca²⁺]_e von 2mM auch andere Ca²⁺-permeable Ionenkanäle, wie beispielsweise die „store-operated“ Ca²⁺-Ionenkanäle, aktiviert. Da 2-APB diese Kanäle inhibiert, resultiert bei der Messung der [Ca²⁺]_i eine höhere Effizienz. Im Gegensatz dazu hemmen die Antagonisten Ruthenium Red, La³⁺ und SOR-C13 die oben genannten Ca²⁺-permeablen Ionenkanäle nicht, so dass deren Ca²⁺-Einstrom bei der Messung der Änderungen der Fluo-8-Intensität auch erfasst wird. Die Messung von nicht durch hTRPV6-vermitteltem Ca²⁺-Einstrom wurde auch bei der Analyse der [Ca²⁺]_i von Kontrollzellen ohne Expression der hTRPV6-Ionenkanäle beobachtet (siehe Kapitel 3.4.1).

Die Analyse der Dosis-Wirkungskurven ergab folgende Rangfolge der IC₅₀-Werte der Antagonisten für die kurze Isoform des hTRPV6-Ionenkanals: SOR-C13 > Lanthan > Ruthenium Red > 2-APB. Die ermittelten IC₅₀-Werte stimmten mit den Literaturwerten weitgehend überein (Bowen *et al.*, 2013; Hofer *et al.*, 2013; Kovacs *et al.*, 2012; Hoenderop *et al.*, 2001).

Die Rangfolge der IC₅₀-Werte für die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals war SOR-C13 > Ruthenium Red > Lanthan > 2-APB. Da bislang noch keine pharmakologischen Untersuchungen der langen hTRPV6-Isoform durchgeführt wurden, konnten keine Literaturwerte zum Vergleich herangezogen werden.

Die IC₅₀-Werte für die unspezifischen TRPV6-Antagonisten 2-APB, Ruthenium Red und La³⁺ korrelieren sehr gut mit den Werten aus der Literatur. Für die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals sind keine IC₅₀ veröffentlicht, da bisher in den Testsystemen die kurze TRPV6-Isoform eingesetzt wurde. Bei einem Vergleich der IC₅₀-Werte und Effizienzen der drei Antagonisten zwischen der kurzen und der langen hTRPV6-Isoform zeigten die Resultate keinen signifikanten Unterschied.

SOR-C13 ist ein synthetisches Tridekamer-Peptid, abgeleitet vom C-Terminus des paralytischen Peptids Soricidin, das zurzeit als einziger TRPV6-spezifischer Inhibitor zur Verfügung steht. Durch Patch-Clamp-Untersuchungen an HEK293-Zellen, die heterolog den TRPV6-Ionenkanal exprimierten, wurde nachgewiesen, dass das Peptid den Ca²⁺-Einstrom durch den Ionenkanal inhibiert. Bowen und Kollegen konnten zwar nicht zeigen, an welche Position im TRPV6-Kanal das Peptid bindet, aber dass sich der Ionenkanal bei Bindung des Peptids in einer offenen Konfiguration befindet (Bowen *et al.*, 2013). Mit dem SOR-C13 Peptid wurde eine klinische Phase I Studie zur Bestimmung der maximal verträglichen Dosis an Patienten mit fortgeschrittenen epithelialen Tumoren durchgeführt. Die Studie zeigte, dass SOR-C13 bis 6,2 mg/kg gut verträglich war. Das beste Ergebnis beruhte in einer 27%igen Reduktion eines Pankreastumors (Fu *et al.*, 2017).

Für den TRPV6-spezifischen Inhibitor SOR-C13 wurde in der vorliegenden Arbeit eine IC₅₀-Potenz von 21 ± 6nM sowie eine Effizienz von 57% für die kurze Isoform des hTRPV6-Ionenkanals ermittelt. Die Werte zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit IC₅₀ Werten für heterolog exprimierte TRPV6-Ionenkanäle in HEK293-Zellen, in denen ein IC₅₀-Wert von 14 ± 1,3nM und eine Effizienz von etwa 25% nachgewiesen wurden (Bowen *et al.*, 2013). Das in den HEK293-Zellen heterolog exprimierte TRPV6-Gen entspricht der kurzen Isoform mit einem Translationstart an dem kanonischen AUG (Wissenbach *et al.*, 2001). Kleinere Abweichungen können durch den Einsatz unterschiedlicher Expressionssysteme und unterschiedliche Messmethoden zur Ermittlung der IC₅₀-Werte bedingt sein. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit für die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals eine IC₅₀-Potenz von 1496 ± 80nM und eine Effizienz von 38% nachgewiesen. Im Gegensatz zu den unspezifischen Antagonisten ergaben sich damit für den Peptid-Inhibitor SOR-C13 deutliche Unterschiede der gemessenen IC₅₀-Werte und der Effizienzen in Zellen mit Expression der kurzen im Vergleich zur langen hTRPV6-Isoform.

Für die lange hTRPV6-Isoform wurde bisher keine 3D-Struktur beschrieben, und die genaue Bindestelle des SOR-C13 Peptids ist nicht bekannt. Die Resultate sind ein starker Hinweis, dass die um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminale Region bei der Assemblierung des Ionenkanals und davon abhängig bei der Regulation des Kanalschaltverhaltens eine wichtige Rolle spielen könnte. Möglicherweise wird die Bindung des SOR-C13 Peptides an den TRPV6-Ionenkanal durch den verlängerten N-terminalen Bereich der langen TRPV6-Isoform behindert.

Die pharmakologische Analyse verdeutlicht die hohe Sensitivität und Standardisierung der hTRPV6-Überexpressionsmodelle in Kombination mit dem zellbasierten Calcium-Assay. Damit eignet sich das hTRPV6-Überexpressionsmodell für die Testung neuer potenzieller Inhibitoren für den hTRPV6-Ionenkanal. Kürzlich durchgeführte Cryo-EM-Analysen zur Aufklärung der Struktur des TRPV6-Proteins sowie speziell zur Struktur der Kanalpore zeigten die Bedeutung des Aspartat-Restes (D541) für den Selektivitätsfilter und damit der Gating-Funktion des Ionenkanals an (Saotome et al., 2016; Singh et al., 2017, 2018). Allerdings wurde bei den Strukturanalysen die 40 Aminosäuren umfassende N-terminale Region nicht untersucht. Basierend auf den Strukturanalysen der Kanalpore ist die Entwicklung weiterer, zielgerichteter TRPV6-Inhibitoren in naher Zukunft zu erwarten, die in dem hTRPV6-Überexpressionsmodell validiert werden können.

In Zusammenfassung aller gezeigten Resultate konnte durch vergleichende Funktionsanalysen der beiden hTRPV6-Proteinisoformen im Überexpressionsmodell belegt werden, dass signifikante, funktionelle Unterschiede zwischen der kurzen und der langen hTRPV6-Isoform hinsichtlich der Effektivität der TRPV6-vermittelten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$, der Inaktivierung der hTRPV6-Isoformen durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher sowie der pharmakologischen Inhibition durch den TRPV6-spezifischen Inhibitor SOR-C13 und der Aktivierung des NFAT-Signaltransduktionsweges bestehen. Die aufgezeigten Unterschiede verdeutlichen die Beeinflussung der um 40 Aminosäuren verlängerten N-terminalen Region auf die Funktion der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals.

Tabelle 13: Vergleich der im hTRPV6-Überexpressionsmodell ermittelten IC₅₀-Potenzen der Antagonisten Ruthenium Red, La³⁺, 2-APB und SOR-C13 mit Angaben in der Literatur.

Antagonist	Inhibitor von	IC ₅₀ short	IC ₅₀ long	Spezies	Expression	Zellmodell	Messmethode	Referenz
SOR-C13	TRPV6	21,3 ± 5,8nM	1495,5 ± 79,9nM	Human	heterolog, stabil	CHO-TetOne-TRPV6_short/long	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fluo-8)	Diese Arbeit
		14,3 ± 1,3nM	-	Human	heterolog, transient	HEK293 cells expressing TRPV6/EGFP	Whole-cell patch clamp	Bowen <i>et al.</i> , 2013
2-APB	TRPV6 &	41,7 ± 10,2μM	51,2 ± 15,1nM	Human	heterolog, stabil	CHO-TetOne-TRPV6_short/long	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fluo-8)	Diese Arbeit
	SOCs (store operated calcium channels) &	20,4 μM	-	Human	heterolog, stabil	HEK293-pTagRFP-C1-TRPV6	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Calcium-5)	Hofer <i>et al.</i> , 2013
	IP ₃ -Rezeptoren	70,6 ± 10,2μM	-	Human	heterolog, transient	HEK293-pTagRFP-C1-TRPV6	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fura-2)	Kovacs <i>et al.</i> , 2012
		22,2μM	-	Human	heterolog, stabil	HEK293-pTagRFP-C1-TRPV6	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fura-2)	Kovacs <i>et al.</i> , 2012
Ruthenium Red	TRPVs, SERCA, spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle	12,0 ± 2,2μM	2,3 ± 3,4μM	Human	heterolog, stabil	CHO-TetOne-TRPV6_short/long	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fluo-8)	Diese Arbeit
		9 ± 1μM	-	Maus	heterolog	HEK293...	Whole-cell patch clamp	Hoenderop <i>et al.</i> , 2001
Lanthan	CRAC (Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺) channels	10,4 ± 10,5μM	5,9 ± 2,9μM	Human	heterolog, stabil	CHO-TetOne-TRPV6_short/long	Fluoreszenzbasierte Ca ²⁺ -Messung (Fluo-8)	Diese Arbeit
		10μM	-	Human	heterolog, transient	HEK293 cells expressing TRPV6/EGFP	Whole-cell patch clamp	Bowen <i>et al.</i> , 2013

5 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, ausgehend von der Translation eines nicht-kanonischen ACG-Startcodons im humanen *TRPV6*-Gen, der Einfluss einer um 40 Aminosäuren verlängerten N-terminalen Region des humanen TRPV6-Proteins auf funktionelle Eigenschaften des hTRPV6-Ionenkanals in lebenden Zellen analysiert. Die Analysen wurden im Vergleich mit einer TRPV6-Proteinisoform durchgeführt, die, bedingt durch eine Translationsinitiation an dem ersten kanonischen AUG des *TRPV6*-Gens, um genau diese 40 Aminosäuren verkürzt war. Die beiden humanen TRPV6-Isoformen wurden als hTRPV6-mCherry-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen mit Hilfe des TetOn-Systems regulierbar exprimiert. Die Wahl der CHO-Zellen war vorteilhaft, da die Zellen keine detektierbare, endogene TRPV6-Expression aufwiesen und dadurch eine bessere Vergleichbarkeit der Messdaten ermöglichte. Die Expression der beiden TRPV6-Isoformen konnte durch die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen reguliert werden. Die Quantifizierung der mCherry-Floreszenz verdeutlichte, dass die kurze hTRPV6-Isoform bei gleicher Doxyzyklin-Induktion 3-fach stärker als die lange hTRPV6-Isoform exprimiert war, was auf eine höhere Translationseffizienz des AUG-Startcodons hinweist. Die aberrante Expression von TRPV6 in Tumoren ist bisher nicht umfassend geklärt. Da Tumorzellen mutationsbedingt klassische Translationsmechanismen stark verändern können, könnte die stärker exprimierte, kurze hTRPV6-Isoform möglicherweise als tumorspezifische Proteinisoform in den Tumoren gebildet werden. Dazu müsste aber zunächst die Proteinsequenz von aus Tumorproben isolierten TRPV6-Proteinen festgestellt werden. In dem Überexpressionsmodell könnten dann tumorrelevante Signalmoleküle co-exprimiert oder durch siRNA knock-down ausgeschaltet werden, um das Zusammenspiel einer TRPV6-Überexpression und der malignen Tumorprogression weitergehend zu analysieren.

Mit Hilfe des entwickelten Calcium-Assays und der nicht-ratiometrischen Fluoreszenzmessung von intrazellulärem Ca^{2+} wurde bei allen eingestellten experimentellen Parametern eine sehr gute zeitliche Auflösung der TRPV6-vermittelten Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erreicht. Dadurch konnten nicht nur Unterschiede zwischen den beiden hTRPV6-Isoformen festgestellt, sondern auch Ca^{2+} -Einströme, die nicht durch TRPV6-Ionenkanäle vermittelt wurden, quantifiziert werden. Für Fragestellungen, die eine stärkere subzelluläre Auflösung benötigen, könnten in Zukunft Organellen-spezifische, genetisch kodierte Ca^{2+} -Indikatoren in den Zellmodellen eingesetzt werden.

Beide Ionenkanal-Isoformen waren in den Überexpressionsmodellen funktionell aktiv. Bei den Ca^{2+} -Messungen unter verschiedenen, experimentellen Parametern waren die $\Delta F_{\max}/F_0$ -Werte,

d.h. die maximale Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bei beiden hTRPV6-Isoformen häufig ähnlich, was mit in der Literatur beschriebenen Resultaten aus Patch-Clamp Analysen übereinstimmte (Fecher-Trost *et al.*, 2013). Allerdings zeigten die Kurvenverläufe der Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deutliche Unterschiede zwischen den beiden Isoformen. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die lange Isoform des hTRPV6-Ionenkanals nach Erhöhung der intrazellulären oder extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie einer Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes schneller und stärker inhibiert wird als die kurze Isoform. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Aktivität der langen hTRPV6-Isoform stark von dem speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) beeinflusst wurde, während die kurze Isoform davon unbeeinträchtigt war. Um die Funktion der N-terminal verlängerten Region der langen hTRPV6-Isoform weitergehend aufzuklären, wäre die Identifizierung interagierender Proteine, beispielsweise durch das Yeast Two Hybrid-Verfahren, ein wichtiger Schritt.

Exemplarisch konnte mit den Analysen der NFAT-Aktivierung gezeigt werden, dass die TRPV6-vermittelte Aktivierung von nachgeschalteten (downstream) Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen in dem Überexpressionsmodell untersucht werden kann. Zukünftig könnte über RNA-Interferenz-Experimente oder CRISPR-Cas9-eingeführte Modifikationen die Bedeutung der einzelnen Signalmoleküle im Zusammenhang mit der TRPV6-Expression geprüft werden.

Bei der Analyse des Vesikeltransportes ergaben sich erste Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der kurzen hTRPV6-Isoform im Vergleich zur langen Isoform. Zusätzlich der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Analysen zum Vesikeltransport durch Momentaufnahmen wurden auch Vesikel-tracking-Analysen durchgeführt, um die dynamischen Abläufe abbilden zu können. Durch die Komplexität der erhaltenen Daten war eine vergleichende Analyse TRPV6-positiver Vesikel bisher jedoch nicht möglich. In Zukunft könnten diese Analysen durch eine Hemmung einzelne Rab-Proteine im Experiment besser aufgelöst werden, um die Regulation der Translokation von TRPV6-positiven Vesikel an die Plasmamembran darstellen zu können.

Die entwickelten Überexpressionsmodelle der hTRPV6-Isoformen in Kombination mit dem Ca^{2+} -Assay sind geeignet, um potenzielle Wirkstoffe zu testen. Die Sensitivität des Systems konnte anhand der Validierung von vier Antagonisten, insbesondere mit dem TRPV6-spezifischen Peptid-Inhibitor SOR-C13, nachgewiesen werden. Die Resultate verdeutlichten, dass die um 40 Aminosäuren verlängerte N-terminale Region ursächlich an der geringeren Effektivität der Inhibition durch SOR-C13 beteiligt ist und insgesamt die Funktion der langen Isoform des hTRPV6-Ionenkanals beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

Abe, K., Puertollano, R. (2011). Role of TRP channels in the regulation of the endosomal pathway. *Physiology (Bethesda)* **26**, 14-22.

Andréll, J., Tate, C.G. (2013). Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Mol Membr Biol* **30**, 52-63.

Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordonez, A., Rosado, J.A., Smani, T. (2018). The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Front Physiol* **9**, doi: 10.3389/fphys.2018.00257.

Azimi, I., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R. (2014). Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Br J Pharmacol* **171**, 945-960.

Bai, L., Sato, H., Kubo, Y., Wada, S., Aida, Y. (2019). CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *FASEB J* **33**, 14516-14527.

Beck, A., Fleig, A., Penner, R., Peinelt, C. (2014). Regulation of endogenous and heterologous Ca(2)+ release-activated Ca(2)+ currents by pH. *Cell Calcium* **56**, 235-243.

Bezzarides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., Clapham, D.E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* **6**, 709-720.

Bissell, M.J., Hall, H.G., Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* **99**, 31-68.

Bödding, M. (2007). TRP proteins and cancer. *Cell Signal* **19**, 617-624.

Bödding, M., Fecher-Trost, C., Flockerzi, V. (2003). Store-operated Ca²⁺ current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 50872-50879.

Bödding, M., Wissenbach, U., Flockerzi, V. (2002). The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca²⁺ sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* **277**, 36656-36664.

Bolanz, K.A., Hediger, M.A., Landowski, C.P. (2008). The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* **7**, 271-279.

Bouron, A., Kiselyov, K., Oberwinkler, J. (2015). Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. *Eur J Physiol* **467**, 1143-1164.

Bowen, C.V., DeBay, D., Ewart, S.S., Gallant, P., Gormley, S., Ilenchuk, T.T., Iqbal, U., Lutes, T., Martina, M., Mealing, G., Merkley, N., Sperker, S., Moreno, M.J., Rice, C., Syvitski, R.T., Stewart, J.M. (2013). In vivo detection of human TRPV6-rich tumors with anti-cancer peptides derived from soricidin. *PLoS One* **8**, e58866.

Breitwieser, G.E. (2008). Extracellular calcium as an integrator of tissue function. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1467-1480.

Breslin, S. & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**, 240-249.

- Bulla, M., Gyimesi, G., Kim, J.H., Bhardwaj, R., Hediger, M.A., Frieden, M., Demaurex, N. (2019).** ORAI1 channel gating and selectivity is differentially altered by natural mutations in the first or third transmembrane domain. *J Physiol* **597**, 561-582.
- Cai, J., Huang, Y., Li, F., Li, Y. (2006).** Alteration of protein subcellular location and domain formation by alternative translational initiation. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **62**, 793-799.
- Cao, C., Zakharian, E., Borbiri, I., Rohacs, T. (2013).** Interplay between Calmodulin and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ca²⁺-induced inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 channels. *J Biol Chem* **288**, 5278-5290.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997).** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824.
- Chen, S.J., Ko, C.Y., Yen, C.W., Wang, C.C. (2009).** Translational efficiency of redundant ACG initiator codons is enhanced by a favorable sequence context and remedial initiation. *J Biol Chem* **284**, 818-827.
- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., Ambudkar, I.S. (2011).** Local Ca²⁺ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca²⁺ signals required for specific cell functions. *PLoS Biol* **9**, e1001025.
- Chow, J., Norng, M., Zhang, J., Chai, J. (2007).** TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells – Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 565-576.
- Clapham, D.E. (2003).** TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strübing, C. (2001).** The TRP ion channel family. *Nature Rev Neurosci* **2**, 387-395.
- Cosens, D.J. & Manning, A. (1969).** Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-287.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., Pan, Z. (2017).** Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* **7**, 3-17.
- Cui, M., Li, Q., Johnson, R., Fleet, J.C. (2012).** Villin promoter-mediated transgenic expression of TRPV6 increases intestinal calcium absorption in wild-type and VDR knockout mice. *J Bone Miner Res* **27**, 2097-2107.
- Das, A.T., Tenenbaum, L., Berkhout, B. (2016).** Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr Gene Ther* **16**, 156-167.
- de Groot, T., Kovalevskaya, N.V., Verkaart, S., Schilderink, N., Felici, M., van der Hagen, E.A.E., Bindels, R.J.M., Vuister, G.W., Hoenderop, J.G. (2011).** Molecular Mechanisms of calmodulin action on TRPV5 and modulation by parathyroid hormone. *Mol Cell Biol* **31**, 2845-2853.
- de Klerk, E., 't Hoen; P.A.C. (2015).** Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet* **31**, 128-139.
- den Dekker, E., Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2003).** The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**, 497-507.

de Souza, L., Ambudkar, I.S. (2014). Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels. *Cell Calcium* **56**, 43-50.

Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H. (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem* **28**, 813-822.

Diaz de Arce, A.J., Noderer, W.L., Wang, C.L. (2017). Complete motif analysis of sequence requirements for translation initiation at non-AUG start codons. *Nucleic Acids Res* **46**, 985-994.

Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **12**, 207-218.

Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Niemeyer, B.A. (2004). Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* **279**, 34456-34463.

Fecher-Trost, C., Lux, F., Busch, K., Raza, A., Winter, M., Hielscher, F., Belkacemi, T., van der Erden, B., Boehm, U., Freichel, M., Weissgerber, P. (2019). Maternal transient receptor potential vanilloid 6 (Trpv6) is involved in offspring bone development. *J Bone Miner Res* **34**, 699-710.

Fecher-Trost, C., Wissenbach, U., Beck, A., Schalkowsky, P., Stoerger, C., Doerr, J., Dembek, A., Simon-Thomas, M., Weber, A., Wollenberg, P., Ruppert, T., Middendorff, R., Maurer, H.H., Flockerzi, V. (2013). The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG. *J Biol Chem* **288**, 16629-16644.

Fecher-Trost, C., Wissenbach, U., Weissgerber, P. (2017). TRPV6: From identification to function. *Cell Calcium* **67**, 116-122.

Fels, B., Bulk, E., Pethő, Z., Schwab, A. (2018). The role of TRP channels in the metastatic cascade. *Pharmaceuticals* **11**, doi:10.3390/ph11020048.

Fu, S., Hirte, H., Welch, S., Ilenchuk, T.T., Lutes, T., Rice, C., Fields, N., Nemet, A., Dugourd, D., Piha-Paul, S., Subbiah, V., Liu, L., Gong, J., Hong, D., Stewart, J.M. (2017). First-in-human phase I study of SOR-C13, a TRPV6 calcium channel inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **35**, 324-333.

Fussenegger, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog* **17**, 1-51.

Gavva, N. R., Bannon, A. W., Surapaneni, S., Hovland, D. N., JR, Lehto, S. G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M.H., Magal, E., Treanor, J.J.S., Louis, J.C. (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* **27**, 3366-3374.

Gavva, N. R., Treanor, J. J. S., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A. & Darling, M. & other authors (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**, 202-210.

- Gees, M., Colsoul, B., Nilius, B. (2010).** The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003962.
- Giusti, L., Cetani, F., Da Valle, Y., Pardi, E., Ciregia, F., Donadio, E., Gargini, C., Piano, I., Borsari, S., Jaber, A., Caputo, A., Basolo, F., Giannaccini, G., Marcocci, C., Lucacchini, A. (2014).** First evidence of TRPV5 and TRPV6 channels in human parathyroid glands: possible involvement in neoplastic transformation. *J Cell Mol Med* **18**, 1944-1952.
- Glitsch, M. (2011).** Protons and Ca²⁺: ionic allies in tumor progression? *Physiology (Bethesda)* **26**, 252-265.
- Gossen, M., Bonin, A.L., Freundlieb, S., Bujard, H. (1994).** Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 516-520.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992).** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995).** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
- Gunthorpe, M.J., Benham, C.D., Randall, A., Davis, J.B. (2002).** The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 183-191.
- Heinz, N., Schambach, A., Galla, M., Maetzig, T., Baum, C., Loew, R., Schiedlmeier, B. (2011).** Retroviral and transposon-based tet-regulated all-in-one vectors with reduced background expression and improved dynamic range. *Human Gene Ther* **22**, 166-176.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005).** Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* **118**, 917-928.
- Hinnebusch, A.G. (2011).** Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 434-467.
- Hirnet, D., Olausson, J., Fecher-Trost, C., Bödding, M., Nastainczyk, W., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Freichel, M. (2003).** The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **33**, 509-518.
- Hoenderop, J.G.J. & Bindels, R.J.M. (2008).** Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology* **23**, 32-40.
- Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2002).** ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* **1600**, 6-11.
- Hoenderop, J.G.J., Vennekens, R., Müller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R.J.M., Nilius, B. (2001).** Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* **537**, 747-761.
- Hoenderop, J.G.J., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2003).** Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* **22**, 776-785.

- Hofer, A., Kovacs, G., Zappatini, A., Leuenberger, M., Hediger, M.A., Lochner, M. (2013).** Design, synthesis and pharmacological characterization of analogs of 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), a known store-operated calcium channel blocker, for inhibition of TRPV6-mediated calcium transport. *Bioorb Med Chem* **21**, 3202-3213.
- Hogan, P.G., Rao, A. (2015).** Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 40-49.
- Hu, F., Pan, L., Zhang, K., Xing, F., Wang, X., Lee, I., Zhang, X., Xu, J. (2014).** Elevation of extracellular Ca²⁺ induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway contributes to the proliferation of osteoblasts. *PLoS One* **9**, e107217.
- Huang, L., Pike, D., Sleat, D.E., Nanda, V., Lobel, P. (2014).** Potential pitfalls and solutions for use of fluorescent fusion proteins to study the lysosome. *PLoS One* **9**, e88893.
- Ibidi (2019).** <https://ibidi.com/channel-slides/57--slide-vi-04.html>, Stand: 25.06.2019, 10:25.
- Ivanov, I.P., Firth, A.E., Michel, A.M., Atkins, J.F., Baranov, P.V. (2011).** Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences. *Nucleic Acids Res* **39**, 4220-4234.
- Jiang, Y., Gou, H., Zhu, J., Tian, S., Yu, L. (2016).** Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. *Oncol Lett* **12**, 1164-1170.
- Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., Yang, L.V. (2014).** In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* **88**, e51046, doi: 10.3791/51046.
- Kearse, M., Wilusz, J.E. (2017).** Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev* **31**, 1717-1731.
- Kim, J.B. (2014).** Channelopathies. *Korean J Pediatr* **57**, 1-18.
- Kimura, M., Nishi, K., Higashikawa, A., Ohyama, S., Sakurai, K., Tazaki, M., Shibukawa, Y. (2018).** High pH-sensitive store-operated Ca²⁺ entry mediated by Ca²⁺ release-activated channels in rat odontoblasts. *Front Physiol* **9**, doi: 10.3389/fphys.2018.00443.
- Kovacs, G., Danko, T., Bergeron, M.J., Balazs, B., Suzuki, Y., Zsembery, A., Hediger, M.A. (2011).** Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. *Cell Calcium* **49**, 43-55.
- Kovacs, G., Montalbetti, N., Simonin, A., Danko, T., Balazs, B., Zsembery, A., Hediger, M.A. (2012).** Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell Calcium* **52**, 468-480.
- Kozak, M. (1990).** Downstream secondary structures facilitate recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8301-8305.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., Dolznig, H. (2013).** In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res* **752**, 10-24.
- Krizova, A., Maltan, L., Derler, I. (2019).** Critical parameters maintaining authentic CRAC channel hallmarks. *Eur Biophys J* **48**, 425-445.
- Lai, T., Yang, Y., Ng, S. K. (2013).** Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* **6**, 579-603.

- Lalonde, M.E., Durocher, Y. (2017).** Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* **251**, 128-140.
- Lambers, T.T., Oancea, E., de Groot, T., Topala, C.N., Hoenderop, J.G.J., Bindels R.J.M. (2007).** Extracellular pH dynamically controls cell surface delivery of functional TRPV5 channels. *Mol Cell Biol* **27**, 1486-1494.
- Lambers, T.T., Weidema, A.F., Nilius, B., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2004).** Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor calmodulin. *J Biol Chem* **279**, 28855-28861.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., Weinberg, R.A. (2017).** Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168**, 670-691.
- Landowski, C.P., Bolanz, K.A., Suzuki, Y., Hediger, M.A. (2011).** Chemical inhibitors of the calcium entry channel TRPV6. *Pharm Res* **28**, 322-330.
- Leanza, L., Managò, A., Zoratti, M., Gulbins, E., Szabo, I. (2016).** Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: In vivo evidences. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 1385-1397.
- Lee, J.J., Liu, X., O'Neill, D., Beggs, M.R., Weissgerber, P., Flockerzi, V., Chen, X.Z., Dimke, H., Alexander, R.T. (2019).** Activation of the calcium sensing receptor attenuates TRPV6-dependent intestinal calcium absorption. *JCI Insight* **5**, doi: 10.1172/jci.insight.128013.
- Lehen'kyi V., Flourakis, M., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2007).** TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380-7385.
- Lehen'kyi, V., Raphaël, M., Prevarskaya, N. (2012).** The role of the TRPV6 channel in cancer. *J Physiol* **590**, 1369-1376.
- Liberati, S., Morelli, M.B., Nabissi, M., Santoni, M., Santoni, G. (2013).** Oncogenic and anti-oncogenic effects of transient receptor potential channels. *Curr Top Med Chem* **13**, 344-366.
- Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H., Gossen, M. (2010).** Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnol* **10**, 81.
- Lopez, J.J., Jardin, I., Albarrán, L., Sanchez-Collado, J., Cantonero, C., Salido, G.M., Smani, T., Rosado, J.A. (2020).** Molecular basis and regulation of store-operated calcium entry. *Adv Exp Med Biol* **1131**, 445-469.
- Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R.J., Hoenderop J.G.J. (2008).** The β -glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 3397-3402.
- Madej, M.G. & Ziegler, C.M. (2018).** Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Eur J Physiol* **470**, 213-225.
- Martin, T.A., Ye, L., Sanders, A.J., Lane, J., Jiang, W.G. (2013).** Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. *Madame Curie Bioscience Database, Austin (TX): Landes Bioscience*, 2000-2013.
- Michelangeli, F., East, J.M. (2011).** A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans* **39**, 789-797.

- Minke, B. (2010).** The history of the drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* **24**, 216-233.
- Missiaen, L., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., Callewaert, G., Parys, J.B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J., De Smedt, H. (2000).** Abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and disease. *Cell Calcium* **28**, 1-21.
- Montell, C. (2005).** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **re3**, 1-24.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V. (2002).** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-598.
- Müller, D., Hoenderop, J.G.J., Merkx, G.F.M., van Os, C.H., Bindels, R.J.M. (2000).** Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 47-52.
- Niemeyer, B.A. (2005).** Structure-function analysis of TRPV channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 285-294.
- Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Trost, C. (2001).** Competitive regulation of Ca^T-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *PNAS* **98**, 3600-3605.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2005).** TRPV5 and TRPV6 in Ca²⁺ (re)absorption: regulating Ca²⁺ entry at the gate. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **451**, 181-192.
- Nilius, B., Prenen, J., Hoenderop, J.G.J., Vennekens, R., Hoefs, S., Weidema, A.F., Droogmans, G., Bindels, R.J.M. (2002).** Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). *J Biol Chem* **277**, 30852-30858.
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G.J., Droogmans, G., Bindels, R.J.M. (2001).** The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial calcium channel. *J Biol Chem* **276**, 1020-1026.
- Nilius, B., Voets, T., (2005).** TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **451**, 1-10.
- Nilius, B., Weidema, F., Prenen, J., Hoenderop, J.G.J., Vennekens, R., Hoefs, S., Droogmans, G., Bindels, R.J.M. (2003).** The carboxyl terminus of the epithelial Ca²⁺ channel ECaC1 is involved in Ca²⁺-dependent inactivation. *Eur J Physiol* **445**, 584-588.
- Numata, T., Kiyonaka, S., Kato, K., Takahashi, N., Mori, Y. (2011).** Activation of TRP channels in mammalian systems. *Zhu MX, editor. TRP channels. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis*, Chapter 3.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P.G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., Rao, A. (2008).** Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* **9**, 432-443.
- O’Neil R.G. & Heller, S. (2005).** The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Eur J Physiol* **451**, 193-203.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B. (2006).** Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 685-717.

- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H.K. (2007).** The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**, 839-845.
- Pan, Z., Yang, H., Reinach, P.S. (2011).** Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Hum Genomics* **5**, 108-116.
- Peng, J., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2003).** Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol* **551**, 729-740.
- Peng, J., Chen, X., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Tsukaguchi, H., Brown, E.M., Hediger, M.A. (1999).** Molecular characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* **274**, 22739-22746.
- Peng, J., Chen, X., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2000).** Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 326-332.
- Peters, A.A., Simpson, P.T., Bassett, J.J., Lee, J.M., Da Silva, L., Reid, L.E., Song, S., Parat, M., Lakhani, S.R., Kenny, P.A., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R. (2012).** Calcium channel TRPV6 as a potential therapeutic target in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* **11**, 2158-2168.
- Phelps, C.B., Huang, R.J., Lishko, P.V., Wang, R.R., Gaudet, R. (2008).** Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* **47**, 2476-2484.
- Philippaert, K., Vennekens, R. (2015).** TRP channels as therapeutic targets. Chapter 19: Transient receptor potential (TRP) cation channels in diabetes. *Academic Press*, 343-363.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y. (2010).** Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* **16**, 107-121.
- Qin, J., Nag, S., Wang, W., Zhou, J., Zhang, W., Wang, H., Zhang, R. (2014).** NFAT as cancer target: mission impossible? *Biochim Biophys Acta* **1846**, 297-311.
- Quang, C.T., Leboucher, S., Passaro, D., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Vincent-Salomon, A., Ghysdael, J. (2015).** The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. *Cell Death Dis* **6**, e1658(2015), doi: 10.1038/cddis.2015.14.
- Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E. (2006).** An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 619-647.
- Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. (1997).** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-747.
- Raphaël, M., Lehen'kyi, V., Vandenberghe, M., Beck, B., Khalimonchyk, S., Abeele, F.V., Farsetti, L., Germain, E., Bokhobza, A., Mihalache, A., Gosset, P., Romanin, C., Clézardin, P., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2014).** TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E3870-E3879.
- Rogers, T.B., Inesi, G., Wade, R., Lederer, W.J. (1995).** Use of Thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Biosci Rep* **15**, 341-349.

- Rosado, J.A., Diez, R., Smani, T., Jardín, I. (2016).** STIM and Orai1 variants in store-operated calcium entry. *Front Pharmacol* **13**, 6:325, doi: 10.3389/fphar.2015.00325.
- Saenger, W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W., Hinrichs, W. (2000).** The tetracycline repressor – a paradigm for a biological switch. *Angew Chem Int Ed* **39**, 2042-2052.
- Saotome, K., Singh, A.K., Yelshanskaya, M.V., Sobolevsky, A.I. (2016).** Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature* **534**, 506-511.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012).** Fiji: an open source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- Schmitz, S. (2011).** Der Experimentator: Zellkultur. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 87-101.
- Schwarz, E.C., Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Strauß, B., Philipp, S.E., Flockerzi, V., Hoth, M. (2006).** TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* **39**, 163-173.
- Singh, A.K., Saotome, K., McGoldrick, L.L., Sobolevsky, A.I. (2018).** Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB. *Nature Commun* **9**:2465, doi: 10.1038/s41467-018-04828-y.
- Singh, A.K., Saotome, K., Sobolevsky, A.I. (2017).** Swapping of transmembrane domains in the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature Sci Rep* **7**, 10669-10677.
- Skrzypski, M., Kolodziejcki, P.A., Mergler, S., Khajavi, N., Nowak, K.W., Strowski, M.Z. (2016).** TRPV6 modulates proliferation of human pancreatic neuroendocrine BON-1 tumour cells. *Biosci Rep* **36**, 1-9.
- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M., Gill, D.L. (2012).** STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 549-565.
- Song, H., Dong, M., Zhou, J., Sheng, W., Li, X., Gao, W. (2018).** Expression and prognostic significance of TRPV6 in the development and progression of pancreatic cancer. *Oncol Rep* **39**, 1432-1440.
- Stenmark, H. (2009).** Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525.
- Sternfeld, L., Anderie, I., Schmid, A., Al-Shaldi, H., Krause, E., Magg, T., Schreiner, D., Hofer, H., Schulz, I. (2007).** Identification of tyrosines in the putative regulatory site of the Ca²⁺ channel TRPV6. *Cell Calcium* **42**, 91-102.
- Stewart, J.M. (2020).** TRPV6 as a target for cancer therapy. *J Cancer* **11**, 374-387.
- Sulk, M., Steinhoff, M. (2015).** TRP channels as therapeutic targets. Chapter 17: Role of TRP channels in skin diseases. *Academic Press*, 293-323.
- Takara (2019).** <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/inducible-systems/tet-inducible-systems/tet-systems-overview>, Stand: 23.06.2019, 11:20.

Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**, 2038-2047.

Thyagarajan, B., Benn, B.S., Christakos, S., Rohacs, T. (2008 a). Phospholipase C-mediated regulation of transient receptor potential vanilloid 6 channels: implications in active intestinal Ca²⁺ transport. *Mol Pharmacol* **75**, 608-616.

Thyagarajan, B., Lukacs, V., Rohacs, T. (2008 b). Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. *J Biol Chem* **283**, 14980-14987.

Tomilin, V.N., Cherezova, A.L., Negulyaev, Y.A., Semenova, S.B. (2016). TRPV5/V6 channels mediate Ca(2+) influx in Jurkat T cells under the control of extracellular pH. *J Cell Biochem* **117**, 197-206.

Toro, C.A., Arias, L.A., Brauchi, S. (2011). Sub-cellular distribution and translocation of TRP channels. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 12-23.

Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A., Vagner, S. (2003). Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell* **95**, 169-178.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, doi: 10.1126/science.1260419.

van Abel, M., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2005). The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Arch Pharmacol* **371**, 295-306.

van de Graaf, S.F.J., Chang, Q., Mensenkamp, A.R., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2006 a). Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **26**, 303-312.

van de Graaf, S.F.J., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2006 b). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F1295-F1302.

van Goor, M.K.C., Hoenderop, J.G.J., Van der Wijst, J. (2017). TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure-function relationship of TRPV5 and TRPV6. *Biochim Biophys Acta* **6**, 883-893.

Venkatachalam, K. & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417.

Vennekens, R., Hoenderop, J.G.J., Prenen, J., Stuiver, M., Willems, P.H.G.M., Droogmans, G., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2000). Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* **275**, 3963-3969.

- Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G., Nilius, B. (2001).** Modulation of the epithelial Ca²⁺ channel ECaC by extracellular pH. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **442**, 237-242.
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B. (2009).** Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* **75**, 1262-1279.
- Weiswald, L., Bellet, D., Dangles-Marie, V. (2015).** Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1-15.
- Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., Esner, M., Bickle, M., Pampaloni, F., Mattheyer, C., Stelzer, E.H., Parczyk, K., Prechtel, S., Steigemann, P. (2014).** 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Research* **323**, 131-143.
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalié, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H., Flockerzi, V. (2001).** Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* **276**, 19461-19468.
- Wu, G., Zhang, W., Na, T., Jing, H., Wu, H., Peng, J. (2012).** Suppression of intestinal calcium entry channel TRPV6 by OCRL, a lipid phosphatase associated with Lowe syndrome and Dent disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C1479-C1491.
- Wu, L.J., Sweet, T.B., Clapham, D.E. (2010).** International union of basic and clinical pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* **62**, 381-404.
- Xue, H., Wang, Y., MacCormack, T.J., Lutes, T., Rice, C., Davey, M., Dugourd, D., Ilenchuk, T.T., Stewart, J.M. (2018).** Inhibition of transient receptor potential vanilloid 6 channel, elevated in human ovarian cancers, reduces tumor growth in a xenograft model. *J Cancer* **9**, 3196-3207.
- Yeh, B.I., Sun, T.J., Lee, J.Z., Chen, H.H., Huang, C.L. (2003).** Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J Biol Chem* **278**, 51044-51052.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., Cahalan, M.D. (2006).** Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**, 226-229.
- Yiu, G.K., Toker, A. (2006).** NFAT induce breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **281**, 12210-12217.

7 Anhang

Sequenz des TRPV6_short-Konstruktes (2910 bp gesamt)

→ TRPV6 short Sequenz (blau) - GS linker (grün) – mCherry-Sequenz (rot)

```
atgggtttgtcactgccaaggagaaagggctaattctctgcctatggagcaagttctgcagatggtccagagacgggagtcctgggcccagagcc
gagatgagcagaacctgctgcagcagaagaggatctgggagtcctctccttagctgccaagataatgatgtccaggccctgaacaagttgct
caagatgaggattgcaaggtgcaccagagaggagccatgggggaaacagcgctacacatagcagccctctatgacaacctggaggccgccat
ggtgctgatggaggctccccggagctggtctttgagccatgacatctgagctctatgagggtcagactgcactgcacatcgctgttgaaccaga
acatgaacctggtgagccctgctgcccagggccagtgctctgcccagaccagggcactgccttccgccgtagtccctgcaacctcatcta
ctttggggagcaccctttgctcttctgctgtgtgaacagtgaggagatcgctgcggctgctcattgagcatggagctgacatccgggcccaggactc
cctgggaaacacagtggttacacatcctcatcctccagcccaacaaacctttgctgcccagatgtacaacctgttgcctctacgacagacatggg
accacctgcagcccctggacctgctgccaatcaccagggtctcacccttcaagctggctggagtggagggtaacactgtgatgttcagcacctg
atgcagaagcgaagcacaccagtgaccatgaccactgacctctctatgacctcacagagatcgactcctcaggggatgagcagtc
cctgctggaacttatcaccaccaagaagcgggaggctcgccagatcctggaccagacgccggtgaaggagctggtgagcctcaagtgaag
cgttacggcgccgctacttctgcatgctgggtccatatactgctgtacatcatctgcttaccatgtgctgcatctaccgcccctcaagcccagga
ccaataaccgcagagccccgggacaacacctcttacagcagaagctactcaggaagcctacatgaccctaaggacgatatccggctggtc
ggggagctggtgactgtcattggggctatcatcatcctgctggttagaggtccagacatctcagaatgggggtcactcgctctttggacagaccatcc
ttggggcccattccatgtcctcatcatcacctatgcctcatggtgctggtgaccatggtgatgggctcatcagtgccagcggggagggtgaccat
gtcctttgcactcgtgctgggctggtgcaacgtcatgtactcgcggaggattccagatgctaggcccctcaccatcatgattcagaagatgattttgg
cgacctgatgcatgctgctggtgatggtgctcctggccttctcagccttctatcatcttccagacagaggacccccgaggagctaggcc
acttctacgactaccccatggccctgtcagcacctcgcagctgttcttaccatcatcgatggcccagccaactacaacgtggacctgcccctcatgta
cagcatcacctatgctgctttgccatcatcgccacactgctcatgctcaacctcctcattgccatgatgggacactcactggcgagtggccatga
gccccgatgagctgtggaggcccagattgtggcaccacggtgatgctggagcgaagctgctcgtgctgctgctgctcgggatctgagg
acgggagatggcctgggagaccgctggtcctgcccgggtggaagacaggcaagatcacaaccggcagcggatccaacgctacgcacaggccctc
cacaccgggctctgaggattggacaaaagactcagtggaaaaactagagctgggctgtccctcagccccacactgtccctcctatgccctcag
gtctcgaagtacctccgcagcagtgccaattgggaaaggctcggcaaggaccctgaggagagacctgctgggataatcaacaggggtctg
gaggacggggagagctgggaatatcagatcgggtgatctggaggcgttcagggtgga
```

gtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatc
aaggagttcatgccttcaagggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcccctacgag
ggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggtggccccctgccctcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggtccaaggcc
tacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactactgaagctgtcctccccgagggttcaagtgggagcgcgtgatgaactcgaggacggcggc
gtggtgacctgacctgacctcctcctgagcagcggcagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaactcccctccgacggccccgta
atgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtacccgaggacggcgcctgaagggcgagatcaagcagaggctga
agctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccctacaaggccaagaagcccgtgcagctgccggcgcctacaacgtcaac
atcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacacctcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgacctccaccggcggcatggac
gagctgtacaagtaa

Sequenz des TRPV6_long-Konstruktes (3030 bp gesamt)

→ TRPV6_long Sequenz (blau) - GS linker (grün) – mCherry-Sequenz (rot)

acgggaccttacagggagacggtgggcccggccttgggggggctgatgtggcccaaggctgagtcctcagggctcggcctcggcctcagg
cccccaaggagccggccttacacccatgggttgcactgccaaggagaaaggctaattctctgcctatggagcaagttctgcagatggtcca
gagacgggagtcctggcccagagccgagatgagcagaacctgctgcagcagaagaggatctgggagtcctctcctctagctgccaagata
atgatgtccaggccctgaacaagttgctcaagtatgaggattgcaaggtgcaccagagaggacatgggggaaacagcgctacacatagcagc
cctctatgacaacctggaggcccatggtgctgatggaggctgccccggagctggtctttgagccatgacatctgagctctatgagggtcagactg
cactgcacatcgctgttgaaccagaacatgaacctggtgcgagccctgcttggccgcaggccagtgctctgccagagccacaggcactgcctt
ccgccgtagtcctgcaacctcatctacttggggagcacccttgccttgcctgtgtaaacagtgaggagatcgtgcggtgctcattgagcatg
gagctgacatccggcccaggactccctgggaaacacagtgttacacatcctcatcctccagcccaaaaaccttggcctgcccagatgtacaacct
gttgcctcctacgacagacatggggaccacctgcagcccctggacctcgtgcccacaccagggtctcacccttcaagctggctggagtgagg
ggtaacactgtgatgttcagcacctgatgcagaagcggaagcacaccagtgacgtatggaccactgacctgactctctatgacctcacagag
atcgactcctcaggggatgagcagtcctgctggaactatcatcaccaccaagaagcgggaggctcgcagatcctggaccagacgcccgtga
aggagctggtgagcctcaagtgaagcggtacggggccgctactctgcatgctgggtccatatactgctgtacatcatctgctcaccatgtgctg
catctaccgcccctcaagcccaggaccaataaccgcacgagccccgggacaacaccctctacagcagaagctactcaggaagcctacatg
accctaaggacgatccggctggtcggggagctggtgactgctattggggctatcatcatcctgctggtagaggtccagacatctcagaatggg
ggtcactcgtcttggacagaccatcctggggcccattccatgctcctcatcatcacctatgccttcatggtgctggtgacctggtgatgaggctcat
cagtgccagcggggagggtggtaccatgtccttgcactcgtgctgggctggtgcaacgtcatgtacttcccggaggattccagatgctaggcccctt
caccatcatgattcagaagatgattttggcgacctgatgcattctgctggtgatggctggtgcatcctggccttggctcagcctctatcatctcca
gacagaggaccccaggagctaggccactctacgactaccccatggccctgttcagcaccttcgagctgttccctaccatcatcgatggcccagcc
aactacaacgtggacctgcccttcatgtacagcatcacctatgtgccttggccatcatgccacactgctcatgtcaacctcctcattgccatgatggg
cgacactcactggcgagtggccatgagcgggatgagctgtggaggccagattgtggccaccacggtgatgctggagcggaaagctgcctcgct
gcctgtggcctcgctccgggatctgcggacgggagatggcctgggagaccgctggttctgcgggtggaagacaggcaagatcaaccggcag
cgatccaacgctacgcacaggcctccacaccggggctctgaggattggacaaagactcagtggaactagagctgggctgtccctcag
ccccacctgtccctcctatgccctcagtgctcgaagtaccccgcagcagtgccaattgggaaaggctcggcaaggaccctgaggagagac
ctgctggtgataatcaacaggggtctggaggacggggagagctgggaatatcagatcgggagctggaggcgggtcagggtgagtgagcaagg
gagaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgctcaagggtcacatggagggtcctcgtgaacggccacaggttcgagatcagggg
cgagggcgagggccgcccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtagcaagggtggccccctgccttcgctgggacatcctgctc
ccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccggcagatccccgactactgaagctgtcctccccgagggctcaagtgggag
cgctgatgaactcagaggacggcggcgtggtgacctgaccaggactcctcctcagggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcggg
caccaactccccccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgcctg
aagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggcactacgacgctgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccgtgc
agctcccggcgctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcccagg
gccgcactccaccggcggcatggagcgtgtacaagtaa

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke im besonderen Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Ermöglichung meiner Promotion und die Betreuung der Doktorarbeit.

Frau Prof. Dr. Petra Kioschis möchte ich besonders für die interessante und vielseitige Aufgabenstellung sowie die wirklich außergewöhnliche Betreuung der Doktorarbeit danken. Durch die intensiven Diskussionen wurde ich immer wieder zum Nachdenken angeregt und erhielt, wenn nötig, Impulse, mit denen die Arbeit wieder einen Schritt vorangetrieben wurde. Besonders bedanken möchte ich mich auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen während der vergangenen vier Jahre.

Ich danke Dr. Andreas Holloschi ganz herzlich für seine fachlichen Diskussionen, seine Hilfsbereitschaft vor allem im Bereich der Mikroskopie und Datenanalyse sowie seinen beständigen Optimismus.

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei Dr. Hella-Monika Kuhn bedanken, die mir während der gesamten Zeit mit ihrer Hilfsbereitschaft, ihren fachlichen Ratschlägen und immer wieder neuen Ideen und Lösungen für auftauchende Probleme zur Seite stand. Sie hat ganz wesentlich dazu beigetragen, meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei allen weiteren Mitarbeitern und Doktoranden des MZB-Labors für die fachliche Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Ihr seid immer für mich da gewesen, wenn ich aufgebaut werden musste oder jemanden zum Reden brauchte. Dank euch waren die letzten vier Jahre eine Zeit, an die ich gern zurückdenke.

Des Weiteren danke ich dem BMBF für die finanzielle Förderung meiner Doktorarbeit im Rahmen des NANOKAT-Promotionskollegs.

Meinem Freund Christoph Stiefel möchte ich ganz herzlich für die moralische Unterstützung, seine Hilfe in IT-Angelegenheiten und sein Verständnis danken. Ich weiß, dass die letzten Jahre nicht immer einfach waren. Trotzdem hat er nie die Geduld verloren und mich in allen Angelegenheiten so gut wie möglich unterstützt. Ohne ihn wäre ich nicht so weit gekommen.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer mit allen ihnen zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützt haben und in jeder Lebenslage hinter mir standen. Durch eure aufbauenden Worte und euren Glauben in mich habe ich so manch schwere Zeit überstanden. Vielen Dank!