

Aus der Klinik für Innere Medizin und Nephrologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Joachim Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Regulation und pathophysiologische Rolle der
Calcium-permeablen Kationenkanäle TRPM7 und
TRPC6 in Abhängigkeit des $K_{Ca}3.1$ -Kanals im
Transdifferenzierungsprozess renaler Myofibroblasten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Richard Pape aus Berlin

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.11.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. J. Hoyer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. F. Czubayko

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	12
1.1 Klinischer Hintergrund: Fibrotische Erkrankung der Niere.....	12
1.2 Die Rolle von Myofibroblasten bei der Fibroseentstehung.....	12
1.3 Zellkulturmodelle der Nierenfibrose.....	14
1.4 Ionenkanäle und Calcium als Regulatoren der Zellfunktion.....	15
1.4.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle.....	15
1.4.1.1 $K_{Ca}3.1$ (IK1, <i>intermediate conductance</i> , <i>KCNN4</i>).....	16
1.4.2 Calcium-leitende Kationenkanäle der TRP-Familie.....	17
1.4.2.1 TRPM7.....	19
1.4.2.2 TRPC6.....	22
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	28
2 Material.....	29
2.1 Geräte.....	29
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.3 Chemikalien.....	31
2.4 Primer.....	33
2.5 Antikörper.....	33
2.6 Standardisierte Systeme.....	34
2.7 Allgemeine Puffer.....	34
3 Methoden.....	35
3.1 Zellkultur.....	35
3.1.1 Zelllinie NRK-49F.....	35
3.1.2 Zelllinie HEK-293.....	35
3.1.3 Zelllinie A7r5.....	35
3.1.4 Primäre renale Maus-Fibroblasten.....	35
3.1.5 Nährmedien.....	35
3.1.6 Kultivierung der verschiedenen Zelllinien.....	36
3.1.7 Zellzahlbestimmung.....	36

3.1.8	Starvation und TGF β -Behandlung der NRK-49F-Zellen.....	36
3.1.9	TGF β -Behandlung der primären Maus-Fibroblasten.....	37
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1	RNA-Isolation.....	37
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	37
3.2.3	Reverse Transkription für cDNA-Synthese.....	37
3.2.4	RT-PCR.....	38
3.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	39
3.2.6	Quantitative real-time RT-PCR.....	40
3.3	Transfektionen.....	42
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.4.1	Zellernte und Proteingewinnung.....	42
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.4.3	Western Blot und Immunodetektion.....	44
3.5	Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie.....	45
3.6	Elektrophysiologie.....	45
3.6.1	Grundprinzip der Patch-Clamp Technik.....	46
3.6.2	Messstand.....	47
3.6.3	Whole-Cell Messungen.....	48
3.6.4	Versuchsablauf.....	49
3.6.5	Extra- und intrazelluläre Lösungen.....	50
3.6.6	Datenaufzeichnung und -auswertung.....	51
3.7	Calcium-Imaging mittels Fura-2.....	51
3.7.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.....	51
3.7.2	Der Messstand.....	52
3.7.3	„Beladen“ der Zellen mit Fura-2/AM.....	52
3.7.4	Versuchsablauf.....	52
3.7.5	Datenaufzeichnung und -auswertung.....	53
3.8	Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen.....	53
3.9	Statistische Analyse.....	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Calcium-abhängige Kaliumkanäle in renalen Fibroblasten.....	54
4.1.1	Detektierung von mRNA der K _{Ca} 3.1-, K _{Ca} 1.1- und K _{Ca} 2.3-Kanäle.....	54

4.1.2	Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals unter TGF- β -Stimulation.....	55
4.1.3	Elektrophysiologische Untersuchung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals.....	56
4.1.4	Assoziation zwischen $K_{Ca}3.1$ -Aktivität und Ca^{2+} -Einstrom.....	58
4.2	Calcium-leitende Kationenkanäle in renalen Fibroblasten.....	60
4.2.1	TRPM7.....	60
4.2.1.1	Detektierung der TRPM7-mRNA.....	60
4.2.1.2	Elektrophysiologische Untersuchung des TRPM7-Kanals.....	61
4.2.1.3	Modifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch TRPM7-Aktivierung.....	65
4.2.1.4	Untersuchung der Expression von TRPM7 unter TGF- β -Stimulation	66
4.2.1.5	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen TGF- β -Stimulation und TRPM7-Strom.....	67
4.2.2	TRPC6.....	69
4.2.2.1	Untersuchung des Einflusses von TGF- β auf die TRPC6-Transkription.....	69
4.2.2.2	Untersuchung der TRPC6-Translation.....	71
4.2.2.3	Elektrophysiologische Untersuchung der TRPC6-Funktion.....	72
4.2.2.4	Untersuchung des mit TRPC6 assoziierten Calciumeinstroms nach TGF- β -Stimulation.....	73
4.2.2.5	Untersuchung der Transdifferenzierung von Fibroblasten-Primärkulturen aus TRPC6-KO Mäusen.....	77
5	Diskussion.....	78
5.1	Das NRK-Zellmodell.....	78
5.2	Calcium-abhängige Kaliumkanäle.....	79
5.3	TRPM7.....	80
5.4	TRPC6.....	81
5.5	Resultierende Modellvorstellung.....	83
5.6	Therapeutische Perspektiven.....	86
6	Zusammenfassung.....	87
7	Literaturverzeichnis.....	91
8	Anhang.....	98
8.1	Lebenslauf.....	98
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	100
8.3	Danksagung.....	101

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	102
-----------------------------------	-----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Differenzierung zum Myofibroblasten.....	13
Abbildung 2: Expression von α SMA in TGF β -behandelten NRK-Zellen.....	14
Abbildung 3: Aufbau des K _{Ca} 3.1-Kanals.....	16
Abbildung 4: Die Familie der humanen TRP-Kanäle.....	18
Abbildung 5: Struktur von TRPM7 und Naltriben.....	20
Abbildung 6: Aufbau und Regulation des TRPC6-Kanals.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Whole-Cell-Konfiguration.....	47
Abbildung 8: Patch-Clamp Messkreis.....	48
Abbildung 9: Verwendete Spannungsrampe in der whole-cell-Konfiguration.....	49
Abbildung 10: Nachweis von mRNA der K _{Ca} 3.1-, K _{Ca} 2.3- und K _{Ca} 1.1-Kanäle in NRK-49F-Zellen.....	55
Abbildung 11: Erhöhte Expression von K _{Ca} 3.1-mRNA nach TGF β -Stimulation.....	56
Abbildung 12: Calcium-aktivierter Kaliumstrom durch den K _{Ca} 3.1-Kanal in NRK-Zellen.....	57
Abbildung 13: Die Aktivierung des K _{Ca} 3.1-Kanals induziert in NRK-Zellen einen Calcium-Einstrom.....	59
Abbildung 14: Vergleich des Calciumeinstroms mit und ohne extrazellulärem Magnesium bei Applikation von SKA-31.....	59
Abbildung 15: Nachweis der TRPM7-mRNA in NRK-Zellen.....	60
Abbildung 16: TRPM7-Strom in NRK-Zellen.....	62
Abbildung 17: Quantifizierung des TRPM7-Stroms in NRK-Zellen.....	62
Abbildung 18: Intrazelluläres Magnesium blockiert die Aktivierung eines Kationen-Auswärtsstromes in NRK-Zellen.....	63
Abbildung 19: Die Applikation von Naltriben induziert in NRK-Zellen eine Stromantwort.....	63
Abbildung 20: Die Absenkung des pH-Wertes erhöht in NRK-Zellen den Kationeneinstrom.....	64
Abbildung 21: Die Applikation von Naltriben bewirkt in NRK-Zellen einen Calcium-Einstrom.....	65
Abbildung 22: Vergleich des Fluoreszenz-Signals bei Magnesium-freier Badlösung ohne und mit Naltriben-Applikation.....	66
Abbildung 23: Unter TGF- β -Stimulation zeigt sich in NRK-Zellen keine signifikante Änderung der TRPM7-Expression.....	67
Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses der TGF- β -Stimulation auf den TRPM7-	

Strom in NRK-Zellen.....	68
Abbildung 25: Der TRPC6-Kanal ist in NRK-Zellen exprimiert.....	69
Abbildung 26: Verstärkte Expression der TRPC6-mRNA durch TGF- β -Stimulation in NRK-Zellen.....	70
Abbildung 27: Nachweis des TRPC6-Proteins ins NRK-Zellen.....	72
Abbildung 28: Darstellung der Überexpression von TRPC6 in HEK-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	72
Abbildung 29: Vergleich von TRPC6-Strom in A7r5-Zellen mit NRK-Zellen.....	73
Abbildung 30: TRPC6-Transfektion und Fura-Messung in HEK-Zellen.....	75
Abbildung 31: Mit OAG assoziierter Calcium-Einstrom in NRK-Zellen nach TGF- β -Stimulation.....	75
Abbildung 32: Vergleich des Calcium-Einstroms nach TGF β -Stimulation mit und ohne OAG-Applikation.....	76
Abbildung 33: Reduzierter Anstieg des Myofibroblasten-Paramters α SMA im TRPC6-KO.....	77
Abbildung 34: Modell des Transdifferenzierungsvorgangs in renalen Fibroblasten unter Beteiligung der Ionenkanäle $K_{Ca}3.1$, TRPM7 und TRPC6.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen.....	11
Tabelle 2: Wichtige Inhibitoren des TRPM7-Kanals.....	21
Tabelle 3: Wichtige Inhibitoren des TRPC6-Kanals.....	25
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	30
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotid-Primer.....	33
Tabelle 8: Verwendete Primäre Antikörper.....	33
Tabelle 9: Verwendete Sekundäre Antikörper.....	33
Tabelle 10: Verwendete Kit-Systeme.....	34
Tabelle 11: Verwendete Puffer.....	34
Tabelle 12: iScript-Reaktionsansatz.....	38
Tabelle 13: iScript Thermoprofil.....	38
Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.....	39
Tabelle 15: Cyclersprogramm für RT-PCR.....	39
Tabelle 16: qPCR Cyclers-Programm.....	41
Tabelle 17: Programm zur Schmelzkurvenanalyse.....	41
Tabelle 18: Verwendete Plasmide.....	42
Tabelle 19: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	43
Tabelle 20: Verwendete extrazelluläre Lösung (B1).....	50
Tabelle 21: Verwendete intrazelluläre Lösungen für TRPM7 (P-M7), K _{Ca} 3.1 (P-IK), TRPC6 (P-C6).....	50
Tabelle 22: Zusammenfassung der elektrophysiologischen Untersuchungen zum Nachweis des TRPM7-Kanals in NRK-49F-Zellen.....	64
Tabelle 23: Δ ct-Werte für TRPC6-Primer nach Stimulation/Transfektion von NRK49F- Zellen.....	71

Abkürzungsverzeichnis

[Ca²⁺]_i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
2-APB	2-aminoethyl diphenylborinate
A/D-Wandler	Analog-Digital-Wandler
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	<i>calmodulin-dependent kinase II</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
dest. H₂O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosid-5'-triphosphate
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
et al.	(et alteris) und andere
FBS	fetal bovine serum
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
I	Stromstärke

Ig	Immunglobulin
IP₃	Inositol(1,4,5)-trisphosphat
KCa	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
M	Molar (mol/l)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuche
NRK-49F	<i>Normal rat kidney fibroblasts</i>
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	pH-Wert, pondus hydrogenii
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	Rückkopplungswiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	receptor-operated channels
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur
SKA-31	Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	Standard error, Standardfehler des Mittelwerts
SOCE	store-operated calcium entry
TBS(-T)	tris bufferd saline (Tween 20)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	transforming growth factor β

TRAM-34	Triarylmethan-34 = 1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	transcient receptor potential
U	Spannung
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
αSMA	A smooth muscle actin

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund: Fibrotische Erkrankung der Niere

Fibrose bildet die gemeinsame Endstrecke vieler Pathologien des Nierenparenchyms die zur chronischen Niereninsuffizienz führen. Dabei folgt einer Schädigung der Glomeruli und des Tubulusapparates eine Transdifferenzierung von im Interstitium residenten renalen Fibroblasten in proliferative Myofibroblasten. Zusätzlich wird die Entstehung von aktivierten Fibroblasten durch einen epithelial-mesenchymalen Übergang aus Tubulusepithelzellen sowie auf anderen Zelltypen beruhenden Mechanismen diskutiert [Lovisa et al. 2016; Grgic et al. 2012]. Bei akuten Nierenschädigungen stehen normalerweise Tubulusreparaturen durch zelluläre Regeneration des Tubulusapparates im Vordergrund, während fibrosierende Prozesse nachrangig beteiligt sein können. Bei schweren akuten Nierenschädigungen und bei chronischen Nierenschädigungen kommt es jedoch zu einer übermäßigen oder dauerhaften Stimulation der Fibrose, die mit einer überschießenden Anreicherung extrazellulärer Matrix verbunden ist. Damit verknüpft ist der Verlust an funktionellen Nephronen und ein bindegewebiger Umbau des Parenchyms. Die gesamte Niere verliert hierbei an Volumen, gleichzeitig nimmt die Gewebedichte zu - klinisch spiegelt sich dieser Prozess in einer chronischen Nierenfunktioneinschränkung im Sinne einer chronischen Niereninsuffizienz wieder [Hewitson et al. 1989].

Mit einer weltweiten Prävalenz von 8-16 % zählt die chronische Niereninsuffizienz zu den häufigen Erkrankungen [Jha et al. 2013], im Endstadium ist eine Dialysetherapie oder Nierentransplantation unumgänglich. Von außerordentlichem Interesse ist deshalb die möglichst frühzeitige Unterbrechung bzw. Verlangsamung des die Grunderkrankung begleitenden Fibrosegeschehens. Gleichzeitig ist der Grad der tubulointerstitiellen Fibrose ein zuverlässiger Prädiktor für die zukünftige Abnahme der GFR. Bisher gibt es, abgesehen von vereinzelt Hinweisen aus klinischen Studien [Breyer et al. 2016], keine etablierten Behandlungskonzepte, die Grundlagenforschung weist in diesem Bereich dementsprechend ein weites Spektrum auf.

1.2 Die Rolle von Myofibroblasten bei der Fibroseentstehung

In der gesunden Niere sind Fibroblasten im Interstitium ruhende und spindelförmig erscheinende Zellen, die durch eine basale Produktion von extrazellulärer Matrix die

strukturelle Integrität des Organs aufrecht erhalten. Bei Schädigungen des Nierengewebes erfolgt eine Stimulation der Fibroblasten durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hypoxie oder mechanische Kräfte. Dies resultiert in einer Produktion von Bindegewebe in Form von Kollagen (I, III, IV) sowie Fibronectin [Kessler et al. 2001] und wird maßgeblich von TGF- β gesteuert [Loboda et al. 2016; Fukasawa et al. 2004, Kopp et al. 1996]. Ein wesentliches Merkmal der pathologischen Produktion von extrazellulärer Matrix ist, dass die Fibroblasten aktiviert bleiben und zunehmend quervernetzt sind.

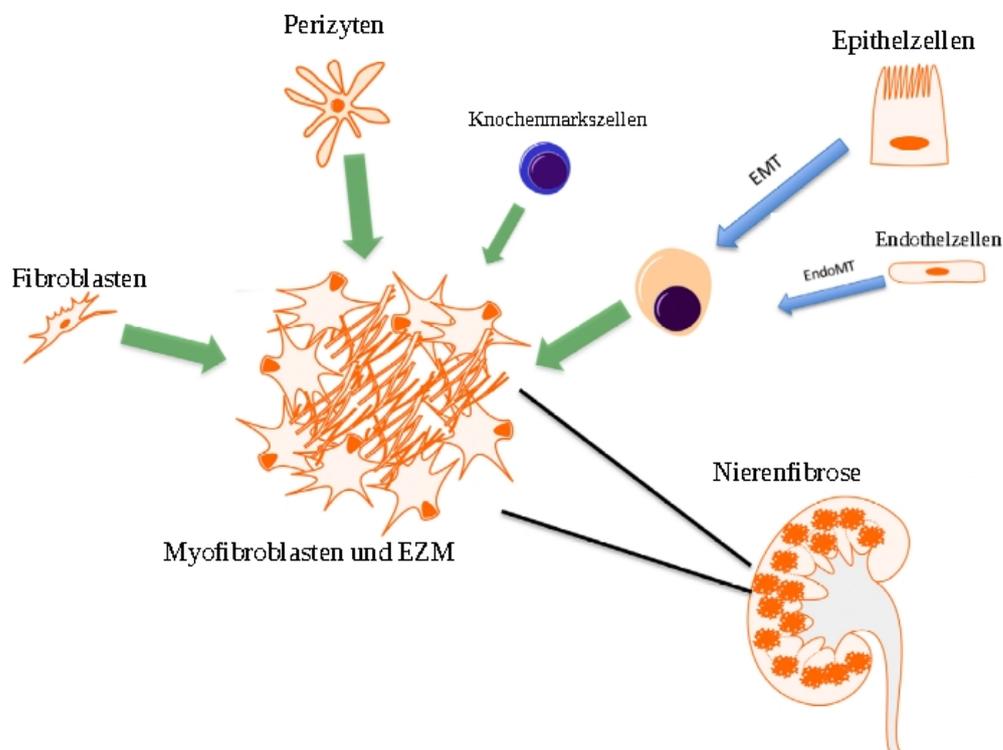


Abbildung 1: Die Differenzierung zum Myofibroblasten

Schematische Darstellung der verschiedenen Differenzierungswege zum Myofibroblasten. Extrazelluläre Matrix (EZM), Epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT), endothel-mesenchymaler Übergang (EndoMT). Modifiziert nach Sun et al. 2016.

Aktivierte Fibroblasten zeichnen sich durch die Expression von α SMA aus und werden als Myofibroblasten bezeichnet. Durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion spielen sie eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und erscheinen phänotypisch als eine Mischform aus glatter Muskelzelle und Fibroblast. Die Anreicherung von Myofibroblasten korreliert mit dem Fortschritt der fibrotischen Erkrankung [Darby et al. 2007;

Alpers et al. 1992; Hewitson et al. 1995]. Neben interstitiellen Fibroblasten werden auch Epithelzellen und den interstitiellen Kapillaren anhaftenden Perizyten die Fähigkeit zur Transformation zum Myofibroblasten zugesprochen. Für Endothel- und aus dem Knochenmark stammenden Zellen wird dies diskutiert [Sun et al. 2016] (Abbildung 1). Bei etwa der Hälfte der α SMA produzierenden Zellen scheinen interstitielle Fibroblasten die Vorgängerzellen zu sein [LeBleu et al. 2013].

1.3 Zellkulturmodelle der Nierenfibrose

Für die *in vitro* Untersuchung von fibrotischen Geschehen werden typischerweise verschiedene immortalisierte oder sogenannte primäre Zellkulturen verwendet (Isolation beispielsweise aus Maus, Ratte oder Mensch). Sie zeichnen sich durch eine einfache und kostengünstige Handhabbarkeit aus. Zu beachten ist, dass diese Zellmodelle zur Untersuchung spezifischer Signaltransduktionsprozesse geeignet sind, jedoch die komplexe dreidimensionale Struktur der Niere bzw. das Zusammenspiel von multiplen Zelltypen unzureichend abbilden.

NRK49F-Zellen sind immortalisierte, aus der Rattenniere stammende Fibroblasten und wurden von Larco et al. 1978 kultiviert. Der Einfluss von TGF β induziert unter anderem eine Änderung der Morphologie und die gesteigerte Expression von α SMA [Knapp S. 2016] (Abbildung 2). Im Vergleich zu anderen Fibroblasten-Zellmodellen ist die TGF β -Stimulierung von NRK-Zellen stabil und gut reproduzierbar. Diese werden von verschiedenen Arbeitsgruppen als Zellmodell für eine Erforschung von Mechanismen der renalen Fibrose verwendet [Yi et al. 2018].

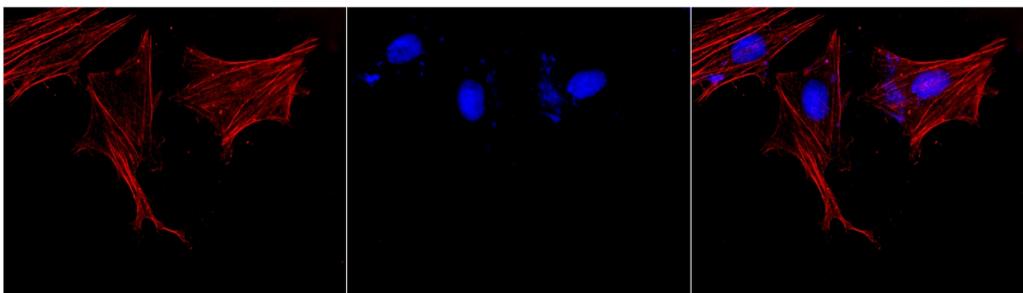


Abbildung 2: Expression von α SMA in TGF β -behandelten NRK-Zellen

Mit TGF β inkubierte NRK-Zellen wurden nach 48 h fixiert und mit einem α SMA-Antikörper gefärbt: Es zeigt sich das für Myofibroblasten typische „Fischgrätenmuster“ der α SMA-Fasern. Vergrößerung 40-fach. Von links: α SMA-Färbung, DAPI-Färbung, Überlagerung der beiden Färbungen.

1.4 Ionenkanäle und Calcium als Regulatoren der Zellfunktion

Die intrazelluläre Calciumhomöostase ist ein komplexer und von der Zelle streng regulierter Prozess, der in verschiedenen Geweben und Organen sowohl für physiologische Zellfunktionen als auch pathologische Veränderungen ursächlich ist. Veränderungen der Calciumkonzentration induzieren beispielsweise die Aktivierung von Ionenkanälen, Freisetzung von Transmittern bzw. Hormonen oder Translokation von Transkriptionsfaktoren. In der Folge können Prozesse wie Muskelkontraktion, zelluläre Sekretion, neuronalen Signaltransduktion oder Zellmigration beeinflusst werden. Eine durch Calcium vermittelte Aktivierung von Enzymen, die oft der Phosphorylierung dienen, kann dabei zwischengeschaltet sein. Die Modulation des zellulären Expressionsmusters ist in diesem Zusammenhang eine weitere mögliche Folge der Enzymaktivierung. Auch für Fibroblasten wird der intrazellulären Calciumkonzentration eine zentrale Rolle bei regulatorischen Prozessen zugeordnet [Chen et al. 2016; Zhang et al. 2016, Olson et al. 2008].

Calcium wird entweder aus den intrazellulären Speichern freigesetzt oder durch Ionenkanäle in das Zellinnere geleitet. Diese gehören verschiedenen Kanalfamilien an und können für Calcium-Ionen sowohl selektiv als auch unspezifisch permeabel sein. Durch Hyperpolarisation der Zelle sind Kaliumkanäle in der Lage die elektrische Triebkraft für Kationen zu beeinflussen: Dies ist nach erfolgtem Calciumeinstrom für eine Wiederherstellung der Triebkraft notwendig oder kann eine Forcierung des Calcium-Stroms von extra- nach intrazellulär bewirken.

1.4.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind in der Zellmembran lokalisierte Proteine, deren Leitfähigkeit für Kalium-Ionen besonders ausgeprägt ist und in nahezu allen erregbaren und nicht erregbaren Zellen vorkommen. Der Aktivierungs- bzw. Öffnungsmechanismus ist das Hauptmerkmal zur Unterscheidung der verschiedenen Kaliumkanäle.

Die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}) können anhand ihrer Einzelkanalleitfähigkeit, dem detaillierten Aktivierungsmechanismus und dem Verteilungsmuster in verschiedenen Zelltypen unterschieden bzw. klassifiziert werden. Sie wurden erstmals von Gardos 1958 in Erythrozyten beschrieben und sind mittlerweile in die 6TM/1P(6 Transmembrandomänen/1 Porendomäne)-Familie der IUPHAR-Nomenklatur eingeordnet. Diese besteht aus den nach Leitfähigkeit

eingeteilten Unterklassen: BK_{Ca} , IK_{Ca} und SK_{Ca} .

1.4.1.1 $K_{Ca3.1}$ (IK1, *intermediate conductance*, *KCNN4*)

In Fibroblasten kommt dem Subtyp $K_{Ca3.1}$ -Kanal eine wichtige Rolle zu. Er weist eine mittlere Leitfähigkeit (*intermediate conductance*, kurz IK) auf und besteht aus vier α -Untereinheiten, deren Kalium-selektive Poren zwischen den Segmenten S5 und S6 liegen (Abbildung 3). Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal zeigt eine Einwärts-Rektifizierung, ist nicht spannungsabhängig und besitzt für Calciumionen eine EC_{50} von 250 nM. Nur wenn alle vier Untereinheiten eine durch Calmodulin vermittelte Konformationsänderung aufweisen, kommt es zur Öffnung des Kanals, welche bei symmetrischer Kaliumkonzentration in einer Leitfähigkeit von etwa 40 pS resultiert. Die Expression des Kanals konnte in Zellen des Gefäßendothels, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Erythrozyten, Leberzellen sowie Lungen- und Placentagewebe gezeigt werden.

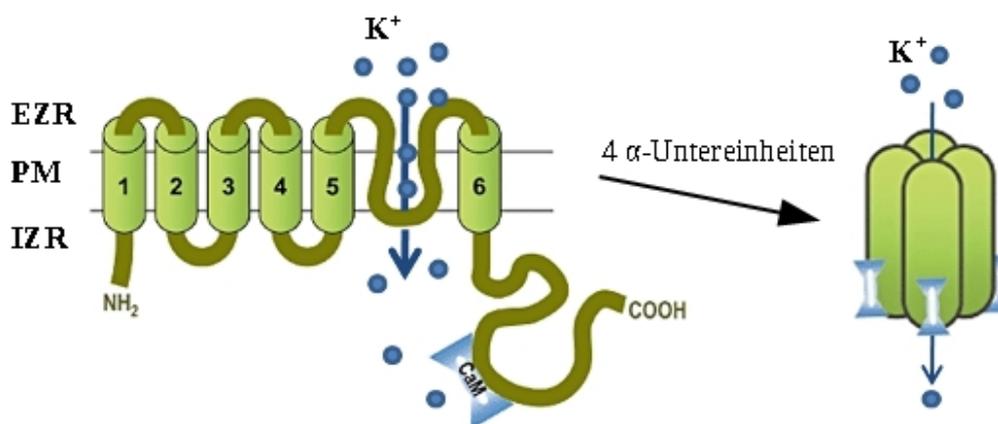


Abbildung 3: Aufbau des $K_{Ca3.1}$ -Kanals

Eine Untereinheit des $KCa3.1$ -Kanals besteht aus sechs Segmenten mit einer Kalium-selektiven Pore zwischen S5 und S6. Vier α -Untereinheiten lagern sich zu einem Homotetramer zusammen und bilden somit den vollständigen Kanal. Die von Calcium abhängige Öffnung des Kanals wird durch Calmodulin vermittelt. Extrazellulär- (EZR), Intrazellulär- (IZR), Plasmamembran- (PM), Calmodulin (CaM), Segment (S). Modifiziert nach Grgic et al. 2009.

Neben vielen unspezifischen pharmakologischen Aktivatoren des $K_{Ca3.1}$ -Kanals existieren die von Riluzol abgeleiteten und somit untereinander sehr ähnlichen Stoffe SKA-31, SKA-111 und SKA-121 [Sankaranarayanan et al. 2009, Coleman et al. 2014]. Sie besitzen die höchste Selektivität für den $K_{Ca3.1}$ -Kanal und wirken mit einem

EC₅₀-Wert von 260 nM, 111 ± 27 nM bzw. 13.7 ± 6.9 µM. Wahrscheinlich beruht der Wirkungsmechanismus auf der Beeinflussung der Interaktion zwischen Calmodulin und der α-Untereinheit. Der üblicherweise eingesetzte und am umfangreichsten untersuchte Inhibitor des Kanals ist TRAM-34 [Wulff et al. 2001]. TRAM-34 wurde von Clotrimazol ausgehend entwickelt und blockiert den K_{Ca}3.1-Kanal durch Bindung in der Porenregion.

Gut untersucht ist die funktionelle Rolle des Kanals bei der lymphozytär vermittelten Immunantwort und der Proliferation von Endothelzellen. Aber auch in anderen Zelltypen und Geweben ist eine physiologische Funktion anzunehmen. Es gibt Hinweise darauf, dass der K_{Ca}3.1-Kanal unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst und dadurch beispielsweise den Prozess der Migration in dendritischen Zellen steuert [Crottes et al. 2016; Penna et al. 2015].

Ebenso liegen Untersuchungen des Kanals bei Fibroseprozessen vor: Es wurde gezeigt, dass eine Blockade des K_{Ca}3.1-Kanals das Ausmaß der Funktionseinschränkung bei akuten Nierenschädigungen reduziert [Chen et al. 2016] und die Fibrosierung von Nierengewebe vermindert [Grgic et al. 2009]. Die phänotypische Differenzierung zum Myofibroblasten wird in Zellen des Mesangiums vom K_{Ca}3.1-Kanal beeinflusst [Fu et al. 2014]. Auch bei fibrotischen Veränderungen des Myokards ist der Kanal beteiligt [Wang et al. 2016] und zählt bei kardiovaskulären Erkrankungen zu den pharmakologisch beeinflussbaren Kandidaten für eine therapeutische Intervention [Köhler et al. 2016; Dong et al. 2016].

1.4.2 Calcium-leitende Kationenkanäle der TRP-Familie

Die TRP-Kanäle bilden eine Familie unterschiedlich selektiver Kationenkanäle, die unter physiologischen Bedingungen eine Permeabilität vor allem für Natrium und die divalenten Kationen Calcium und Magnesium aufweisen. Die Entdeckung des TRP-Gens geht auf eine *Drosophila melanogaster*-Mutante zurück, die bei Messungen mit Hilfe eines Elektretinogramms eine transiente Spannungsantwort zeigte. Zwischen erster funktioneller und genetischer Identifizierung vergingen 20 Jahre [Cosens et al. 1969; Montell et al. 1989]. Heutzutage ist bekannt, dass das humane Genom für insgesamt 27 verschiedene Kanäle kodiert [Nilius et al. 2001]. Diese gehören einer der sechs Unterfamilien an: TRPM-(Melastatin), TRPC-(Canonische), TRPA-(Ankyrin), TRPV-(Vanniloid), TRPML-(Mucolipin) und TRPP-(Polycystin)

Kanäle (Abbildung 4). Vermutlich alle TRP-Kanäle besitzen sechs Transmembrandomänen, hierbei liegt der porenformende Loop zwischen Domäne fünf und sechs. Sowohl C-, als auch N-Terminus befinden sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran (Abbildung 5). Neben der Zusammenlagerung zu Homotetrameren wurde auch eine Zusammenlagerung zu heteromultimeren Kanälen beobachtet – die Art der Anordnung gilt als ein die Ionenselektivität beeinflussender Faktor [Schaefer 2005]. Kanäle der TRP-Familie kommen in zahlreichen unterschiedlichen Geweben vor und erfüllen wichtige physiologische Funktionen wie Temperatur-(TRPM8, TRPV1) oder Schmerzwahrnehmung (TRPA1).

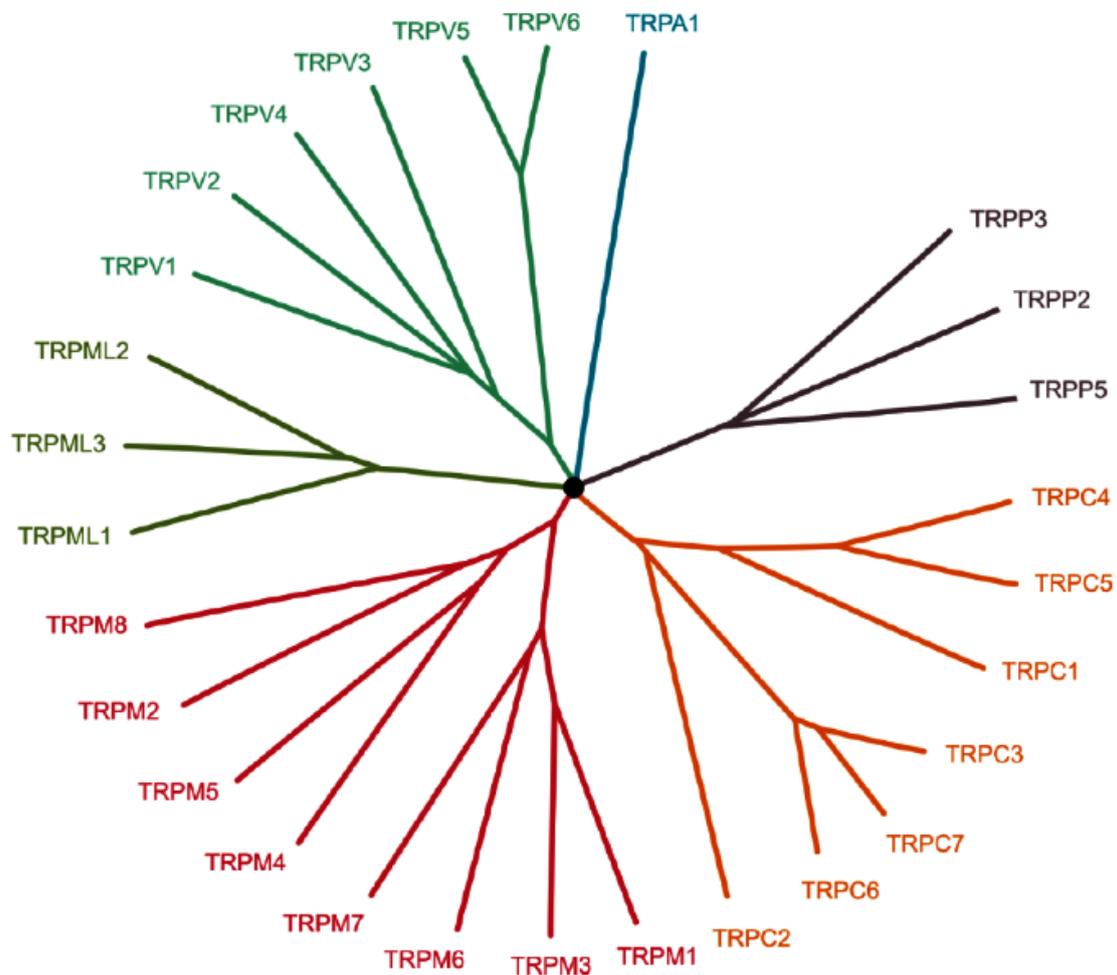


Abbildung 4: Die Familie der humanen TRP-Kanäle

Darstellung der sechs humanen TRP-Unterfamilien und deren zugehörige Ionenkanäle. Dabei ist zu beachten, dass TRPC2 ein Pseudogen darstellt. Modifiziert nach Nilius et al 2011.

Ebenso vielfältig präsentiert sich die Art der Aktivierung bzw. Hemmung der verschiedenen Kanäle. Neben der direkten Modulation durch Temperatur, pH-Wert oder mechanische Stimuli ist die Steuerung der Kanalaktivität durch intra- oder extrazelluläre Botenstoffe (Ligandenbindung, Tyrosinkinase, G-Proteine) sowie andere chemische Stoffe verschiedenster Struktur beobachtet worden [Vriens et al. 2008]. Sowohl der TRPM7- als auch der TRPC6-Kanal sind nicht-spannungsabhängig und potentiell calcium-permeabel.

1.4.2.1 TRPM7

Die TRPM-Unterfamilie bildet mit acht Mitgliedern die umfangreichste Gruppe der humanen TRP-Kanäle. Jeweils vier Paare stellen eine weitere Untergruppe dar, wobei diese Einteilung auf Sequenzhomologien basiert: TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM4/TRPM5 und TRPM6/TRPM7. Die verschiedenen TRPM-Kanäle unterscheiden sich durch das Expressionsmuster in verschiedenen Geweben, die physiologische Funktion und jeweiligen Regulationsmechanismen.

Der TRPM7-Kanal vereint einen Ionentransporter und eine Kinase-Aktivität in einem Protein – eine Eigenschaft, die bisher lediglich von zwei weiteren Kanälen der gleichen Unterfamilie bekannt ist, TRPM6 und TRPM2 [Schlingmann et al. 2002]. Im humanen Genom ist das TRPM7-Gen auf Chromosom 15q21.2 lokalisiert und kodiert für 1865 Aminosäuren, gleichzeitig wird die Existenz von neun Splice-Varianten angenommen. Akzessorische Untereinheiten sind bis jetzt nicht bekannt. Eine ubiquitäre Expression mit unterschiedlicher Ausprägung in verschiedenen Geweben ist wahrscheinlich [Kunert et al. 2006], zusätzlich scheint der Kanal in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung eine signifikante Expressionsregulation zu erfahren [Staaf et al. 2010].

Wie alle bisher bekannten TRP-Kanäle besitzt auch der TRPM7-Kanal sechs transmembranäre Domänen. Einer bei TRPM-Kanälen weit verbreiteten zytoplasmatischen *coiled-coil*-Domäne, die vermutlich dem Kanaleinbau und der -verschiebung innerhalb der Membran dient, folgt Richtung C-Terminus die für TRPM7 charakteristische Serin/Threonin-Kinase [Fujiwara et al. 2008; Ryazanova et al. 2004] (Abbildung 5). Wird diese Kinase mittels einer Caspase vom restlichen Kanalprotein disloziert, resultiert dies in einer gesteigerten Kanalaktivität [Desai et al. 2012]. Zahlreiche von der Kinase phosphorylierte Proteine sind für die Zellfunktion

unabdingbar: nicht-muskuläre Myosine, Motorproteine, Annexin A1 oder der eukaryotische Elongationsfaktor 2 (eEF-2).

Die elektrophysiologische Charakteristik von TRPM7 ist ebenso komplex und vielseitig wie die verschiedenen Regulationsmechanismen. Der Kanal zeigt bei Hyperpolarisation der Zelle eine Selektivität für divalente Kationen, bei Depolarisierung nimmt auch der Fluss von monovalenten Kationen zu [Nadler et al. 2001]. Unter intrazellulär Magnesium-freien Bedingungen präsentiert er sich als ein nicht-spannungsabhängiger Kanal mit auswärts-rektifizierender Strom/Spannungskurve, dies gilt jedoch nur bei Anwesenheit von extrazellulären divalenten Ionen. Diese Blockade des Einwärtsstroms durch divalente Kationen zeigt wiederum eine Spannungsabhängigkeit [Kerschbaum et al. 2003]. Bei vollständiger Abwesenheit von extrazellulären divalenten Ionen beträgt die Leitfähigkeit 39 pS bzw 186 pS, je nach Leitfähigkeitszustand [Li et al. 2006].

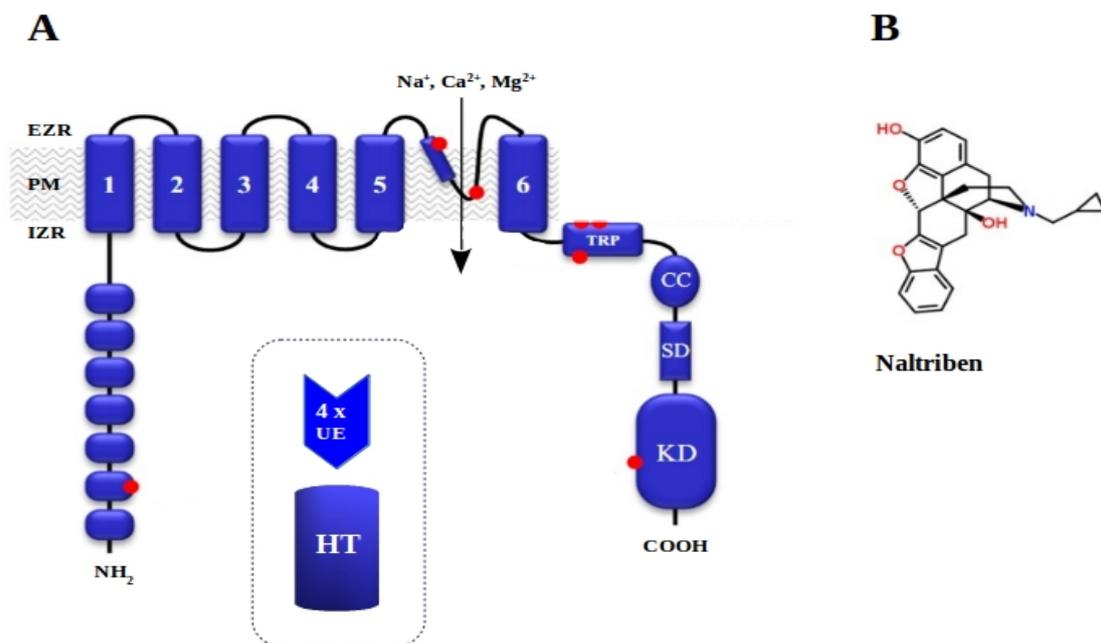


Abbildung 5: Struktur von TRPM7 und Naltriben

A) Eine Untereinheit des TRPM7-Kanals besteht aus sechs Transmembrandomänen, die für Kationen permeable Pore – physiologisch vorrangig für Natrium, Calcium, Magnesium – befindet sich zwischen Domäne fünf und sechs. TRPM-Kanäle besitzen typischerweise einen langen N-Terminus, dieser enthält vor allem Ankyrine. Vier Untereinheiten (UE) lagern sich zu einem Homotetramer (HT) zusammen und bilden den vollständigen Kanal. Extrazellulärraum (EZR), Intrazellulärraum (IZR), Plasmamembran (PM), Transmembranäre Helices (1-6), TRP-Box am C-Terminus (TRP), Coiled-Coil-Domäne (CC), Kinase-Substrat-Domäne (SD), Kinase-Domäne (KD). Modifiziert nach Chubanov et al. 2014. **B)** Chemische Struktur des TRPM7-Aktivators Naltriben, diese basiert auf der für Opiode typischen Grundstruktur (Wikimedia 2021 – public domain)

Als wichtigster Inhibitor gilt Magnesium, das beide Zustände mit einer intrazellulären EC_{50} von 25 μM bzw. 91 μM reversibel blockiert [Chokshi et al. 2012]. Es wird von zwei Magnesium-Bindungsstellen ausgegangen, wahrscheinlich ist bei erhöhter Magnesiumkonzentration nicht die Einzelkanalleitfähigkeit reduziert, sondern die Anzahl der aktiven Kanäle. Auch an Trinucleotide gebundenes Magnesium reduziert die Kanalaktivität [Demeuse et al. 2006]. Zusätzlich scheint die Aktivität des Kanals von PIP_2 abhängig zu sein, da die gesteigerte Aktivität der Phosphoinositid-Phospholipase C eine Inhibierung des Stroms zur Folge hat [Runnels et al. 2002]. Weitere physiologische Einflussfaktoren auf die Kanalaktivität sind mechanisch oder osmotisch veränderte Zellvolumina [Bessac et al. 2007] sowie der extrazelluläre pH-Wert [Monteilh-Zoller et al. 2003]. Ebenso wurde experimentell die Translokation von TRPM7-Kanälen in die Zellmembran beobachtet [Oancea et al. 2006].

In Bezug auf die pharmakologische Modifikation der TRPM7-Aktivität wurden bislang zahlreiche Stoffe erprobt. Auf der Seite der Inhibitoren existieren einige Pharmaka, die bereits bei niedriger Konzentration TRPM7-Ströme blockieren, allerdings begrenzt spezifisch sind (Tabelle 2).

Bezeichnung	IC_{50} (μM)	Art der Blockierung	Literaturnachweis
Sphingosin	0,6	Reversibel	Qin et al. 2013
NS8593	1,6	Reversibel, von intrazellulärer Magnesiumkonzentration abhängig	Chubanov et al. 2012
Spermin	2,3	Reversibel, spannungsabhängig	Kozak et al. 2002
Waixennicin A	7,0	Irreversibel, von intrazellulärer Magnesiumkonzentration abhängig, kein Effekt auf TRPM6	Zierler et al. 2011
2-APB	174	Reversibel	Prakryia et al. 2002

Tabelle 2: Wichtige Inhibitoren des TRPM7-Kanals

Ebenso wurde bei der Applikation von verschiedenen Pharmaka eine Steigerung der Kanalaktivität beobachtet. Besonders umfangreich untersucht ist der δ -opiod-Rezeptorantagonist Naltriben, der eine sehr ähnliche Struktur zu Naltrindol aufweist (Abbildung 5). Für die Spezifität spricht, dass ein Effekt auf viele andere TRP- und TRPM-Kanäle ausgeschlossen wurde. Der EC_{50} -Wert beträgt 20,7 μM , die an der TRP-Domäne vermutete Bindung ist reversibel und von der intrazellulären Magnesiumkonzentration unabhängig [Hofmann et al. 2014].

Bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Magnesiumkonzentration ist der TRPM7-Kanal einer der physiologischen Hauptakteure [Schmitz et al. 2013], aber auch eine Beteiligung bei der systemischen Magnesiumhomöostase wird angenommen [Ryazanova et al. 2010]. Zusammen mit der Calcium-Leitfähigkeit ist die Durchlässigkeit des Kanals für Magnesium als der Hauptgrund für dessen Einflussnahme auf wichtige Zellprozesse wie die Zellproliferation [Zierler et al. 2011] oder -migration [Su et al. 2011] anzusehen. Der nach wenigen Tagen letal verlaufende TRPM7-Knockout bei Mäusen ist ein Hinweis auf die essentielle Bedeutung des Kanals bei der Embryonalentwicklung.

Die Rolle des Kanals bei unterschiedlichen pathologischen Geschehen wird intensiv diskutiert. Dies sind zum einen neurologische Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Alzheimer-Demenz und cerebrale Ischämie. Dabei könnte die Leitfähigkeit für Zink ausschlaggebend sein [Inoue et al. 2010; Tseveleki et al. 2010]. Zum anderen ist die pathogenetische Beteiligung beim arteriellen Hypertonus Gegenstand von mehreren Untersuchungen [Louvet et al. 2013; Sontia et al. 2008]. Neuere Erkenntnisse lassen eine Beteiligung von TRPM7 auch bei onkologischen Erkrankungen vermuten [Dhennin-Duthille et al. 2014]. Bei Patienten mit Vorhofflimmern wurde eine Hochregulation des Kanals beobachtet, die mit einem gesteigerten Calcium-Einstrom und vermehrter Fibrose einherging [Du et al. 2010]. Weitere Hinweise auf von TRPM7 abhängige Mechanismen bei fibrotischen Erkrankungen liefern Untersuchungen in Leber [Fang et al. 2014], Herz [Guo et al. 2014] und Lunge [Yu et al. 2013]. Zukünftig könnte der Kanal ein therapeutisches Ziel bei fibrotischen Erkrankungen darstellen [Xu et al. 2015].

1.4.2.2 TRPC6

Die TRPC-Unterfamilie wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung des speicherabhängigen Calciumeinstroms (*SOCE*) erstmals beschrieben und besteht beim Menschen aus sechs verschiedenen funktionalen Kanälen [Wes et al. 1995; Parekh et al. 2005] (Abbildung 4). Ein wesentliches Merkmal von TRPC-Kanälen ist, dass sie untereinander eine bemerkenswerte Vielfalt von Heteromultimeren bilden.

Der humane TRPC6-Kanal besteht aus 13 Exonen, deren genetische Information auf dem Chromosom 11q21-q22 lokalisiert ist und für eine Proteinelänge von insgesamt 931 Aminosäuren kodieren. Der grundsätzliche Aufbau des Proteins ist mit sechs

Transmembrandomänen äquivalent zu allen anderen TRP-Kanälen, zusätzlich sind zwei Glykosylierungs-Stellen an der ersten und zweiten extrazellulären Schleife bekannt [Dietrich et al. 2003] (Abbildung 6B). Der N-Terminus enthält vier Ankyrin-Domänen, Richtung C-Terminus befindet sich eine für TRPC-Kanäle typische EWKFAR-TRP-Box und Bindungstellen für IP₃, Calmodulin sowie Phosphoinositid (Abbildung 6A). Neben der gewöhnlichen homotetrameren Zusammenlagerung ist die Bildung von Heterotetrameren mit nahezu allen anderen humanen TRPC-Domänen beobachtet worden [Gudermann et al. 2004; Strübing et al. 2003]. Für den Kanal wird auch eine Einbettung in supramolekulare Signalkomplexe (*signalplexes*) angenommen [Kim et al. 2005] und eine Zusammenlagerung mit ORAI-Kanälen sowie STIM-Proteinen diskutiert [Jardin et al. 2009].

Der TRPC6-Kanal verhält sich doppelt-rektifizierend, ist dabei für Kationen unselektiv durchgängig und besitzt eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 28-37 pS. Die Permeabilität für Calcium ist im Vergleich zu Natrium etwa 6-fach höher, jedoch trägt Calcium bei physiologischen Elektrolytkonzentrationen vermutlich nur zu einem sehr geringen Teil zum Stromfluss in der *whole-cell-Konfiguration* bei [Estacion et al. 2006]. Der initiale Natriumeinstrom könnte hierbei eine Rolle bei der Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen spielen [Soboloff et al. 2005]. Zusätzlich existieren Hinweise auf eine möglicherweise bedeutende Permeabilität für Zink [Gibon et al. 2011]. Die Aktivität des Kanals ist unter Ruhebedingungen gering und wird unter dem Einfluss von sekundären Botenstoffen und weiteren Mediatoren gesteigert.

Bezüglich der Regulation von TRPC6 gilt eine Zugehörigkeit zu den rezeptorabhängigen Kanälen (*ROC*) als sicher, die Einordnung bei den speicherabhängigen Kanälen (*SOC*) ist umstritten. Der *second messenger* DAG aktiviert den TRPC6-Kanal unabhängig von der Proteinkinase C, die Bindungsstelle bzw. der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht identifiziert worden [Hofmann et al. 1999]. Auf diesem Prinzip der direkten DAG-Aktivierung beruht beispielsweise die, über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelte, Aktivierung durch Angiotensin II. Gleichmaßen ist die rezeptorvermittelte Beeinflussung der Kanalaktivität durch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) anzunehmen [Kwon et al. 2007].

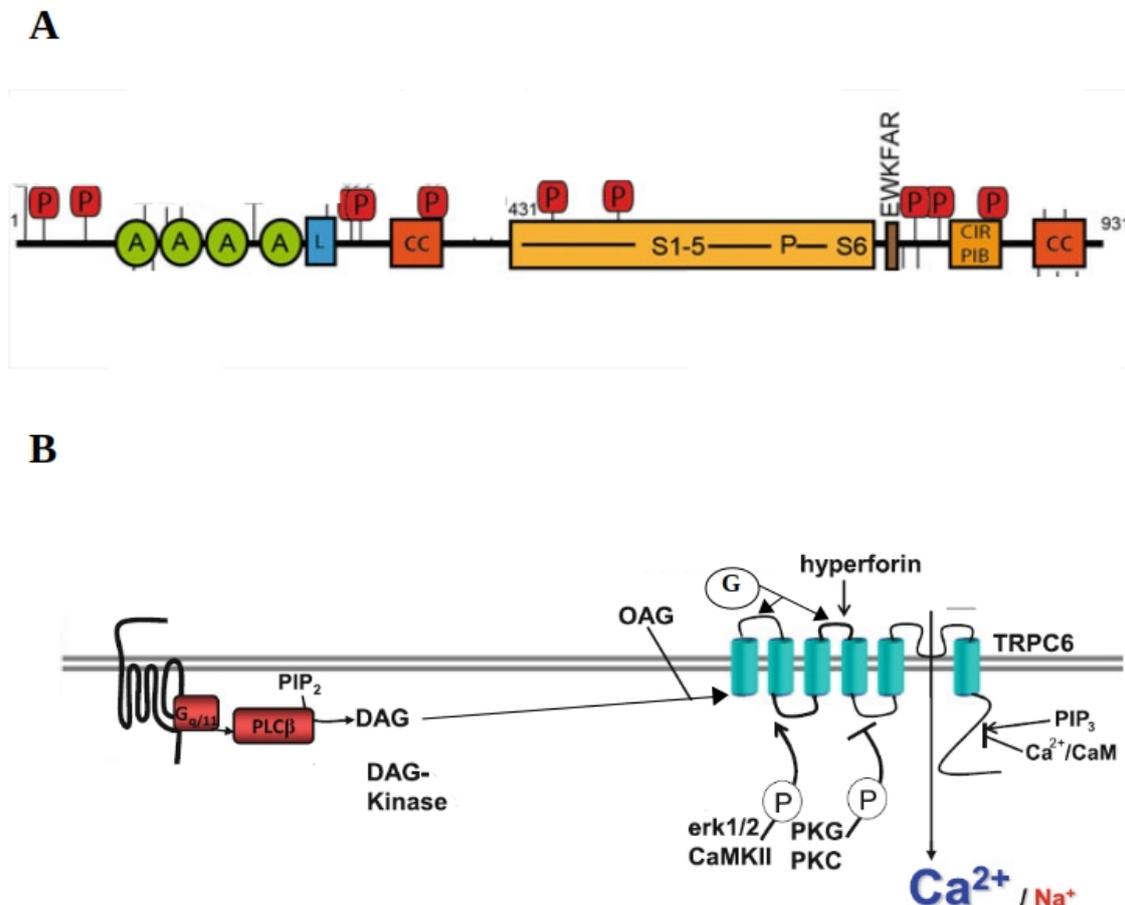


Abbildung 6: Aufbau und Regulation des TRPC6-Kanals

A) Schematische Darstellung einer Untereinheit des TRPC6-Kanals. Phosphorylierungs-Domäne (P), Ankyrin (A), Lipid-Domäne (L), coiled-coil Domäne (CC), Transmembransegment (S1-S6), Bindungstellen für IP3/Calmodulin/Phosphoinositidol (CIR/PIB). **B)** Überblick über wichtige Regulationsmechanismen. Glykosylierungs-Domäne (G), Proteinkinase C/G (PKC/PKG). Modifiziert nach Dietrich et al. 2014 .

Die calcium-vermittelte Regulation präsentiert sich komplex: Sowohl die extra- als auch intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen die Kanalaktivität. In hoher extrazellulärer Konzentration hemmt Calcium den Kanal, bei sehr niedriger Konzentration findet ebenso eine Aktivitätsminderung statt. Auch intrazelluläre Calciumionen beeinflussen Calmodulin-vermittelt die Kanalaktivität [Jung et al. 2002; Shi et al. 2013]. Mindestens ebenso vielfältig sind die von Enzymkinasen gesteuerten Mechanismen, einen Überblick über potentielle Phosphorylierungsstellen bietet Abbildung 6A. Die wichtigsten involvierten Enzyme sind Proteinkinase C, Proteinkinase G, ERK1/2 und CaMKII. Unter bestimmten Bedingungen wurde beobachtet, dass eine Steigerung des zellulären elektrischen Stromflusses auf der

Integration von TRPC6-Kanalproteinen über vesikulären Transport erfolgt [Cayouette et al. 2004].

Die Pharmakologie des TRPC6-Kanals ist auf Grund der ausgeprägten Homologie zu anderen TRPC-Kanälen noch unspezifisch. Ein häufig genutzter, jedoch auch auf TRPC3 und TRPC7 wirkender Aktivator ist das membrangängige DAG-Analogen OAG, welches ab einer Konzentration von etwa 100 μM seine maximale Wirkung entfaltet [Fuchs et al. 2011]. Bereits bei einer Konzentration von 10 μM wirkt das aus Johanneskraut gewonnene Hyperforin aktivierend auf den TRPC6-Kanal, wobei ein Einfluss auf TRPC3 ausgeschlossen wurde [Leuner et al. 2007]. Eine Auswahl der bis dato in Studien getesteter Inhibitoren fasst Tabelle 3 zusammen.

Bezeichnung	IC₅₀ (μM)	Spezifität	Literaturnachweis
Larixylacetat	0,1-0,6	Für TRPC3 bzw. TRPC7-Blockierung etwa 12 bzw. 5-fache Konzentration nötig.	Urban et al. 2016
SKF-96365	2	Blockiert u.a. auch TRPM2/3 und TRPV4, jedoch bei höherer Konzentration.	Harteneck et al. 2001
Norgestimat	3,0-5,2	Für andere TRPC-Kanäle >10 μM notwendig.	Miehe et al. 2012
8009-5364	3,2	Für TRPC3-Blockierung etwa 2,5-fache Konzentration nötig.	Urban et al. 2012
Clotrimazol		Blockiert auch TRPM2/3 und TRPV4. Aktiviert TRPV1 und TRPA1.	Harteneck et al. 2001

Tabelle 3: Wichtige Inhibitoren des TRPC6-Kanals

Über die physiologische Funktion des TRPC6-Kanals in verschiedenen Geweben sind zahlreiche Erkenntnisse gewonnen worden, wobei der rezeptorabhängige Calciumeinstroms (*ROCE*) in den meisten Fällen involviert zu sein scheint.

Der TRPC6-Kanal ist an einer Reihe von Pathologien beteiligt. Mehrere Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen dem TRPC6-Kanal und einer Dysfunktionen des kardiovaskulären und pulmonalen Kreislaufs. Etwa zeigt ein Knock-down des Kanals einen protektiven Einfluss auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie und reduziert die Ausprägung einer Ödembildung nach experimenteller Induktion einer pulmonalen Ischämie [Dietrich et al. 2001]. In glatten Muskelzellen wird TRPC6 durch α 1- und ADH-Rezeptoren aktiviert und übt somit Einfluss auf den

Gefäßtonus aus. Eine Beteiligung des Kanals bei der arteriellen Hypertonie ist dementsprechend anzunehmen und Gegenstand weiterer Untersuchungen [Jung et al. 2002; Monet et al. 2012]. Die Expression des TRPC6-Kanals wurde in Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten detektiert und könnte die Entstehung von Allergien oder chronischen Entzündungsprozessen begünstigen [Carrillo et al. 2012; Finney-Hayward et al. 2010]. Auch beim physiologischen Abbau von Erythrozyten, der durch einen intrazellulären Calciumeinstrom getriggert ist, könnte der Kanal beteiligt sein [Foller et al. 2008].

Die grundlegende Erkenntnis, dass TRPC6 ein wichtiger funktioneller Baustein des durch VEGF und PTEN induzierten Angiogeneseprozess ist, führte zu der Untersuchung einer möglichen Beteiligung im Rahmen onkologischen Erkrankungen [Kini et al. 2010; Ge et al. 2009]. Bei der Entstehung von Mamma- [Guilbert et al. 2008] und Prostakarzinom [Wang et al. 2010], gastro- und ösophagealer Tumoren [Zhang et al. 2013] sowie des Glioblastoms [Chigurupati et al. 2010] sind TRPC6-abhängige pathomechanistische Vorgänge anzunehmen. Obwohl das Vorhandensein von TRPC6 in Zellen des Nervensystems demonstriert werden konnte, ist die genaue Funktion noch unklar. Eine deutlich erhöhte Expression wurde dabei im Gyrus dentatus beobachtet [Bonaventure et al. 2002]. Zusätzlich könnte die Ausbildung exzitatorischer Synapsen nach TRPC6-Überexpression ein Hinweis auf die Beteiligung bei der neuronalen Plastizität sein [Zhou et al. 2008].

In letzter Zeit wurden zunehmend Hinweise auf die Beeinflussung fibrotischer renaler Prozesse veröffentlicht. In Nierengewebe wurde der TRPC6-Kanal, zum Teil im Komplex mit TRPC3, in Glomerulus und Sammelrohr nachgewiesen [Hsu et al. 2007]. Mehrere Hinweise legen nahe, dass die Mutation bzw. Überaktivität von TRPC6 in Podozyten zur Ausbildung einer fokal segmentalen Glomerulosklerose und Proteinurie beiträgt [Mottl et al. 2013; Chiluiza et al. 2013; Eckel et al. 2011]. Ein möglicher Mechanismus könnte dabei die Interaktion des Kanals mit den für die Podozytenfunktion essentiellen Proteinen Nephrin und Podocin sein [Huber et al. 2007]. Dem in vielen Punkten mit TRPC6 verwandten TRPC3-Kanal ist eine Bedeutung bei der Entstehung von renaler Fibrose zugeschrieben worden [Saliba et al. 2015]. Ähnliche Hinweise existieren auch für die Rolle von TRPC6 bei der Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten [Davis et al. 2012] und bei einer Form der intestinalen Fibrose [Kurahara et al. 2015]. Die Expression des TRPC6-Kanals in NRK-Zellen wurde

bereits beobachtet [Dernison et al. 2010], hier könnte der Ionenkanal an der Entstehung des Calcium-Signals in diesem Zelltyp beteiligt sein [Almirza et al. 2012].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Bisherige Forschungsergebnisse legen nahe, dass Ionenkanäle einen wesentlichen Einfluss auf fibrotische Prozesse in verschiedenen Organsystemen haben. Es ist davon auszugehen, dass vor allem die intrazelluläre Calciumkonzentration ein wichtiger Regulator von transkriptionellen sowie funktionellen Veränderungen in Kollagenbildenden Zellen ist. Speziell für die Niere sind diese Prozesse unzureichend erforscht, jedoch für das Verständnis pathomechanistisch bedeutsamer Prozesse und nachfolgend für die Entwicklung von Therapieansätzen zur Beeinflussung fibrotischer Umbauprozesse der Niere unabdingbar. In diesem Zusammenhang ist auch von besonderem therapeutischen Interesse, ob die zu Grunde liegenden Mechanismen der Fibroseentstehung im Nierengewebe vergleichbar zu anderen Organsystemen oder grundlegend verschieden sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Kationenkanälen im Differenzierungsprozess renaler Fibroblasten. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung von Calcium-leitenden sowie -aktivierten Ionenkanälen in einem geeignetem Zellmodell gelegt.

Folgende Einzelpunkte wurden einer experimentellen Überprüfung unterzogen:

1. Werden in TGF β -stimulierten NRK-Zellen K_{Ca}3.1-Kanäle hochreguliert? Sind diese elektrophysiologisch detektierbar und ist deren Aktivierung mit einem Calcium-Einstrom assoziiert?
2. Ist in NRK-Zellen der calcium-leitende TRPM7-Kanal funktionell exprimiert und vermittelt dieser einen Calcium-Einstrom? Erfährt der Ionenkanal im Rahmen des Transdifferenzierungsprozesses eine Expressionsregulation oder eine Variation der Stromdichte?
3. Wird der calcium-leitende TRPC6-Kanal in NRK-Zellen funktionell exprimiert? Ist in TGF β -stimulierten NRK-Zellen der Calcium-Einstrom verändert? Gibt es Hinweise für eine verminderte Fibrosierung im TRPC6-Knockout-Modell?

2 Material

2.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Axio Observer Z.1 Mikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Brutschrank und CO ₂ -Inkubator BB 6060	Heraeus, Hanau, Deutschland
Computer-Software: Pulse/Pulsefit	Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
Computergesteuerter EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker	HEKA Elektronik; Lambrecht, Deutschland
Elektrophoresebad Agagel Mini Biometra	Blomed-Analytik; Deutschland
FUSION-FX7 Advance-Superbright (4.2/10 Mio Pixel CCD-camera)	PeqLab; Erlangen, Deutschland
INFINITY 3026 Gel Image and Analytics System	Viber; Eberhardzell, Deutschland
Laborwaage BP310P	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Main Pipettenziehgerät DMZ-Universal-Puller	Zeitz; Augsburg, Deutschland
Meß- und Referenzelektrode: Chlorierte Silberdrähte	Silber-/Silberchlorid-Elektrode
Messkammer für Patch-Clamp-Stand	Eigenbau Werkstatt im Biochemisch Pharmakologischen Centrum; Marburg, Deutschland
Mikrofuge (Heraeus Pico 17 Centrifuge)	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss; Jena, Deutschland
MILLIPORE®-Wasserreinigungsanlage	MILLIPORE GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nanodrop 2000c	PeqLab; Erlangen, Deutschland
OPTIPURE Analytical	MembraPure GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
Patch-Clamp Mikromanipulator	Luigs und Neumann GmbH, Raitingen, Deutschland
Perfusion für Patch-Clamp-Stand	Eigenbau aus Plastikspritzen und -schläuchen

Rührmagnet: Typ MR 2002	Heidolph, Deutschland
Schwingungsisolierter Tisch	Physik Instrumente Waldborn; Deutschland
Spannungsgeber für die Gelelektrophorese: Powerpack P24	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sterile Werkbank: Sterilbank Gemini	Karow, Berlin, Deutschland
Thermocycler Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Gerät	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Geräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflaschen 75/25 ml	Greiner bio-one
6/12/24/96-Wells	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 1000/200/100/50/10/5/1 µl	Sarstedt
Messpipetten 20/10/5 ml	Sarstedt
Borosilikatkapillaren, Länge: 7,5 cm, Innendurchmesser: 0,9 mm, Wandstärke: 0,3 mm	Clark Electromedical Instruments; Pangbourne, Großbritannien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

2.3 Chemikalien

Name	Hersteller
1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol	Enzo Life Sciences, Inc.; Farmingdale, USA
10 x PCR buffer Y	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Fermentas St. Leon- Rot, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM (High Glucose)	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
DNA Ladder 50bp	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
DNA-LoadingDye 6x	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland
dNTP-Mix	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
Fura2/AM	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium Inc; Hayward, USA
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Nitrocellulose Mambran	Bio-Rad ; München, Deutschland
Nuclease- Free Water	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific; Waltham, MA USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
PBS mit/ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe,

	Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
PeqGOLD 50bp DNA-Ladder	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
peqGOLD TriFast	VWR International GmbH; Erlangen, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Primer rattus norvegicus, mus musculus	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Complete	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Quick Start Bradford Protein Assay	Bio-Rad ; München, Deutschland
Roti-Load 1	Roth; Karlsruhe, Deutschland
SKA-31	Aus Beständen der AG Hoyer
Skin Milk Powder	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sodium-Orthovandate	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
TEMED	Roth; Karlsruhe, Deutschland
TGFβ	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tris/HCL	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Triton-X	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

2.4 Primer

Name	Nr.	sense-Sequenz	antisense-Sequenz	Produktlänge
18S	#0	GATCCATTGGAGGGCAAGTC T	CCAAGATCCAACACTACGA GCTTTT	172 bp
GAPDH	#1	AGGTCGGTGTGAACGGATTT G	TGTAGACCATGTAGTTG AGGTCA	123 bp
α SMA	#2	GTCCCAGACATCAGGGAGTA A	TCGGATACTTCAGGCGT CAGGA	102 bp
TRPC6	#3	TGCAGCAAGATGGGGAAGA T	GGGGCCTTGAGTCCAGA TTT	275 bp
TRPM7	#5	AGGATGTCAGATTTGTCAGC AAC	CCTGGTTAAAGTGTTCA CCCAA	128bp
KCa3.1	#6	CATCACGTTCTGACCATTG	GTGTTCTCCGCCTTGTTG A	156 bp
KCNMB1	#7	AAGAGCTGGAGGGCAGGAA	TGCCACAGCTGATACA TTGA	66 bp

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle Primer sind für Zelllinien und Gewebe des Organismus *Rattus norvegicus* nutzbar, Primer #1, #2 und #5 zusätzlich auch für *Mus musculus*.

Die Primer wurden mit dem *Primer-BLAST tool* von NCBI erstellt und auf ihre Spezifität getestet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) oder deren Sequenz aus Publikationen entnommen.

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer	Spezies
Anti-GAPDH	BETHYL	A300-640A	Kaninchen
Anti-TRPC6	Alomone	ACC-017	Kaninchen
Anti- α SMA	abcam	ab5694	Kaninchen

Tabelle 8: Verwendete Primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Spezies	Konjugat	Verdünnung
Anti- Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechn.	Ziege	HRP- konjugiert	1:10 000

Tabelle 9: Verwendete Sekundäre Antikörper

2.6 Standardisierte Systeme

Bezeichnung	Hersteller
iScript cDNA-Synthese-Kit	Bio-Rad ; München, Deutschland
BCA-Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Scientific (#23252)
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad ; München, Deutschland
FuGene HD Transfektions-Kit	Promega; Fitchburg, USA
Taq-Polymerase	PeqLab; Erlangen, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Kit-Systeme

2.7 Allgemeine Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockpuffer	5 % Milchpulver (fettfrei) in 1x TBS/T
1 x Blotpuffer	19,2 mM Glycin 2,5 mM Tris Base 20 % Methanol
1 x Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA 5 mM EGTA 1 % IGEPAL 1 mM Natrium-Orthovanadate 10 µl/ml Protease-Inhibitor
1 x TAE-Puffer	40,8 mM Tris 0,02 mM 0,5 M EDTA, pH 8,0 20,4 mM Eisessig
1 x TBS	2 mM Tris-HCL 13,7 mM Natriumchlorid pH 7,6 eingestellt mit HCl
Waschpuffer	100 mM Tris 1,5 M NaCl 1 % Tween pH 8,0
Transferpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycine 0,2 % SDS 20% Methanol

Tabelle 11: Verwendete Puffer

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie NRK-49F

Kultivierte Fibroblasten aus der Rattenniere (*normal rat kidney fibroblasts*) wurden von Larco et al. 1978 etabliert.

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie NRK-49F wurde bei dem Unternehmen ATCC bestellt und trägt die Produktnummer CRL-1570.

3.1.2 Zelllinie HEK-293

„Human Embryonic Kidney“-Zellen wurden freundlicherweise vom Forschungslabor der Radiologie, AG Heverhagen, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Zelllinie A7r5

A7r5-Zellen sind glatte Muskelzellen und zeichnen sich durch eine hohe endogene Expression des TRPC6 aus [Jung et al. 2002]. Sie entstammen der Aorta des Organismus *rattus norvegicus*. Für die vorliegende Arbeit wurden diese aus dem Bestand der AG Hoyer aufgetaut und neu kultiviert.

3.1.4 Primäre renale Maus-Fibroblasten

Aus der Niere des TRPC6-Knockout-Tieres mit der Nummer #815 wurden am 17.12.2014 Fibroblasten isoliert und eingefroren. Ebenfalls am selben Tag wurden auch Fibroblasten des Wildtyp-Tieres #828 isoliert. Die Mauslinien tragen die Bezeichnungen Col1 α 1-eGFP-L10a-TRPC6-KO bzw. Col1 α 1-eGFP-L10a-TRPC6-WT. Die Isolationen wurden von Dr. Andreas Hofmeister durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 10% DMSO, 40% Medium, 50% FBS in einem mit Isopropanol befülltem Gefäß allmählich auf -80°C herunter gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.5 Nährmedien

Für die Kultivierung der NRK-49F und TFB wurde Dubelccos Modified Eagles Medium:F12 (1:1) verwendet. Dem Grundmedium wurden 100 Units/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 10 % FBS zugesetzt. Für die „starvation“ der NRK-Zellen wurde lediglich das Grundmedium benutzt.

Für die Kultivierung der HEK-, A7r5-Zellen und primären Fibroblasten wurde Dubelccos Modified Eagles Medium verwendet. Dem Grundmedium wurden 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FBS zugesetzt.

3.1.6 Kultivierung der verschiedenen Zelllinien

Die Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen in den Kulturflaschen nach gründlichem Spülen mit Ca²⁺ /Mg²⁺-freiem PBS-Puffer unter mikroskopischer Kontrolle mit 0,05% Trypsin inkubiert. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in frischem Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zu gleichen Volumenanteilen auf frische Kulturflaschen (75 cm² oder 25 cm²) zur Weiterführung bzw. Petrischalen oder Wells zur Vorbereitung für nachfolgende Experimente verteilt.

3.1.7 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer: Ein Aliquot der Zellsuspension wurde resuspendiert und anschließend 10µl von dieser in eine Neubauer Zählkammer transferiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und das je nach Zellzahl berechnete Volumen der Suspension in sterile Kultivierungsgefäße überführt.

3.1.8 Starvation und TGFβ-Behandlung der NRK-49F-Zellen

Um die NRK-Zellen vor einer TGFβ-Behandlung in die G₀-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren und dadurch einen Wachstumsstopp zu induzieren, wurden die Zellen mit Serum-freiem Medium gewaschen und anschließend mit diesem mindestens über Nacht inkubiert.

TGFβ wurde mit 0,1% BSA in PBS auf 5ng/µl verdünnt und anschließend bei -20°C eingefroren. Das Serum-freie Medium wurde mit der TGFβ-Lösung versetzt, um die Zellen der gewünschten Endkonzentration auszusetzen – sofern nicht anders angegeben betrug diese 2 ng/ml.

3.1.9 TGF β -Behandlung der primären Maus-Fibroblasten

Um die primären Fibroblasten zu einer Transdifferenzierung zu Myofibroblasten anzuregen, wurden dieser einer Endkonzentration von 5 ng/ml TGF- β in Serum-freien Medium ausgesetzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast pro 10 cm² Wachstumsfläche und mehrmaligem Resuspendieren im Kulturgefäß lysiert. Nach Überführung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro Mililiter TriFast wurden die Proben bei Raumtemperatur bei 12 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt und nach Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol pro Mililiter TriFast auf Eis inkubiert, sowie ein weiteres Mal bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das sich abzentrifugierte Pellet mit 75% Ethanol zweimal gewaschen und anschließend in Ribonuklease-freiem Wasser gelöst.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA-Proben wurde mit einem NanoDrop 2000c Spektral-Photometer bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 290 nm gegen reines Wasser gemessen. Dabei geben die Quotienten aus 260 nm/230 nm und aus 260 nm / 280 nm die Reinheit der Proben an.

3.2.3 Reverse Transkription für cDNA-Synthese

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion erfolgte mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis-Kit von Bio-Rad. Die Reaktion zeichnet sich dadurch aus, dass bei Einsatz von jeweils gleicher Menge RNA die resultierenden Konzentrationen der cDNA annäherungsweise gleich sind und damit das Expressionsniveau eines bestimmten Genes abgebildet wird.

Das Kit besteht unter anderem aus einer modifizierte MMLV-Reverse Transkriptase und einer Mischung aus oligo (dt)- und randomhexamer-Primern für die reverse Transkription. In einem Zwei-Schritte Protokoll wird aus der isolierten Gesamt-RNA die für die PCR benötigte cDNA synthetisiert. Entsprechend dem beigelegten Protokoll

wurde 1 μg RNA zu dem in folgender Tabelle beschriebenen Reaktionsansatz hinzugegeben. Dabei berechnete sich das zu pipettierende Volumen der RNA-Proben aus der im vorhergehenden Schritt gemessenen Konzentration, das Volumen des Nuclease-freien Wassers wurde dementsprechend angepasst.

Komponente	Volumen pro Reaktion
5x iScript Reaktions-Mix	4 μl
iScript Reverse Transkriptase	1 μl
Nuclease-freies Wasser	X μl
RNA Template (1 μg)	X μl
Gesamtvolumen 20 μl	

Tabelle 12: iScript-Reaktionsansatz

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler nach dem Thermoprofil von folgender Tabelle inkubiert und direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

PCR-Programmschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
Anlagerung	25	5
Synthese	42	30
Denaturierung	85	5
Lagerung	4	∞

Tabelle 13: iScript Thermoprofil

3.2.4 RT-PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Das zu Grunde liegende Prinzip ist die Verwendung von zwei spezifischen *Primern* (= Oligonukleotide), mit deren Hilfe sich während mehrerer Zyklen der Bereich eines DNA-Moleküls, der zwischen den Primern liegt, mit einer hitzestabilen Polymerase amplifizieren lässt. Einer der sequenzspezifischen *Primer* lagert sich als *sense Primer* auf dem Plus-Strang der DNA an, der andere als *antisense Primer* auf dem Minus-Strang. Die Synthese wurde in dieser Arbeit von der *Taq*-Polymerase katalysiert. Die *Taq*-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum bei $72-74^{\circ}\text{C}$ und ist bei Temperaturen um die 94°C noch stabil. Aufgrund der Hitzestabilität ist es ausreichend, das Enzym nur einmalig zuzusetzen, da die Polymerase während aller weiteren PCR-Schritte aktiv bleibt.

Sofern nicht anders angegeben wurde 1 µl der jeweiligen cDNA mit H₂O, 10x Taq-Puffer, dNTP-Mix, Taq-Polymerase und entsprechendem *sense- und antisense-Primer* versetzt. Die jeweils verwendeten Konzentrationen sind in folgender Tabelle zu finden. Das Gesamtvolumen einer PCR variierte zwischen 15 µl und 25 µl, der jeweilige Mastermix wurde in DNase-freiem Wasser angesetzt.

Zum Ausschluss einer cDNA- oder DNA-Kontamination wurde pro Primer-Ansatz jeweils eine Negativkontrolle angesetzt, bei der anstelle von cDNA lediglich Wasser hinzugegeben wurde.

Mastermix-Komponente	Konzentration
10x Reaktionspuffer	1x
dNTP-Mix	800 µM
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,04 u/µl
sense-Primer	0,16 µM
antisense-Primer	0,16 µM

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Da es sich sowohl bei der Denaturierungs- (95°C) als auch der Elongationstemperatur (68°C) um konstante Temperaturen handelt, wurde nur – sofern nötig - die Annealingtemperatur (Standard 60°C) den verwendeten Primerpaaren angepasst und folgendes Protokoll für den Thermocycler verwendet:

Programmschritt	Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeitdauer
#1 Initiale Denaturierung	1x	95	5 min
#2 Denaturierung	35-40x	95	15 s
#3 Annealing		60	15 s
#4 Elongation		68	45 s
#5 Terminale Elongation	1x	68	5 min
#6 Abkühlung		4	Bis Auftragung

Tabelle 15: Cyclerprogramm für RT-PCR

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente zwischen 300 bp bis 20 kb nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch ein konstant angelegtes elektrisches Feld wandert die negativ geladene DNA in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist hierbei direkt proportional zu der Größe des DNA-Fragmentes.

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Gelen mit einer Agarosekonzentration von 1,5 - 2,0 %, diese enthielten GelRed 10 000x in einer Verdünnung von 1:50 000. Als Elektrophoresepuffer, wie auch zum Lösen der Agarose, diente 1x TAE-Puffer. Pro 5 μ l DNA-Probe wurde 1 μ l DNA-Ladepuffer hinzugegeben und ein Gesamtvolumen von 15 μ l in die Taschen der zuvor gegossenen Gele pipettiert.

Für die Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde ein 1 kb-DNA-Ladder mit einem Bandenabstand von 50bp grundsätzlich mitgeführt. Die Trennung erfolgte bei 120 V für etwa 1 h. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden im UV-Transilluminator *INFINITY 3026* von *Viber* durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 254$ nm) sichtbar gemacht.

3.2.6 Quantitative real-time RT-PCR

Die quantitative real-time RT-PCR (qPCR) mittels SYBR[®] Green ist eine Methode zur semiquantitativen Bestimmung der mRNA-Expression durch die entsprechende cDNA-Detektion. Die qPCR ist dadurch charakterisiert, dass die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht wird. SYBR Green bindet doppelsträngige DNA, daraufhin bildet sich ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex der blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 494$ nm absorbiert und grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 521$ nm emittiert. In dieser Arbeit wurde der *7500 Real Time PCR Systems Cyclor* verwendet.

Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz des Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus exponentiell an. Der Grad der Fluoreszenz wird mittels eines Detektionssystems im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus quantitativ erfasst. Die daran anschließende, vergleichende Ct-Methode ($\Delta\Delta$ Ct-Methode) ermöglichte eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse. Hierzu wurde zunächst unter Verwendung der *Cyclor*-Auswertungssoftware ein Schwellen-Ct-Wert (*cycle of threshold* = Schwellenzyklus) für jede Reaktion ermittelt. Der Schwellen-Ct-Wert stellt den Punkt dar, bei dem die sequenzspezifische PCR-Reaktion in die exponentielle Phase eintritt und sich von der Hintergrundfluoreszenz unterscheiden lässt. Bei jeder Probe wurde zudem die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) in Endothelzellen als sog. *housekeeping*-Gen bestimmt. Die GAPDH-Expression erwies sich als unabhängig von der Wirkung der eingesetzten Wachstumsfaktoren bzw.

Signaltransduktionsinhibitoren und eignete sich dadurch als interner Standard für die semiquantitative Erfassung der Expression des zu untersuchenden Gens.

Der Ansatz für eine Reaktion beinhaltete 1 µl des cDNA-Gemisches, jeweils 0,06 µl *forward-Primer* und *reverse-Primer*, 4,88 µl ddH₂O und 5 µl SYBR Green. Dabei betrug die Konzentration der Primer-Ansätze 20 µM. Das Cyclor-Programm wird in folgender Tabelle beschrieben.

Programmschritt	Zeitdauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 min	95°C
40 Zyklen	15 sec	95°C
Terminale Elongation	1 min	60°C
Abkühlung		4°C

Tabelle 16: qPCR Cyclor-Programm

Um die jeweilige vervielfältigte Sequenz zu verifizieren wurde im Anschluss an jedes vollständige Cyclor-Programm eine Schmelzkurve erstellt, welche mit folgendem Programm bestimmt wurde.

Programmschritt	Zeitdauer	Temperatur
Halten	15 sec	95°C
40 Zyklen	60	60°C
Abschließender Zyklus	15 sec	95°C
Abkühlung		4°C

Tabelle 17: Programm zur Schmelzkurvenanalyse

Die Auswertung der Ct-Werte erfolgte mit den hier angegebenen Berechnungsformeln:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GAPDH}} \quad (1)$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Stimulation}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}} \quad (2)$$

$$\text{x-facher Anstieg} = 2^{\Delta \Delta Ct} \quad (3)$$

Diese Kalkulation wurde mit einem in der Arbeitsgruppe etablierten Tabellendokument durchgeführt, die neben dem $\Delta \Delta Ct$ -Wert des Mittelwerts auch für jede einzelne Probe einen $\Delta \Delta Ct$ -Wert im Verhältnis zum Mittelwert berechnet.

3.3 Transfektionen

Die transienten Transfektionen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung des FuGENE® HD Transfection Reagent in HEK- und NRK-Zellen durchgeführt.

Am Vortag wurden dazu die Zellen so ausgesät, dass diese zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70-90% aufwiesen. Für die NRKs wurde die DNA in einer Konzentration von 0,02 µg / µl in serum-freien Medium angesetzt und anschließend pro Mikrogramm DNA 4 µl Transfektionsreagenz hinzugefügt, um ein Transfekt:DNA-Verhältnis von 4:1 zu erhalten. Für die HEKs wurde ein Verhältnis von 3:1 verwendet. Anschließend wurde der Ansatz gründlich vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde dieser in einem Mischungsverhältnis von 1:20 dem Wachstumsmedium hinzugegeben.

Je nach Verwendungszweck erfolgte die Experimentausführung bzw. Zellernte frühestens nach 24 h. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Konstrukt	Vektor	Referenz
TRPM7-eGFP	pIRES2	Paravicini et al. 2012
TRPC6-eCFP	pcDNA3	Hofmann et al. 2002
eGFP	pIRES2	Hofmann et al. 2002

Tabelle 18: Verwendete Plasmide

Das Proteinprodukt des TRPC6-Plasmids ist im Vergleich zum nativen Kanalprotein größer: Dies ist auf den CFP-Tag und einer Glykosilierung in HEK-Zellen zurückzuführen [Dietrich et al. 2003].

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zellernte und Proteingewinnung

Um einen Proteinabbau durch Proteasen zu verringern, wurden alle Arbeiten mit Proteinen bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden in Petrischalen ausgesät und nach Erreichen von Konfluenz dem Brutschrank entnommen sowie mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurde die Zellschicht mit 600 µl (Wachstumsfläche von 50 cm²) Lyse-Puffer versetzt, nach kurzer Inkubationszeit mit einem Gummischaber abgelöst und anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Lysat wurde für weitere 30 min inkubiert, bei 12 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß

überführt. Es erfolgte eine Lagerung bei -20°C oder die direkte Weiterverwendung der Proben. Für eine anschließende Gelelektrophorese wurden diese mit *4x Roti-Load* (Verhältnis 1:4) gemischt und für 10 min auf 95°C erhitzt.

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit lediglich eine qualitative Feststellung der Protein-Expression war, wurde auf eine Bestimmung der Proteinkonzentration verzichtet und nach erfolgtem Protein-Transfer eine Ponceau-Färbung angewendet, um das Vorhandensein von Proteinen zu kontrollieren.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht auf. Das im *4x Roti-Load* enthaltene β -Mercaptoethanol denaturiert die Proteine und inhibiert Quartärstrukturen. Dabei bindet das negativ geladene SDS an die Proteine, der SDS-Protein-Komplexe wandert im elektrischen Feld zur Anode und wird dabei durch den Siebeffekt der Polyacrylamid-Matrix ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele siehe nachfolgende Tabelle, für die Ansätze der Gele wurde gereinigtes Wasser verwendet.

Bestandteil	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	8 %	4,5 %
SDS	0,1 %	0,2 %
Tris	0,375 M, pH 8,8	0,250 M pH 6,8
APS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,05 %	0,06 %

Tabelle 19: Zusammensetzung der SDS-Gele

Die Taschen dieser Gele wurden mit einem Volumen von $50\ \mu\text{l}$ gefüllt und zusätzlich ein als Größenstandard dienender Prestained Protein Marker (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 kDa) aufgetragen. Das Sammelgel lief bei 15 mA pro Gel, das Trenngel bei 20 mA pro Gel (100-200 Volt). Die Elektrophorese erfolgte, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Für verwendete Puffer siehe Kapitel 2.7: Allgemeine Puffer.

3.4.3 Western Blot und Immunodetektion

Der Western Blot ist eine immunologische Methode, um spezifisch geringe Mengen eines denaturierten Proteins nachzuweisen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine, folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran via *Complet-wet* Transfer (*Blotting*). Hierbei wird das *Blotting-Sandwich* zwischen die zwei Elektroden der *Complet-wet* Blotting Apparatur gelegt und ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung des Gels angelegt. Dabei findet der Transfer der Proteine auf die Membran statt.

Zunächst wurden das Gel, die Membran und je 2 Filterpapiere zur Äquilibrierung 5 min in Blotpuffer gelegt. Geblottet wurde für 90 min bei 250 mA. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran mit 1x TBS/T abgespült und die unspezifischen Bindungsstellen mit 10 ml 5 %-igem Milchpulver in 1x TBS/T für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken blockiert. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C unter ständigem Schwenken in einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch für das Protein ist bzw. eine hohe Affinität zu einem bestimmten Antigen auf dem Protein besitzt.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3x mit 1x TBS/T für je 10 min gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken in dem Sekundärreagenz inkubiert, das den ersten Antikörper spezifisch erkennt. Die Membran wurde erneut 3x für je 10 min mit 1x TBS/T gewaschen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 und 9 aufgeführt.

Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch 1-minütige Inkubation der Membran mit der Substratlösung *Super Signal West Dura Extended* (1 ml pro Membran) aktiviert, woraufhin für 1-30 min die Belichtung im *FUSION-FX7 Advance-Superbright* (4.2/10 Mio Pixel CCD-Kamera) erfolgte. Sollte die Membran ein weiteres Mal gefärbt werden, wurde diese 3x 10 min mit TBS/T gewaschen und anschließend erneut blockiert, nacheinander mit Primärantikörper, mit Sekundärreagenz und Substratlösung inkubiert sowie belichtet.

3.5 Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der spezifischen Markierung von Proteinen, um deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu visualisieren. Dabei interagiert ein Antikörper spezifisch mit dem Epitop des zu lokalisierenden Proteins. Anschließend wird dieser Primärantikörper, sofern dieser nicht selbst fluoresziert, durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert und für die Mikroskopie sichtbar gemacht. Die an den entsprechenden Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden im Mikroskop durch entsprechende Exzitationswellenlängen angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Emissionswellenlänge.

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden sie erneut 3-fach mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 0,1 % Triton-X in PBS permeabilisiert und wiederum 3x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Blockung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei RT in 20 % Ziegen Serum in PBS. Nach dem Blocken wurden die Zellen erneut 3x mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei 4°C lichtdicht mit dem Erstantikörper in 4 % Ziegen Serum in PBS inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurden die Proben je nach Antikörper für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in 20 % Ziegen Serum in PBS behandelt. Nach einem erneuten PBS Waschschrift wurden die Proben mit *ProLongGold antifade Reagenz* (enthält DAPI zur Kernfärbung) eingedeckelt. Die Präparate wurden bis zur Untersuchung unter dem Mikroskop bei 4°C gelagert.

Für die Visualisierung der Färbung wurde das inverse Auflichtmikroskop Axiovert 100 verwendet. Um die Bilder später auswerten zu können, wurden sie mittels der Kamera AxioCam Color aufgenommen und in der zugehörigen Software Axio Vision 3.1 gespeichert.

3.6 Elektrophysiologie

Um den Einfluss der Expression von Ionenkanälen auf die funktionellen Ströme in renalen Fibroblasten zu untersuchen, wurde die Patch-Clamp Methodik angewandt, deren Grundlage im Folgenden kurz erläutert wird. Daran schließen sich eine Beschreibung der verwendeten Konfigurationen und der Messbedingungen an.

3.6.1 Grundprinzip der Patch-Clamp Technik

Die Patch-Clamp Technik ermöglicht die Messung von Ionenströmen durch Ionenkanäle in der Plasmamembran und ist ein unverzichtbarer Bestandteil der Elektrophysiologie. Sie wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt und 1976 zum ersten Mal beschrieben. Die wesentlichen Messkonfigurationen sind dabei die *Cell-Attached-*, *Whole-Cell-*, *Inside-Out-* und *Outside-Out-*Konfiguration. Dabei ist die Bildung des sogenannten *Giga-Seals* Ausgangspunkt für alle Variationen: Dieser lässt sich beschreiben als ein hoher Abdichtwiderstand von bis zu mehreren Gigaohm zwischen der Patchpipette und der Plasmamembran der Zelle. Dabei besitzt die aus Glas bestehende Pipette eine Öffnung von lediglich wenigen Mikrometern.

Der *Seal* wird durch nahes Heranführen der Patchpipette an die Zellmembran und eine darauf folgende Applikation von Unterdruck etabliert. Da sich hierbei die Membran leicht in die Pipette wölbt, entsteht ein dichter Verschluss zwischen Glas und Lipidschicht. Der so entstandene Zustand wird als *Cell-Attached-Konfiguration* bezeichnet und ermöglicht die Messung von Einzelkanälen im niedrigen pA-Bereich. Ausgehend von dieser gelangt man durch Anlegen eines weiteren Unterdruck-Impulses in den *Whole-Cell-Modus* (Abbildung 7).

In dieser Konfiguration wird folglich die Summe aller aktiven Ionenkanäle in der Zelle gemessen, die Ströme können dementsprechend bis zu mehreren nA erreichen. Zusätzlich findet ein Austausch des Zytoplasmas der Zelle und der Pipettenlösung innerhalb von einer bis mehreren Minuten statt und ermöglicht eine genaue Festlegung der Ionenkonzentrationen im Inneren der Zelle.

Unter Verwendung eines elektronischen Verstärkers wird nun das Membranpotential auf eine definierte Spannung geklemmt und der hierbei fließende Strom registriert. Das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen in der gesamten Zellmembran führt zu einer Änderung des Membranwiderstandes und, damit dem Ohmschen Gesetz entsprechend, zu einer Änderung des gemessenen Stroms. Der fließende Strom wird über zwei Elektroden (eine in der Messkammer, die andere in der Patchpipette) registriert und mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Bad-/Extrazellulärlösung während einer Messung durch ein installiertes Perfusionssystem zu modifizieren oder pharmakologische Wirkstoffe zu applizieren (Abbildung 8).

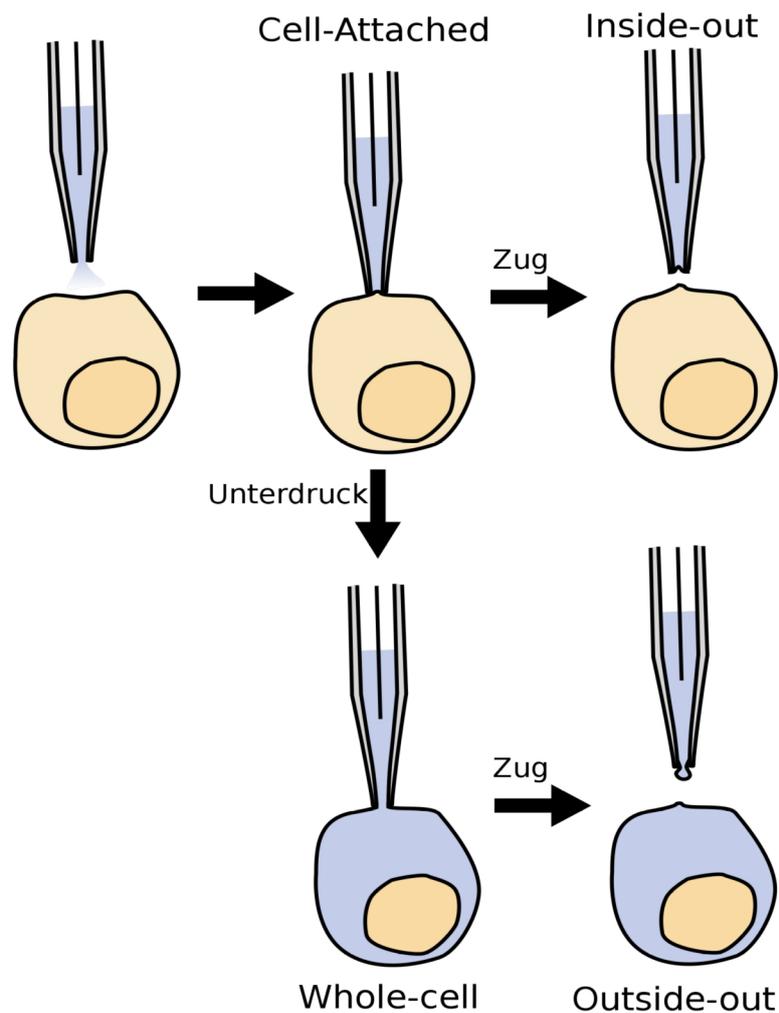


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Whole-Cell-Konfiguration.

Die Abbildung verdeutlicht, wie der elektrische Zugang zur Zelle erreicht und somit eine Ableitung der gesamten Membran ermöglicht wird (modifiziert nach Wikimedia 2021 – public domain).

3.6.2 Messstand

Auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Ventilausstattung R3-M5, Festo) waren, unter einem Faraday-Käfig, ein inverses Mikroskop (Axiovert 100 mit Objektiven Achrostigma 10x/20x, Zeiss) und die weiteren Messapparaturen montiert. Zusätzlich zu der elektrischen Abschirmung durch den Käfig war ein Großteil der leitenden Komponenten über einen gemeinsamen Massepunkt am Patch-Verstärker (EPC-9, HEKA) geerdet. Der zum Hauptverstärker gehörende Vorverstärker samt Elektrodenhalter (Eigenbau Werkstatt im Biochemisch-Pharmakologischem Institut, Marburg) war an einen motorisierten Mikromanipulator (PI 280K) befestigt.

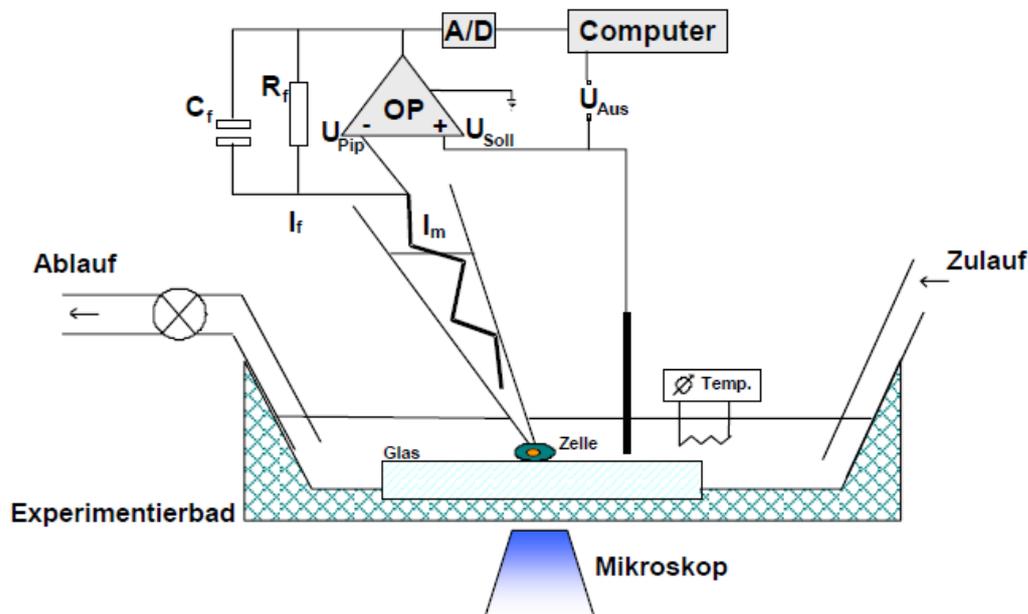


Abbildung 8: Patch-Clamp Messkreis.

A/D = Analog/Digital-Wandler; C_f = Referenzkapazität; I_f = Referenzstrom; I_m = Messstrom; R_f = Referenzwiderstand; U_{Aus} = Ausgangsspannung; U_{Pip} = Pipettenspannung; U_{Soll} = Sollspannung.

Für die Mess- und Referenzelektrode wurde chloridierter Silberdraht verwendet. In die mit Zellen bewachsenen Kulturschälchen wurde vor Messbeginn eine Messkammer (Eigenbau Werkstatt im Biochemisch-Pharmakologischem Institut, Marburg) eingesetzt, die den Anschluss eines Perfusions- und Absaugesystems ermöglichte, sowie eine laminare Strömung garantierte. Das Perfusionssystem war gravitationsbetrieben und bestand aus mehreren Lösungskammern, welche sich auf gleicher Höhe befanden und über Plastikschläuche mit der Messkammer verbunden waren. Die Lösungskammern endeten jeweils in einem eigenen, dünnen Schlauch. Die Druckverhältnisse in der Patchpipette konnten ebenfalls über ein Schlauchsystem manipuliert werden.

3.6.3 Whole-Cell Messungen

Alle Whole-Cell Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Sofern bei den jeweiligen Versuchen nicht anders angegeben, starteten und endeten die Versuche in der Standardbadlösung (B1). Die Pipettenlösungen wurden je nach zu messendem Strom bzw. Ionenkanal modifiziert und in Patchpipetten aus Borosilikatkapillaren (GB150TF-8P, SCIENCE PRODUCTS GmbH) gefüllt. Die Pipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz) in drei Zugintervallen hergestellt,

anschließend poliert und hatten in der Standardbadlösung einen elektrischen Widerstand von 3-4 M Ω .

Nach Öffnung der Zellen wurden Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV appliziert, die Form und der zeitliche Verlauf sind in Abbildung 9 dargestellt. Das Haltepotential betrug außerhalb der Rampen -50 mV, die Frequenz lag – sofern im jeweiligen Versuch nicht abweichend angegeben - bei 0,5 Hz. Vor jedem Durchlauf wurden die Zellkapazität und der Serienwiderstand automatisch abgeglichen und der Serienwiderstand zu 80 % kompensiert.

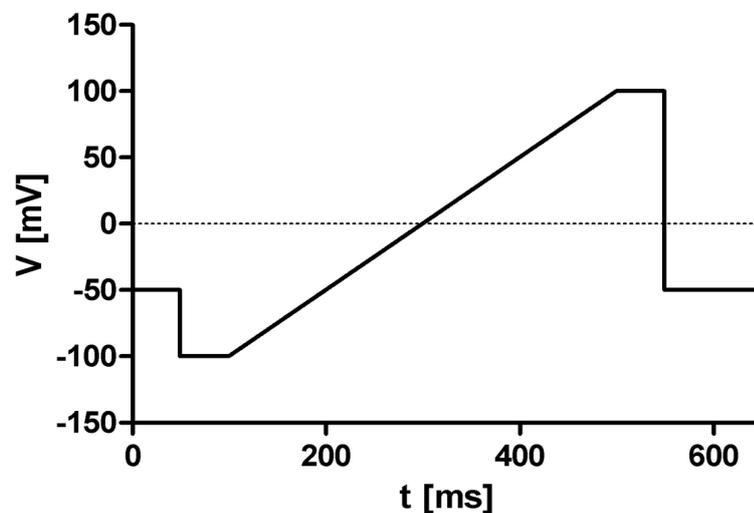


Abbildung 9: Verwendete Spannungsrampe in der whole-cell-Konfiguration.

Der Kern der Spannungsrampe besteht aus einem linear ansteigendem Abschnitt mit einer Dauer von 400 ms, jeweils davor und danach befindet sich ein 40 ms dauernder konstanter Bereich von -100 mV bzw. +100 mV – dieser wurde für die Auswertung des Zeitverlaufes verwendet. Zwischen den einzelnen Rampen wurde die Zelle bei einem konstanten Potential gehalten.

3.6.4 Versuchsablauf

Die Fibroblasten wurden unter Anwendung von Trypsin abgelöst, in Kulturschälchen (Wachstumsfläche 8,8cm², 2ml Medium) ausgesät und zunächst in einem Brutschrank inkubiert. Nach etwa einer Stunde (NRK) bzw. 24h (A7r5 und HEK) wurde das Medium abgesaugt und, nach einmaligem Waschen und erneutem Absaugen, durch Badlösung ersetzt. Nach jeder Applikation eines nicht voll auswaschbaren Wirkstoffes wurde ein neues Schälchen verwendet.

3.6.5 Extra- und intrazelluläre Lösungen

Die Standardbadlösung bzw. Extrazelluläre Lösung (B1) für alle elektrophysiologischen und fluorimetrischen Messungen setzte sich wie in Tabelle 20 angegeben zusammen. Alle Lösungen wurden vor Verwendung filtriert (Porengröße des Filters 0,22 μm).

Bestandteil	Konzentration in mM
NaCl	140
CsCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
HEPES (NaOH, pH = 7,4)	10
Glucose	10

Tabelle 20: Verwendete extrazelluläre Lösung (B1)

Für die Herstellung einer **divalent-freien Lösung (DVF)** wurde auf die Hinzugabe von CaCl₂ und MgCl₂ verzichtet, zusätzlich wurde die Lösung mit HEDTA (NaOH, pH = 7,4) gepuffert. Für die Messung von **Kaliumströmen (B1K)** wurde CsCl durch KCl in gleicher Konzentration ersetzt.

Die Pipettenlösung bzw. intrazelluläre Lösungen hatten abhängig von dem zu messenden Ionenkanal in der *whole-cell-Konfiguration* untenstehende Zusammensetzung.

Bestandteil	P-M7 [mM]	P-IK [mM]	P-C6 [mM]
NaCl	10	10	-
CsCl	130	-	25
CsMeS	-	-	110
KCl	-	125	-
MgCl ₂	-	0,5	2
Ca ²⁺ (frei)	-	~ 0,003	~ 100 nM
HEDTA (NaOH, pH = 7,4)	10	10	-
HEPES (NaOH, pH = 7,4)	5	5	30
EGTA			10

Tabelle 21: Verwendete intrazelluläre Lösungen für TRPM7 (P-M7), K_{Ca}3.1 (P-IK), TRPC6 (P-C6)

Die freie Calciumkonzentration wurde mit Hilfe des Maxchelator bestimmt (<http://www.maxchelator.stanford.edu>).

3.6.6 Datenaufzeichnung und -auswertung

Die Datenaufzeichnungen (nach Tiefpassfilterung bei -3 dB und 1000 Hz, mit einem *sample interval* von 0,1 ms bei einem *filter factor* von 2,0) erfolgte mittels der von HEKA bereitgestellten Software *Pulse*. Die Daten wurden mit *Igor Pro* (Wave-matrices) ausgelesen und mittels eines Tabellenkalkulations-Skript weiterverarbeitet. Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Messung wurden dafür Mittelwerte der Stromamplitude beim linearen Abschnitt der Spannungsrampe von -100 mV bzw. +100 mV berechnet, als y-Wert interpretiert und in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf aufgetragen. Strom-Spannungskurven wurden als Auftragung des gemessenen Stromes gegen die im Voraus definierten Spannungsrampen dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen *SigmaPlot* bzw. *Prism*.

Mittels Bestimmung der Zellkapazität und Interpretation als Maß für die Zellgröße konnte eine Normierung des Stroms pro Flächeneinheit (Strom-Kapazität-Quotient) erfolgen.

3.7 Calcium-Imaging mittels Fura-2

3.7.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Um Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration darzustellen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Dieser bildet mit Calcium-Kationen Chelatkomplexe und zeichnet sich darüber hinaus durch eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Beladung mit Ca^{2+} sowie der Wellenlänge des Anregungslichtes aus. Bei steigender Ca^{2+} -Konzentration ist von einer ebenfalls zunehmenden Fluoreszenz bei Anregung mit 340 nm, jedoch von einem gegenläufigem Abfall der Fluoreszenz bei Anregung mit 380 nm auszugehen. Die Fluoreszenzemission wurde in den jeweiligen Versuchen bei 510 nm gemessen.

Für beide Wellenlängen identische Einflussfaktoren wie Farbstoffkonzentration, Dicke der gemessenen Zelle und den optischen Eigenschaften der Messapparatur, werden durch die Bildung eines Quotienten (340nm / 380 nm) aus der Messung eliminiert. Werden nun kurz aufeinander folgende Zeitpunkte der Fluoreszenz-Messung gewählt, ist diese lediglich von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig und ermöglicht einen Vergleich verschiedener Zellen bzw. unterschiedlicher Zeitpunkte.

3.7.2 Der Messstand

Für die Fluoreszenz-Messungen wurde der Aufbau des Patch-Clamp Standes erweitert und der Raum abgedunkelt.

Ein Monochromator (Polychrome II, Photonics) erzeugte das für die Messungen erforderliche Licht mit definierter Wellenlänge, dieses wurde durch einen dichroischen Spiegel umgelenkt und passierte daraufhin ein für dieses Spektrum ausgelegtes Öl-Immersions-Objektiv (FLURA 40x, Zeiss). Der Lichtstrahl traf nun auf die sich in der Messkammer befindenden Zellen, anschließend gelangte das von diesen emittierte Licht zurück durch den Spiegel, passierte einen Emissionsfilter und wurde von einer Kamera (SensiCamtet, PCO) aufgenommen. Die Ansteuerung der einzelnen Komponenten und die Datenaufzeichnung wurde von der Software *Vision* übernommen.

Die Applikationsvorrichtung wurde leicht modifiziert (gemeinsames Endstück) eingesetzt, um die Zellen verschiedenen Lösungen auszusetzen.

3.7.3 „Beladen“ der Zellen mit Fura-2/AM

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -Fluoreszenzindikator Fura-2/AM inkubiert. Dieser eigentlich lipophobe Stoff ist mit Acetoxymethylgruppen verestert und somit membrangängig. Im Zytosol der Zellen werden die Estergruppen durch endogene, unspezifische Esterasen abgespalten – das nun hydrophile Fura-2 verbleibt somit in der Zelle.

Dem Kulturmedium wurde Fura-2/AM in einer Konzentration von 5 μM bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Badlösung gewaschen und in dieser für mindestens 10 weitere Minuten inkubiert, um die Abesterung zu gewährleisten.

3.7.4 Versuchsablauf

Die Zellen wurden auf sterilen Glasplättchen ausgesät, im Brutschrank inkubiert und nach den im jeweiligen Versuch angegebenen Protokoll behandelt. Am Messtag wurden die Glasplättchen in die Messkammer überführt und anschließend mit Fura-2 beladen. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal mit frischer Badlösung gewaschen, die Messkammer unter dem Mikroskop platziert und mit Zu- und Ablauf verbunden. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt.

3.7.5 Datenaufzeichnung und -auswertung

Mit Hilfe der Software wurde bei einer Anregungs-Wellenlänge von 360 nm ein Bild aufgenommen und anschließend für jede sichtbare Zelle den Umrissen folgend eine *ROI (region of interest)* definiert. Diese umfassten auf Grund der Vergrößerung des 40x Objektivs auch die Fortsätze jeder einzelnen Zelle. Das Messprotokoll bestand aus kurz aufeinander folgenden Belichtungen von 50 ms bei 340 nm bzw. 380 nm, die sich mit der Frequenz von 1 Hz wiederholten. Das *Binning* betrug hierbei 4x4.

Die Software mittelte für jede *ROI* die Lichtintensität der einzelnen Pixel bei beiden Wellenlängen, darauf folgte die Berechnung einer *ratio(340/380)* und die Auftragung dieser gegen den Zeitverlauf. Die weiteren Auswertungsverfahren sind in den jeweiligen Versuchen angegeben.

3.8 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Die Stammlösungen von wasserlöslichen Stoffen wurden in PBS oder ddH₂O, Nichtwasserlösliche in DMSO angesetzt. Für die Herstellung von Arbeitslösungen wurden DMSO-haltige Stocks mindestens 1000-fach verdünnt.

Die Arbeitslösung von OAG wurde mit 0,1% BSA versetzt und für 10 min im Ultraschallbad behandelt.

3.9 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (*SEM*) angegeben oder in den Abbildungen durch Fehlerbalken visualisiert. Gruppen und Subgruppen wurden durch Anwendung des ungepaarten t-Tests (*two-tailed*) verglichen. Auf diese Weise ermittelte und statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen, werden unter der Annahme eines p-Werts $< 0,05$ als signifikant ($*$) beziehungsweise $< 0,01$ als hochsignifikant ($**$) bezeichnet. Zeigte sich kein signifikanter Unterschied, trägt die entsprechende Auswertung die Bezeichnung *n.s.*

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche. Im ersten Abschnitt werden calcium-aktivierte Kaliumkanäle in renalen Fibroblasten im NRK-49F-Zellmodell untersucht. Der Fokus liegt hierbei insbesondere auf dem $K_{Ca}3.1$ -Kanal und dessen Einflussnahme auf den Transdifferenzierungsprozess. Daran anschließend behandelt der zweite Teil die Identifikation und potentielle physiologische Rolle von calcium-leitenden Ionenkanälen im selben Zellmodell sowie exploratorische Untersuchungen an Zellen aus Primärkulturen. Den Schwerpunkt bilden hierbei die TRPM7- und TRPC6-Kanäle.

4.1 Calcium-abhängige Kaliumkanäle in renalen Fibroblasten

Die Beteiligung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals am Entstehungsprozess der renalen Fibrose konnte gezeigt werden und gibt daher Anlass für weitere Untersuchungen.

Der erste experimentelle Schritt dieser Arbeit war der Nachweis der Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals und weiterer calcium-aktivierter Kaliumkanäle in NRK49F-Zellen. Darauf aufbauend schloss sich die Analyse der Kanalexpression bei Stimulation der Fibroblasten sowie die Untersuchung durch Elektrophysiologie an. Zusätzlich wurde geprüft, ob der $K_{Ca}3.1$ -Kanal die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst.

4.1.1 Detektierung von mRNA der $K_{Ca}3.1$ -, $K_{Ca}1.1$ - und $K_{Ca}2.3$ -Kanäle

Die Expression der drei calcium-aktivierten Kaliumkanäle $K_{Ca}3.1/IK$, $K_{Ca}1.1/BK$ und $K_{Ca}2.3/SK3$ in NRK49F-Zellen wurde mittels RT-PCR untersucht.

Nach Isolation der mRNA und des Ausgleichs der Konzentrationen der Proben wurde durch eine RT-Transkription cDNA erzeugt und diese in einer PCR amplifiziert. Nach Zugabe von GelRed und Auftragung von jeweils gleichen Mengen cDNA auf ein Agarosegel erfolgte die Auftrennung mittels Elektrophorese und Visualisierung durch UV-Bestrahlung. Die erfolgreiche RNA-Isolierung wurde durch den Nachweis der RNA des 18S-Haushaltgens belegt, die Verunreinigung der Ansätze mit DNA durch die Auftragung einer cDNA freien Spur im Gel (Negativkontrolle) ausgeschlossen und ein Marker für die Bestimmung der Produktlänge mitgeführt. Im Fall der KCNMA1-Untereinheit des $K_{Ca}1.1$ -Kanals wurde zusätzlich von gefäßmuskulären Zellen (A7r5) extrahierte mRNA als Positivkontrolle genutzt.

In Abbildung 10 ist das UV-bestrahlte Gel mit entsprechenden PCR-Produkten dargestellt. Abschnitt A zeigt die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in NRK-Zellen mit einer erwarteten Produktlänge von 156 bp, bei einer minimalen $K_{Ca}2.3$ -Expression. In Abschnitt B ist die Amplifikation der Untereinheit des $K_{Ca}1.1$ -Kanals mit einer Länge von 181 bp dargestellt. In der zweiten PCR wurden jeweils zwei Proben von NRK und A7r5-Zellen aus unterschiedlichen Kulturen aufgetragen.

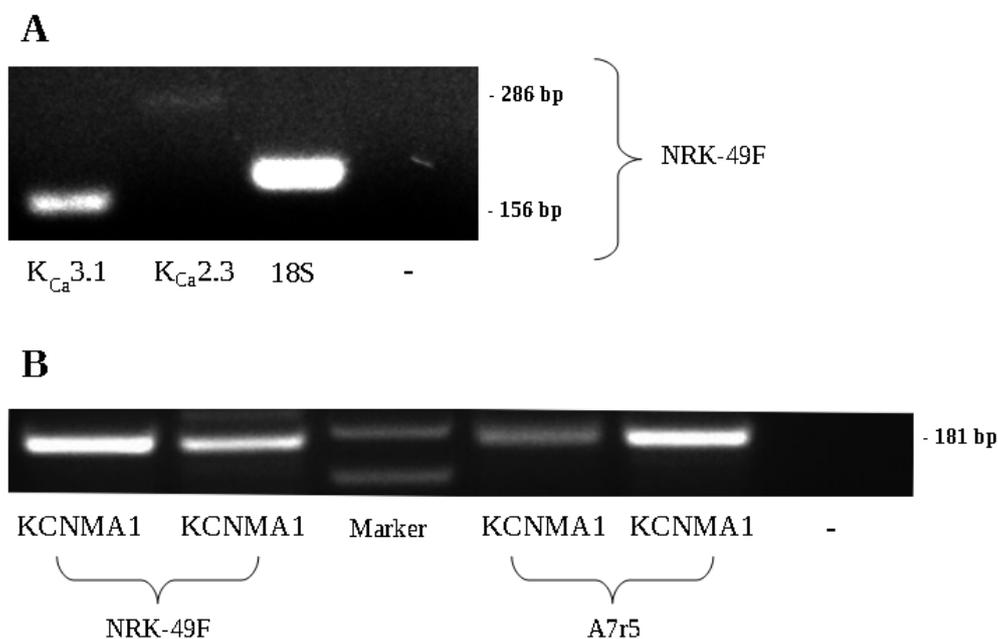


Abbildung 10: Nachweis von mRNA der $K_{Ca}3.1$ -, $K_{Ca}2.3$ - und $K_{Ca}1.1$ -Kanäle in NRK-49F-Zellen

A) Nachweis der Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in einer qualitativen RT-PCR, die $K_{Ca}2.3$ -Bande ist schwach ausgeprägt. 18S als Positivkontrolle, die Negativkontrolle (-) setzt sich aus dem kompletten PCR-Ansatz ohne DNA zusammen. **B)** Expression der α -Untereinheit des $K_{Ca}1.1$ -Kanals, jeweils zwei getrennt voneinander gewonnene Proben für NRK- und A7r5-Zellen.

4.1.2 Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals unter TGF- β -Stimulation

Aufbauend auf den Nachweis von $K_{Ca}3.1$ -RNA in NRK49F-Zellen stellte sich die Frage bezüglich einer Hochregulation der Expression nach einer Stimulierung der Fibroblasten. Diese wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR untersucht.

Dazu wurde eine NRK49F-Kultur nach Lysierung in gleichen Mengen auf eine 12-Well Zellkulturplatte aufgeteilt und nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll synchronisiert. Eine Hälfte wurde anschließend TGF- β in einer Konzentration von

2ng/ml für etwa 24 Stunden ausgesetzt, die andere Hälfte nach einem Mediumwechsel für den gleichen Zeitraum belassen. Der Isolation der Zellen und Konzentrationsanpassung der RNA schloss sich die qPCR mittels SYBR[®] Green an. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ durch Standardisierung auf die GAPDH-Expression und anschließender Normierung auf die Kontrollen unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

Der ΔCt -Wert betrug für die Stimulationsgruppe $12,80 \pm 0,13$, bei der Kontrollgruppe $11,53 \pm 0,09$. Dies entspricht einer $2,37 \pm 0,16$ -fachen Zunahme der $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ -Expression nach TGF- β -Stimulation.

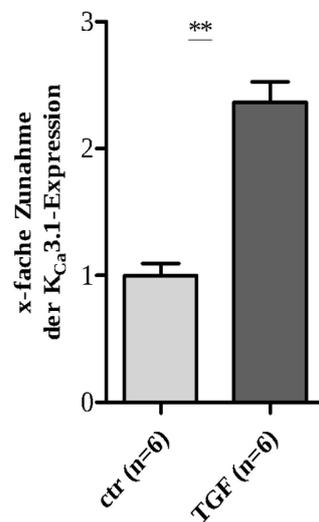


Abbildung 11: Erhöhte Expression von $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ -mRNA nach TGF β -Stimulation

Nach 24-stündiger Inkubation der NRK-Zellen mit TGF β (Konzentration 2 ng/ml) zeigt sich ein etwa 2,5-facher Anstieg der $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ -Expression.

4.1.3 Elektrophysiologische Untersuchung des $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ -Kanals

Neben der molekularbiologischen Analyse des Kanals war auch die funktionelle Untersuchung im NRK-Zellmodell von Interesse. Dazu wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht, ob der Kanal in wesentlichem Ausmaß zum Gesamt-Kaliumstrom der Zelle beiträgt.

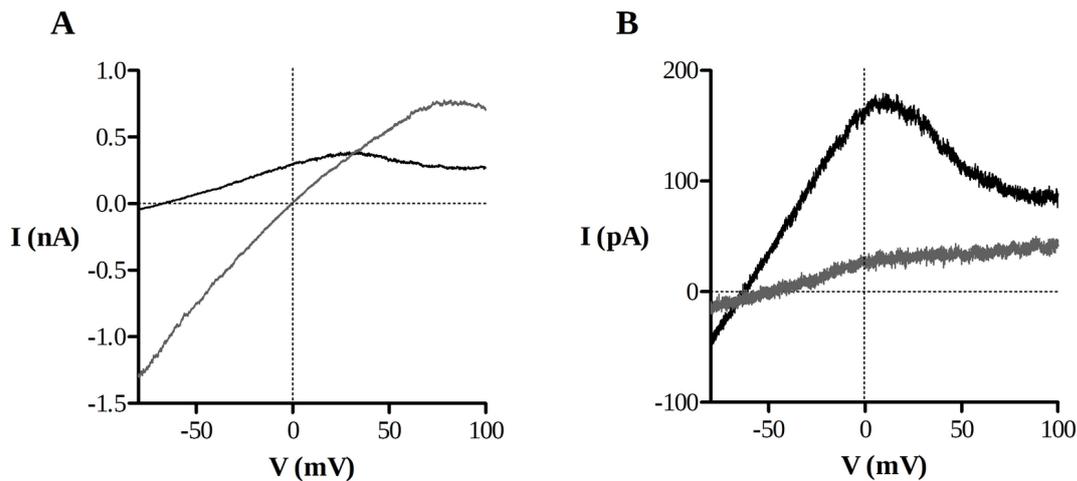


Abbildung 12: Calcium-aktivierter Kaliumstrom durch den $K_{Ca3.1}$ -Kanal in NRK-Zellen

A) Kalium-Strom mit $3 \mu\text{M}$ freiem Calcium in der Pipettenlösung bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 5 mM (schwarze Kurve) bzw. 135 mM (graue Kurve). **B)** Stromantwort der Zelle vor (schwarz) bzw. nach (grau) Applikation des $K_{Ca3.1}$ -Blockers TRAM-34 mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$.

Hierbei erfolgte die Messung an nativen NRK-49F-Zellen in der whole-cell Konfiguration, Abbildung 12 zeigt zwei für die Versuchsreihe repräsentative Messungen. In Abschnitt A zeigt die Messung die Stromantwort bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM bzw. 135 mM . Beide Kurven zeigen eine für den $K_{Ca3.1}$ -Kanal unter den jeweiligen Bedingungen charakteristische Form und weisen auf für die Zelle relevante Stromamplituden hin. Die Umkehrung der Flussrichtung bei etwa -80 mV bzw. 0 mV entspricht dem Gleichgewichtspotential von Kalium bei den gegebenen Konzentrationen.

Um weitere am Gesamt-Kaliumstrom beteiligte Ionenkanäle zu identifizieren, wurde wie in Abschnitt B abgebildet der $K_{Ca3.1}$ -Strom pharmakologisch unterdrückt. Dazu wurde der $K_{Ca3.1}$ -Blocker TRAM-34 in einer extrazellulären Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verwendet. Es zeigte sich, dass in NRK-49F-Zellen der Gesamt-Kaliumstrom im Wesentlichen durch den $K_{Ca3.1}$ -Kanal getragen wird.

4.1.4 Assoziation zwischen $K_{Ca3.1}$ -Aktivität und Ca^{2+} -Einstrom

Eine Folge der Verschiebung von Kaliumionen von intra- nach extrazellulär ist die Negativierung des Membranpotentials und somit einer Steigerung der Triebkraft für Kationen wie beispielsweise Calcium. Hier sollte mittels Calcium-Imaging geklärt werden, ob die durch den $K_{Ca3.1}$ -Kanal vermittelte Verschiebung von Kaliumionen einen detektierbaren Calciumeinstrom in NRK-Zellen verursacht.

Dazu wurden halbkonfluente NRK-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM beladen und im Verlauf der Messung mit dem $K_{Ca3.1}$ -Aktivator SKA-31 in einer Konzentration von 10 μ M perfundiert. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse einer Messreihe mit 14 Zellen dargestellt, wobei aus diesen ein Mittelwert gebildet wurde. In der Annahme einer aberranten Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen mit hierfür typischem *spike*-artigen Muster während des Badwechsels, wurden die Messdaten von zwei Zellen in dieser Auswertung nicht mit berücksichtigt.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration um etwa 40 % deutet auf einen Calciumeinstrom in Folge der $K_{Ca3.1}$ -Aktivierung hin. Dabei betrug die gemessene F340/F380-ratio zum Zeitpunkt $t = 7$ min im Mittel $0,523 \pm 0,015$, hingegen $0,727 \pm 0,013$ nach 13 min. Zusätzlich scheint die Calciumkonzentration nach Auswaschung von SKA-31 im Vergleich zur Ausgangslage höher zu liegen, es bleibt bei diesem Versuchsaufbau jedoch unklar, ob dieser Effekt auf Rückständen des Pharmakons beruht oder eine dauerhafte Konzentrationsveränderung zu Grunde liegt.

Zur Identifizierung Magnesium-abhängiger Prozesse wurde das gleiche Experiment unter Verzicht von Magnesium in der SKA-31 enthaltenden Badlösung in einer weiteren Versuchsreihe wiederholt. In dieser Messreihe bestehend aus 9 NRK-Zellen wurde bei der Auswertung eine Zelle nicht berücksichtigt, die ab Messbeginn ohne Intervention einen stetigen Anstieg des Fluoreszenzsignals verzeichnete. Wie Abbildung 14 demonstriert, ist bei Magnesium-freier Badlösung der durch SKA-31 verursachte Calciumeinstrom signifikant erhöht. Der Anstieg des Furasignals betrug $40,36 \pm 3,46$ % bei einer Magnesiumkonzentration von 1 mM, hingegen ohne Magnesium $55,03 \pm 6,76$ %.

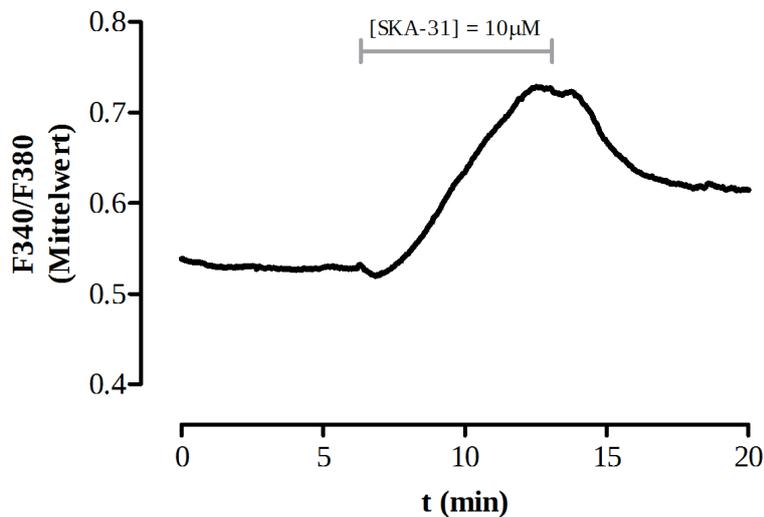


Abbildung 13: Die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ -Kanals induziert in NRK-Zellen einen Calcium-Einstrom

Nach Zugabe des $K_{Ca}3.1$ -Aktivators SKA-31 mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ lässt sich unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration feststellen. Dargestellt ist die gemittelte F340/F380-ratio von 14 gemessenen NRK-Zellen.

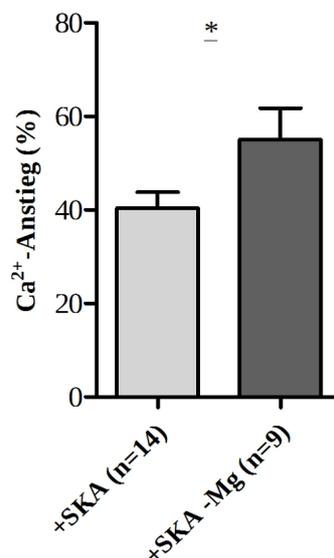


Abbildung 14: Vergleich des Calciumeinstroms mit und ohne extrazellulärem Magnesium bei Applikation von SKA-31

Wird der $K_{Ca}3.1$ -Aktivator SKA-31 ohne Magnesium appliziert, zeigt sich ein signifikant höherer Anstieg des intrazellulären Calciums (rechter Balken) im Vergleich zur alleinigen Zugabe von SKA-31 (linker Balken). Die Zunahme der Calciumkonzentration wurde anhand eines Quotienten aus maximalen und kurz vor SKA-31-Applikation gemessenen Fluoreszenzsignal quantifiziert.

4.2 Calcium-leitende Kationenkanäle in renalen Fibroblasten

Nachdem die vorhergehenden Versuche zeigten, dass die Membran der NRK-Zellen über eine Calciumleitfähigkeit verfügt, stellte sich die Frage nach den daran beteiligten Ionenkanälen.

4.2.1 TRPM7

Ein gesteigerter Calciumeinstrom bei Magnesium-Entzug ist ein Hinweis auf die Beteiligung eines durch Magnesium blockierten Calciumkanals. Ein Vertreter der TRP-Familie mit entsprechenden Regulationsmechanismen und einer nicht-selektiven Leitfähigkeit für Calciumionen ist der TRPM7-Kanal. Für diesen wurde bereits eine Beteiligung an fibrotischen Prozessen in anderen Zell- und Tiermodellen gezeigt. Unter Anwendung von molekularbiologischer sowie elektrophysiologischer und Calcium-darstellender Methodik sollte geklärt werden, ob der Kanal in NRK-Zellen exprimiert ist und inwiefern dieser eine Aktivitätsänderung im Rahmen der Transdifferenzierung erfährt.

4.2.1.1 Detektierung der TRPM7-mRNA

Mittels RT-PCR wurde der Nachweis von für den TRPM7-Kanal codierender mRNA in NRK-Zellen geführt. Das in Abbildung 15 dargestellte Agarosegel zeigt in zwei unterschiedlichen Zellproben eine Amplifizierung der TRMP7-mRNA mit einer zu erwartenden Fragmentlänge von 128 bp. Zum Vergleich wurde eine Transfektion von NRK-Zellen mit TRPM7-cDNA (Positivkontrolle) und ein DNA-freier Ansatz (Negativkontrolle) ebenso in die PCR-Analyse mit einbezogen.

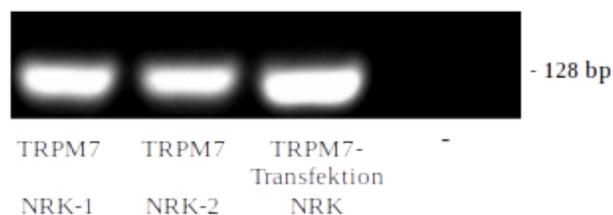


Abbildung 15: Nachweis der TRPM7-mRNA in NRK-Zellen

In zwei unabhängig voneinander gewonnenen mRNA-Proben ist eine Expression des TRPM7-Kanals sichtbar. Als Positivkontrolle diente hier die Überexpression des Kanals in NRK-49F-Zellen, als Negativkontrolle (-) ein Ansatz ohne DNA.

4.2.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung des TRPM7-Kanals

Nach erfolgreichem Nachweis von TRMP7-mRNA wurden NRK-Zellen auf für TRMP7 typische Ströme untersucht. Dazu wurden die Patchpipetten mit einer Magnesium- und Calcium-freien Lösung befüllt und die elektrische Aktivität in NRK-Zellen in der *whole-cell*-Konfiguration über mehrere Minuten gemessen. Im Verlauf wurde zusätzlich die Standard-Badlösung vorübergehend durch eine Divalent-freie Lösung ersetzt.

Unter diesen für TRPM7-Messungen üblichen Bedingungen ließ sich in allen sechs gemessenen Zellen das in Abbildung 16 dargestellte Aktivitätsmuster beobachten. Gezeigt ist in dieser sowohl der zeitliche Verlauf (Abschnitt A) als auch die Strom-Spannungskurve (Abschnitt B) der ausgewählten repräsentativen Messung. Der zeitliche Verlauf resultiert aus dem Mittelwert des gemessenen Stroms bei einem Haltepotential von -100 bzw. +100 mV (linearer Abschnitt der im Methodenteil beschriebenen Spannungsrampe), wobei die einzelnen Messpunkte im Abstand von 2 Sekunden aufgezeichnet sind. Der sich langsam entwickelnde auswärts-rektifizierende Strom ist charakteristisch für TRPM7-Kanäle. Ebenso liefert der sich bei fehlenden extrazellulären Magnesium- und Calciumionen unmittelbar ansteigende reversible Einstrom einen Hinweis für die Kanalaktivierung. In Abbildung 17 sind die mittleren Stromgrößen von $-118,2 \pm 21,3$ pA/pF bei -100 mV in divalent-freier (Abschnitt A) bzw. $41,76 \pm 7,0$ pA/pF bei +100 mV in Standardbadlösung (Abschnitt B) dargestellt.

Zusätzlich wurde die oben beschriebene Messanordnung mit 2 mM freiem Magnesium in der Pipette wiederholt. Abbildung 18 verdeutlicht, dass in Gegenwart von intrazellulärem Magnesium die im vorherigen Experiment beobachtete Entwicklung eines Stroms blockiert ist.

Ein potenter pharmakologischer Aktivator des TRPM7-Kanals ist Naltriben. Dieser konnte, wie in Abbildung 19 gezeigt, den bereits durch divalent-freie Lösung induzierten Auswärtsstrom weiter steigern. Dieser Effekt wurde in unterschiedlicher Ausprägung in allen fünf gemessenen Zellen beobachtet, dabei waren die Messbedingungen bis auf eine verkürzte Messdauer äquivalent zu den elektrophysiologischen Messungen aus Abbildung 16.

Eine weitere Eigenschaft von TRPM7-Kanälen ist deren Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Abbildung 20 zeigt die gemessenen Kationeneinströme bei einer Änderung des pH-Wertes nach sieben Minuten. Die Reduktion des pH-Wertes der

extrazellulären Lösung von 7,4 auf 4,0 resultierte in einem zunehmenden Einwärtsstrom bei allen vier gemessenen Zellen.

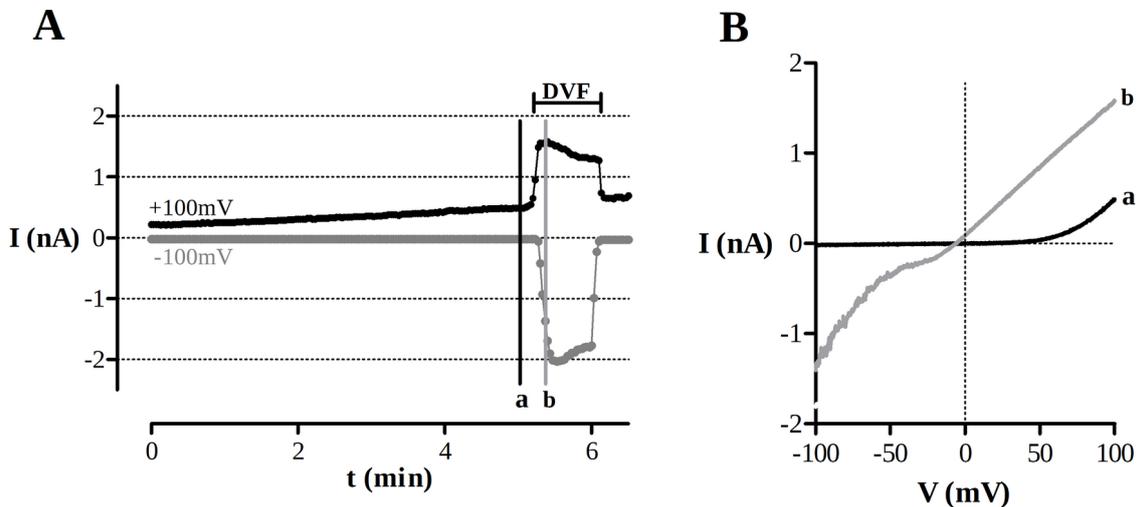


Abbildung 16: TRPM7-Strom in NRK-Zellen

A) Repräsentative Messung an einer NRK-Zelle mit magnesiumfreier Pipettenlösung: Es zeigt sich ein stetig zunehmender Auswärtsstrom. Ein- und Ausstrom lassen sich durch extrazellulären Magnesiumentzug (DVF) reversibel steigern. **B)** Darstellung der Strom-Spannungskurven vor (schwarze Kurve a) und nach dem Lösungsaustausch (hellgraue Kurve b).

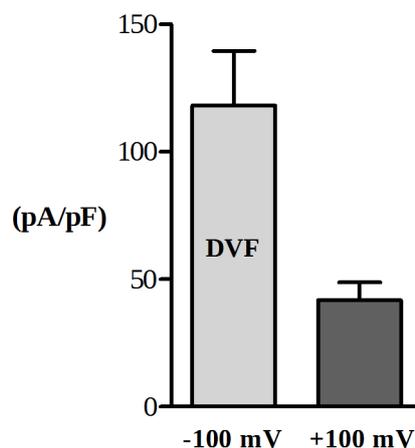


Abbildung 17: Quantifizierung des TRPM7-Stroms in NRK-Zellen

Dargestellt ist der gemittelte Stromfluss in sechs NRK-49F-Zellen, hierbei wurde ein Quotient aus gemessenem Strom und der jeweiligen Zellkapazität gebildet. Der linke Balken zeigt den Betrag des maximalen Stromfluss bei -100 mV in divalenten Kationenfreier Lösung (DVF), der rechte Balken den Strom vor Lösungsaustausch bei +100 mV.

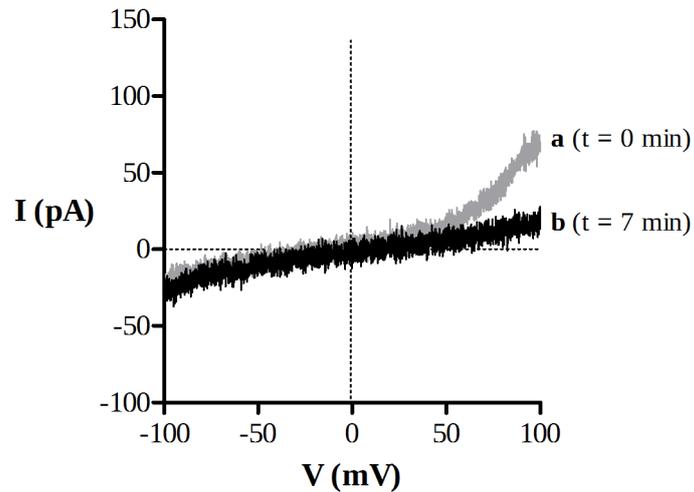


Abbildung 18: Intrazelluläres Magnesium blockiert die Aktivierung eines Kationen-Auswärtsstromes in NRK-Zellen

Die Pipettenlösung enthielt in dieser Messung 2 mM freies Magnesium. Direkt nach Öffnung der Zelle war bei +100 mV ein Auswärtsstrom von 65,0 pA sichtbar (hellgraue Kurve a), der sich nach wenigen Sekunden zurück bildete. Eine weitere hier dargestellte Strom-Spannungskurve 7 Minuten nach Messbeginn (schwarze Kurve b) zeigt einen Auswärtsstrom von 27,8 pA.

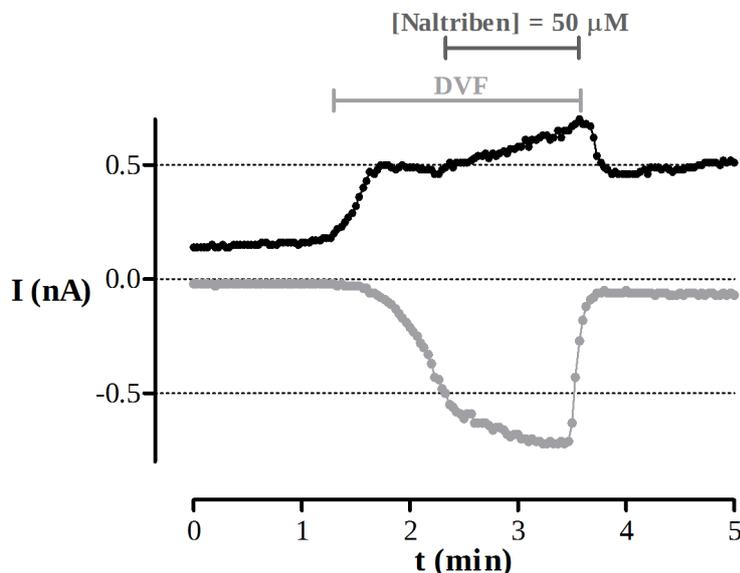


Abbildung 19: Die Applikation von Naltriben induziert in NRK-Zellen eine Stromantwort

Durch Applikation des TRPM7-Aktivators Naltriben in einer Konzentration von 50 μM zeigt sich zusätzlich zum Entzug von divalenten Kationen insbesondere ein zur Auswärtsseite hin gesteigerter Stromfluss.

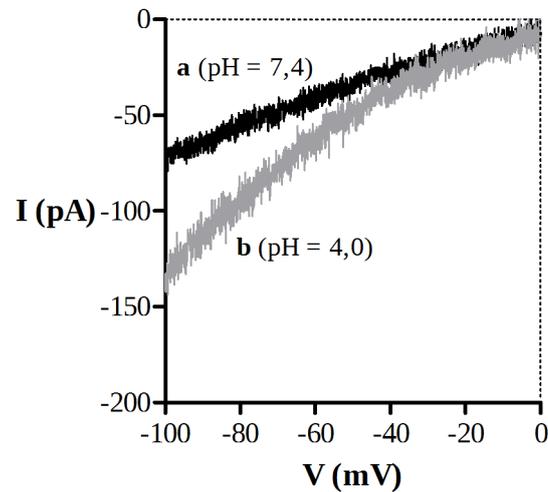


Abbildung 20: Die Absenkung des pH-Wertes erhöht in NRK-Zellen den Kationeneinstrom

Durch die Einstellung des pH-Wertes auf 4,0 (hellgraue Kurve b) etwa 7 Minuten nach Eröffnung der Zellmembran erhöht sich der Einstrom.

Eine Zusammenfassung der Experimente zur Identifizierung des TRPM7-Kanals in NRK-49F-Zellen mittels der Patch-Clamp Methodik liefert die folgende Tabelle 22.

Charakteristik des Stroms	Beobachtet (+) / nicht beobachtet (-)	Zugehörige Abb.
Über mehrere Minuten entwickelnder Auswärtsstrom	+	16
Einwärtsstrom ansteigend bei Entzug von extrazellulären divalenten Kationen	+	16
Auswärtsstrom bei Magnesium in intrazellulärer Lösung	-	18
Aktivierung durch Naltriben	+	19
Anstieg des Einwärtsstroms bei Erniedrigung des pH-Werts	+	20

Tabelle 22: Zusammenfassung der elektrophysiologischen Untersuchungen zum Nachweis des TRPM7-Kanals in NRK-49F-Zellen

4.2.1.3 Modifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch TRPM7-Aktivierung

Um den zu erwartenden Calciumeinstroms durch TRPM7-Kanäle zu verifizieren, wurden an NRK-Zellen Untersuchungen mittels des Fura-2 Fluoreszenzfarbstoffs durchgeführt. Der Versuchsablauf war hierbei äquivalent zu den Untersuchungen aus Kapitel 4.1.4, es wurde jedoch Naltriben mit einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ gelöst in Magnesium-freier Badlösung appliziert. Die dabei beobachtete Zunahme des Fluoreszenzverhältnis beschreibt Abbildung 21.

Die gleiche Versuchsanordnung wurde zusätzlich mit dem Wechsel der Badlösung hin zu Magnesium-freier Extrazellulärflüssigkeit durchgeführt, um einen über den Magnesiumentzug hinausgehenden Effekt von Naltriben belegen zu können. Für die statistische Auswertung wurde eine Zelle dieser Gruppe, die mit einem aberranten *spike*-förmigen Signalanstieg die Auswertungspunkte überlagerte, nicht berücksichtigt. Der Vergleich zwischen den Messwerten vor Intervention und bei maximalem Calciumsignal ergab für diese Gruppe einen Anstieg von $7,41 \pm 1,40 \%$, bei zusätzlicher Applikation von Naltriben hingegen $17,04 \pm 2,97 \%$ (Abbildung 22).

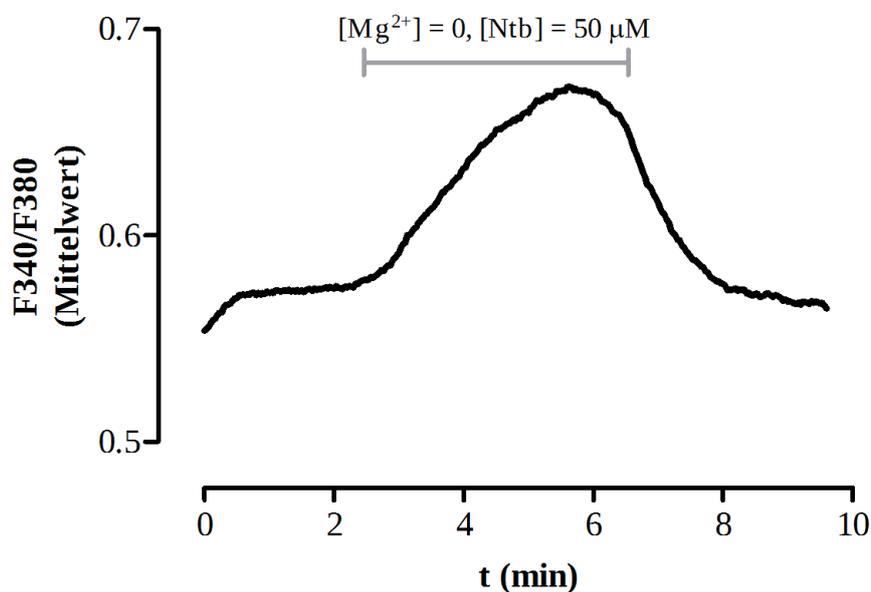


Abbildung 21: Die Applikation von Naltriben bewirkt in NRK-Zellen einen Calcium-Einstrom

Bei Magnesium-freier Badlösung und Zugabe von Naltriben (Ntb) zeigt sich ein erhöhtes Fluoreszenz-Signal. Dargestellt ist hier das mittlere Fluoreszenzverhältnis von 12 gleichzeitig gemessenen Zellen.

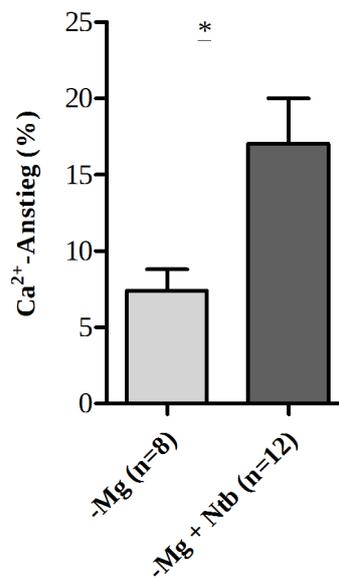


Abbildung 22: Vergleich des Fluoreszenz-Signals bei Magnesium-freier Badlösung ohne und mit Naltriben-Applikation

Die Messung aus Abbildung 21 wurde ergänzend ohne Naltriben unter sonst gleichen Messbedingungen durchgeführt. Es zeigt sich, dass der Calcium-Einstrom nicht allein Folge des Magnesiumentzugs ist, sondern der TRPM7-Aktivator den Calciumeinstrom signifikant erhöht.

4.2.1.4 Untersuchung der Expression von TRPM7 unter TGF- β -Stimulation

Anschließend an den funktionellen Nachweis des TRPM7-Kanals stellte sich die Frage nach einer möglichen Hochregulation der Genexpression. Hierzu wurden NRK-Zellen durch das Zytokin TGF- β stimuliert (s. Kapitel 4.1.2) und die mRNA-Konzentration mittels einer quantitativen RT-PCR bestimmt.

Hierzu wurden Proben aus drei Experimentreihen gewonnen. Proben deren RNA-Konzentration für das Einsetzen in die reverse Transkriptase-Reaktion zu gering waren, wurden aussortiert - hiervon waren zwei Proben in der TGF- β -Gruppe betroffen.

Abbildung 23 fasst die Proben in einer Statistik zusammen. Zwischen den mit TGF- β behandelten NRK-Zellen und den lediglich synchronisierten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Expression von TRPM7 ($0,871 \pm 0,148$ vs. $1,000 \pm 0,135$ -fache Änderung). Die Δ ct-Werte betragen dabei $7,339 \pm 0,198$ in der Kontrollgruppe und $7,550 \pm 0,237$ in der Stimulationsgruppe.

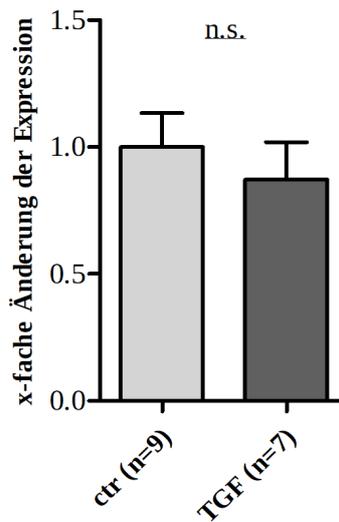


Abbildung 23: Unter TGF- β -Stimulation zeigt sich in NRK-Zellen keine signifikante Änderung der TRPM7-Expression

Nach 24-stündiger Inkubation der NRK-Zellen mit TGF β (Konzentration 2 ng/ml) zeigt sich keine signifikante Änderung der Expression des TRPM7-Kanals.

4.2.1.5 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen TGF- β -Stimulation und TRPM7-Strom

Ionenkanäle unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen wie beispielsweise der Membrantranslokation, Phosphorylierung oder direkten Steuerung durch Signalmoleküle. Um Hinweise für das Vorhandensein möglicher Modifikation der Kanalaktivität zu sammeln, wurde an NRK-49F-Zellen auch eine elektrophysiologische Untersuchung nach TGF- β -Stimulation durchgeführt.

Hierzu wurden die NRK-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit TGF- β trypsiniert, in Vollmedium ausgesät und nach frühestens einer Stunde elektrophysiologisch untersucht. Mit der Kontrollgruppe wurde äquivalent verfahren, jedoch ohne TGF- β inkubiert. Die Messungen fanden in der *whole-cell*-Konfiguration äquivalent zu Kapitel 4.2.1.2 statt, protokollgemäß wurde hier jedoch kein Badwechsel vorgenommen.

Im Rahmen der Versuchsreihe zeigte sich nach Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration ein, im Vergleich zu den vorhergehenden Messungen an unbehandelten Zellen, erhöhter Einwärtsstrom. Um im Zeitverlauf des Experiments stabile Messbedingungen zu gewährleisten, wurden nur Messungen mit ausreichender *Seal*-Qualität verwandt, d.h. wenn der Leckstrom weniger als -100 pA betrug.

Bei allen Messungen ist die Höhe des Stroms bei +100 mV 5 Minuten nach Öffnung der Zelle der Auswertungspunkt. Wie in Abbildung 24 dargestellt ließ die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen erkennen, in der Kontrollgruppe betrug der gemessene Strom dabei $335,1 \pm 47,9$ pA und in der TGF- β -Gruppe $442,8 \pm 58,3$ pA. Auch nach Normierung auf die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße, blieb dieser leichte numerische Unterschied ohne Signifikanz ($19,1 \pm 6,2$ pA/pF zu $22,9 \pm 4,3$ pA/pF).

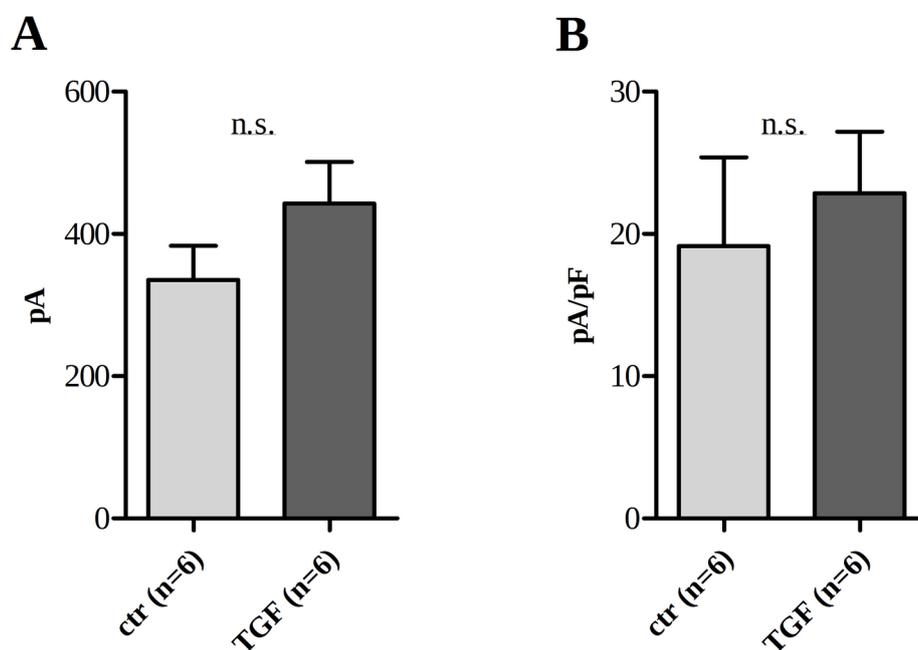


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses der TGF- β -Stimulation auf den TRPM7-Strom in NRK-Zellen

NRK-Zellen wurden für 24h ohne bzw. in Anwesenheit von TGF- β inkubiert und anschließend unter für TRPM7 typischen Bedingungen elektrophysiologisch untersucht. Auswertungspunkt ist dabei der gemessene Strom bei +100 mV nach 5 Minuten. Dargestellt ist der absolute (A) und der auf die Zellkapazität normierte Strom (B). Der numerische Unterschied zeigt hierbei keine Signifikanz.

4.2.2 TRPC6

Neben der ubiquitären Expression des TRPC6-Kanals in Nierengewebe scheint dieser auch eine Rolle im Transdifferenzierungsprozess dermalen Fibroblasten zu spielen. Dies rückte den Ionenkanal im Rahmen der Untersuchung zu Calcium-gesteuerten Prozessen in renalen Fibroblasten in den Fokus weiterer Betrachtungen.

4.2.2.1 Untersuchung des Einflusses von TGF- β auf die TRPC6-Transkription

Um eine Veränderung der Expression des Kanals in NRK49F-Zellen nach Zytokin-Stimulation zu detektieren, wurde eine mRNA-Analyse mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden NRK-Zellen, wie in den vorhergehenden Versuchen, mit TGF- β stimuliert bzw. lediglich synchronisiert. Dabei diente die 1:4 verdünnte cDNA von A7r5-Zellen, die native TRPC6-Ströme zeigen, als Positivkontrolle für die Expression. Nach 32 PCR-Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte auf eine Agarosegel aufgetragen. Das für diesen Versuch verwendete Primerpaar Nr. 3 (Tabelle 7) liefert Produkte von 275 bp Länge.

Abbildung 25 zeigt das belichtete Gel: Bei allen Proben ist eine Bande auf der zu erwartenden Höhe von 275 bp zu sehen, die bei den mit TGF- β -behandelten NRK-Zellen intensiver ausgeprägt ist.

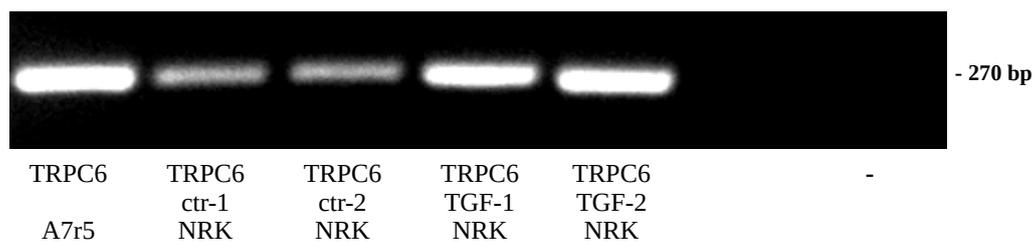


Abbildung 25: Der TRPC6-Kanal ist in NRK-Zellen exprimiert

Von links nach rechts: Als Positivkontrolle wurde die aus einer A7r5-Kultur gewonnene und 1:4 verdünnte cDNA aufgetragen. Jeweils zwei Proben NRK-Zellen wurden in Mangelmedium gehalten (ctr-1/2) bzw. zusätzlich mit TGF- β behandelt (TGF-1/2). Nach einer leeren Geltasche folgt der PCR-Ansatz ohne DNA-Zugabe.

Der qualitativen PCR folgte eine quantitative Untersuchung an weiteren RNA-Isolationen. Dazu wurden aus zwei verschiedenen Passagen stammende NRK-Zellen stimuliert und die mRNA-Expression mittels *quantitative real-time RT-PCR* bestimmt. Wie in Abbildung 26 dargestellt umfasste Versuchsgruppe 1 sechs stimulierte und sechs unstimulierte Proben, Versuchsgruppe 2 jeweils drei Proben.

In beiden Versuchsgruppen zeigte sich nach Auswertung unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode eine hochsignifikante Hochregulation der TRPC6-Expression. Diese betrug in Gruppe 1 das $7,91 \pm 1,41$ -fache und in Gruppe 2 das $20,39 \pm 0,40$ -fache im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Tabelle 23 fasst die zugehörigen Δct -Werte zusammen. Zusätzlich wurde eine TRPC6-Transfektion in NRK-Zellen vorgenommen, zum Vergleich ist der zugehörige Δct -Wert in der genannten Tabelle enthalten.

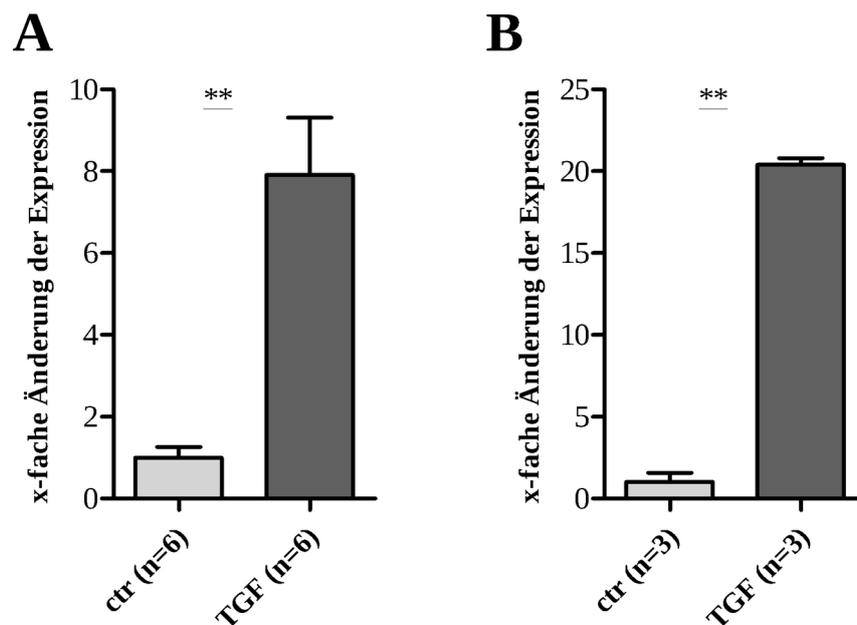


Abbildung 26: Verstärkte Expression der TRPC6-mRNA durch TGF- β -Stimulation in NRK-Zellen

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde der Einfluss von TGF β auf die Expression des TRPC6-Kanals getestet. Es wurden zwei verschiedene Versuchsgruppen von NRK-Zellen untersucht, beide zeigten eine hochsignifikante Hochregulation des TRPC6-Gens um das etwa 8- bzw. 20-fache.

		Δct -Wert
Versuchsgruppe 1	TGF	$15,76 \pm 0,25$
	Kontrolle	$18,87 \pm 0,37$

Versuchsgruppe 2	TGF	13.74 ± 0.03
	Kontrolle	19.61 ± 2.02
TRPC6-Transfektion		2,97

Tabelle 23: Δct -Werte für TRPC6-Primer nach Stimulation/Transfektion von NRK49F-Zellen

4.2.2.2 Untersuchung der TRPC6-Translation

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob das Vorhandensein von TRPC6-mRNA in NRK-Zellen mit einer Expression des Kanalproteins einhergeht. Dazu wurde neben Untersuchungen an nativen NRK-Zellen ergänzend auch Überexpressionsversuche von TRPC6 an HEK-Zellen unternommen.

Im ersten Schritt wurden HEK-Zellen mit einem TRPC6-Plasmid transfiziert und anschließend deren Protein extrahiert. Diese Proben dienten im Weiteren als Positivkontrolle für das Kanalprotein. Zusammen mit dem extrahierten Protein aus nativen HEK- und NRK-Zellen wurden diese in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Hierbei wurde ein Protein-Marker für die Bestimmung der Proteingröße mitgeführt. Abbildung 27 zeigt die entsprechenden Membranabschnitte nach Inkubation mit GAPDH- und TRPC6-Antikörper sowie anschließender Belichtung.

Alle Proben wiesen eine Bande auf der für GAPDH erwarteten Höhe auf. In Bezug auf das TRPC6-Protein zeigte sich in den NRK-Zellen eine schwach ausgeprägte Proteinbande, hinweisend auf eine sehr geringe Synthese des Kanalproteins. Die nativen HEK-Zellen wiesen keine und die transfizierten HEK-Zellen eine ausgeprägte Bande auf. Das Proteinprodukt des Plasmids ist dabei erwartungsgemäß größer (130+ kDa) als das native Kanalprotein (106 kDa) – s. Kapitel 3.3 .

Zusätzlich wurden HEK-Zellen auch mit einem GFP- und dem TRPC6-eCFP-Plasmid transfiziert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie Abbildung 28 zeigt, sind in HEK-Zellen sowohl die Produkte des GFP- als auch das TRPC6-Plasmids immunfluoreszenzmikroskopisch detektierbar.

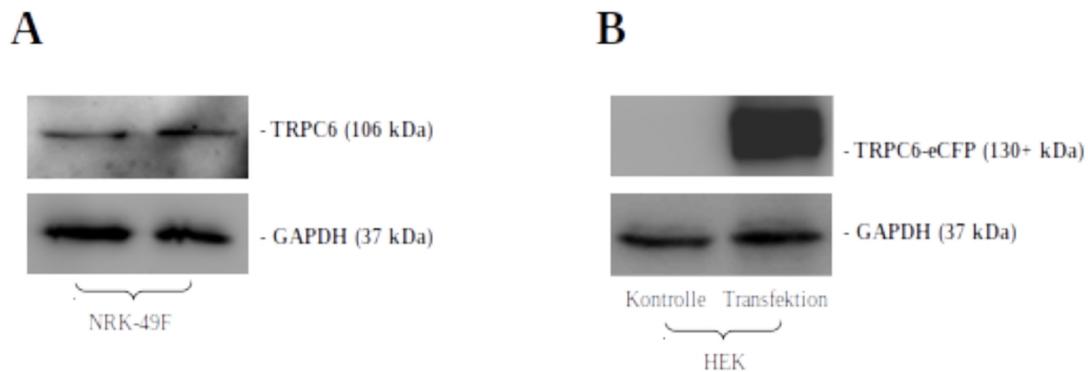


Abbildung 27: Nachweis des TRPC6-Proteins ins NRK-Zellen

Die Membran wurde nach Inkubation mit einem GAPDH(1:10000)- und TRPC6(1:100)-Antikörper belichtet. **A)** zeigt zwei Proben nativer NRK-Zellen. **B)** zeigt auf der linken Seite native und auf der rechten Seite mit TRPC6 transfizierte HEK-Zellen.

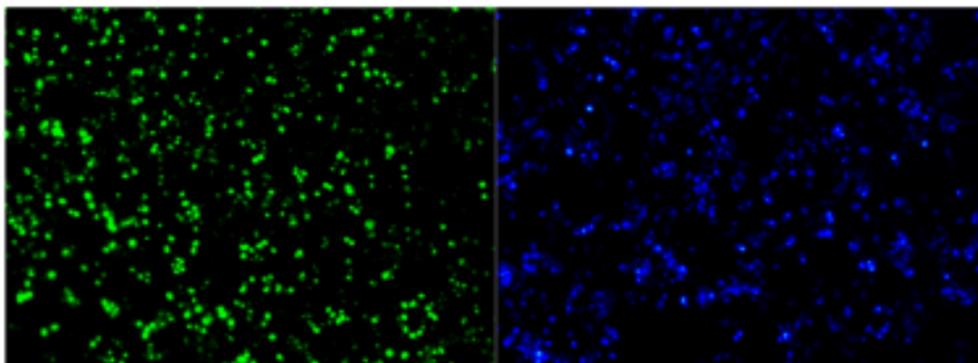


Abbildung 28: Darstellung der Überexpression von TRPC6 in HEK-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Das verwendete TRPC6-Plasmid trägt einen CFP-Tag. Das linke Bild zeigt die GFP-Fluoreszenz, das Rechte die CFP-Fluoreszenz bei einer 10-fachen Vergrößerung.

4.2.2.3 Elektrophysiologische Untersuchung der TRPC6-Funktion

Anschließend an den Nachweis der Expression und Proteinsynthese sollte die Funktion des TRPC6-Kanals untersucht werden. Für die Optimierung der elektrophysiologischen Messbedingungen wurden A7r5-Zellen, die typischerweise einen TRPC6-Strom aufweisen, verwendet. Diese zeigten bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von 200 μM vor und während der Applikation von 100 μM OAG die in Abbildung 29A dargestellten Strom-/Spannungskurven.

Alle vier gemessenen A7r5-Zellen zeigten einen für TRPC6 typischen Strom mit doppelt-rektifizierender Charakteristik. In insgesamt sieben mit TGF β behandelten NRK-Zellen war dieser TRPC6-Strom nicht detektierbar. In Abbildung 29B ist eine repräsentative Messung dargestellt.

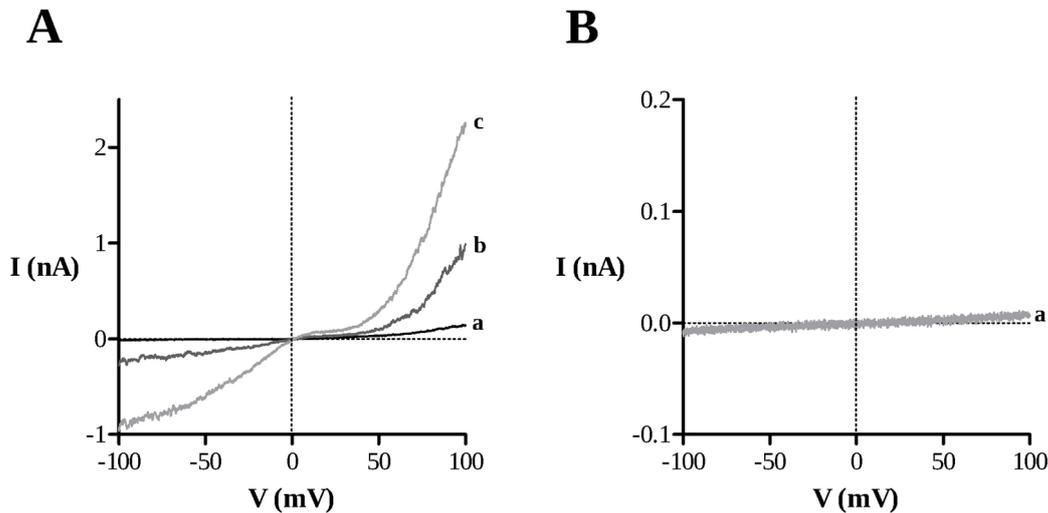


Abbildung 29: Vergleich von TRPC6-Strom in A7r5-Zellen mit NRK-Zellen

A) Gezeigt ist der durch 100 μM OAG induzierte Strom in einer A7r5-Zelle mit 200 μM extrazellulärem Calcium im whole-cell Modus. Es sind drei Zeitpunkte dargestellt: Vor OAG-Applikation (schwarze Kurve a), während der Anfangsphase des Lösungsaustausches (dunkelgraue Kurve b) und bei voller Aktivierung (hellgraue Kurve c). **B)** Gleicher Versuchsablauf in einer mit TGF β stimulierten NRK-Zelle. Kurve a zeigt den gemessenen Strom nach OAG-Applikation.

4.2.2.4 Untersuchung des mit TRPC6 assoziierten Calciumeinstroms nach TGF- β -Stimulation

Nicht alle NRK-Zellen weisen unter TGF- β -Einfluss eine Transdifferenzierung auf, dies könnte einen Effekt auf die elektrophysiologischen Messungen haben. Im Gegensatz zur *Patch-Clamp*-Technik bestand mittels *Calcium-Imaging* die Möglichkeit, mehrere stimulierte Zellen gleichzeitig und unter Beibehaltung der Morphologie zu messen.

Im ersten Schritt wurden HEK-Zellen mit dem TRPC6-Plasmid transfiziert und der Calciumeinstrom durch den Kanal mittels der Fura2-Methodik überprüft. Diese zeigten wie in Abbildung 30 visualisiert einen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen erhöhten Calciumeinstrom nach Applikation von OAG (100 μM). Zusätzlich ließ sich ein rascheres Erreichen der Fluoreszenzmaxima in der transfizierten Gruppe beobachten.

Ein ähnlicher Versuchsablauf wurde auch an NRK-Zellen mit und ohne TGF- β -Stimulation durchgeführt. Entsprechend einem Standardprotokoll wurde zur Detektion der Ca^{2+} -Ströme zusätzlich die extrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Dazu wurden NRK-Zellen für 48 h in Anwesenheit von 2 ng TGF- β inkubiert bzw. für 48 h in Mangelmedium gehalten. Nach Messbeginn wurde eine Calcium-freie sowie 100 μM OAG enthaltende Badlösung appliziert. Daran schloss sich, bei gleichbleibender OAG-Konzentration, die Erhöhung der Calciumkonzentration auf 5 mM an (Abbildung 31).

Für den statistischen Vergleich (Abbildung 32A) der zwei Gruppen wurde ein Quotient aus dem F340/F380-Wert 30 Sekunden nach und 10 Sekunden vor Änderung der extrazellulären Calciumkonzentration gebildet (t_B/t_A). Die Gesamtzahl der gemessenen Zellen entstammt dabei vier verschiedenen Messserien, bei denen jeweils beide Gruppen untersucht wurden. Die TGF- β -behandelten Zellen wiesen einen Anstieg des F340/F380-Werts von $14,74 \pm 2,16$ % auf ($n = 20$), die unbehandelten Zellen $9,58 \pm 1,50$ % ($n = 29$). Dieser Unterschied war signifikant.

Der Versuch wurde auch ohne die Applikation von OAG durchgeführt. Wie Abbildung 32B zeigt, ist in Abwesenheit von OAG kein signifikanter Unterschied zwischen den TGF- β -behandelten bzw. unbehandelten NRK-Zellen in der Fura-Untersuchung zu beobachten.

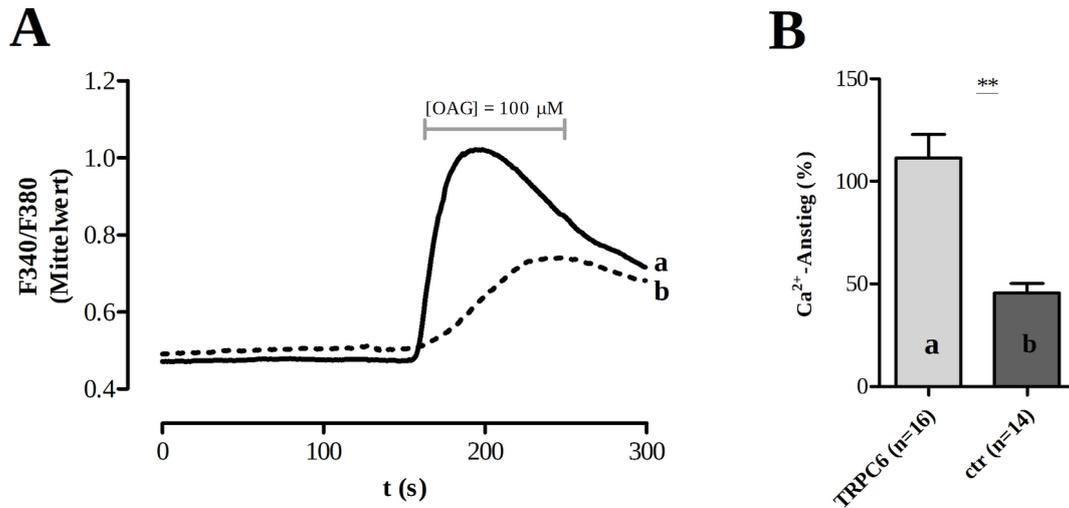


Abbildung 30: TRPC6-Transfektion und Fura-Messung in HEK-Zellen

HEK-Zellen wurden mit einem TRPC6-Plasmid transfiziert. **A)** Die durchgängige Kurve a stellt das mittlere Fluoreszenzverhältnis aus 16 gleichzeitig gemessenen Zellen dar. Im Vergleich dazu repräsentiert die gestrichelte Kurve b 14 nicht transfizierte Zellen. **B)** Die statistische Auswertung der jeweiligen Maxima im Verhältnis zur Grundfluoreszenz der einzelnen Zellen.

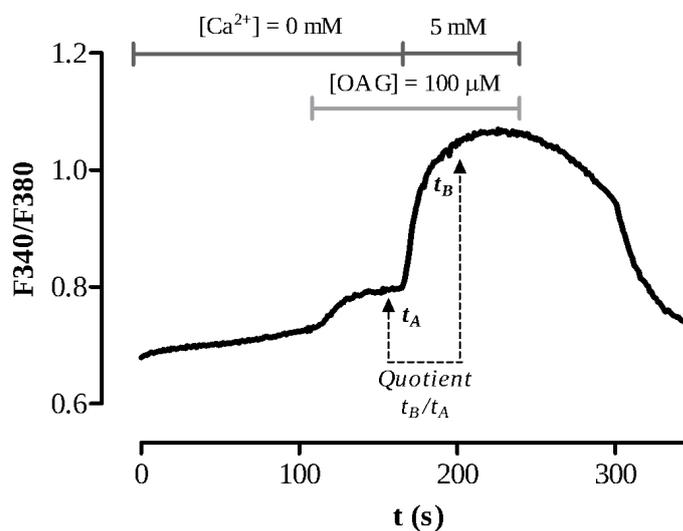


Abbildung 31: Mit OAG assoziierter Calcium-Einstrom in NRK-Zellen nach TGF- β -Stimulation

Nach einer 48-stündigen Inkubation mit TGF- β wurden NRK-Zellen einer Fura-Messung unterzogen: Einer Perfusion der Zellen mit einer 100 μ M OAG-Lösung in Calcium-freier Umgebung schloss sich die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 5 mM an. Hier dargestellt ist eine für die gesamte Messreihe repräsentative Fura-Aufzeichnung.

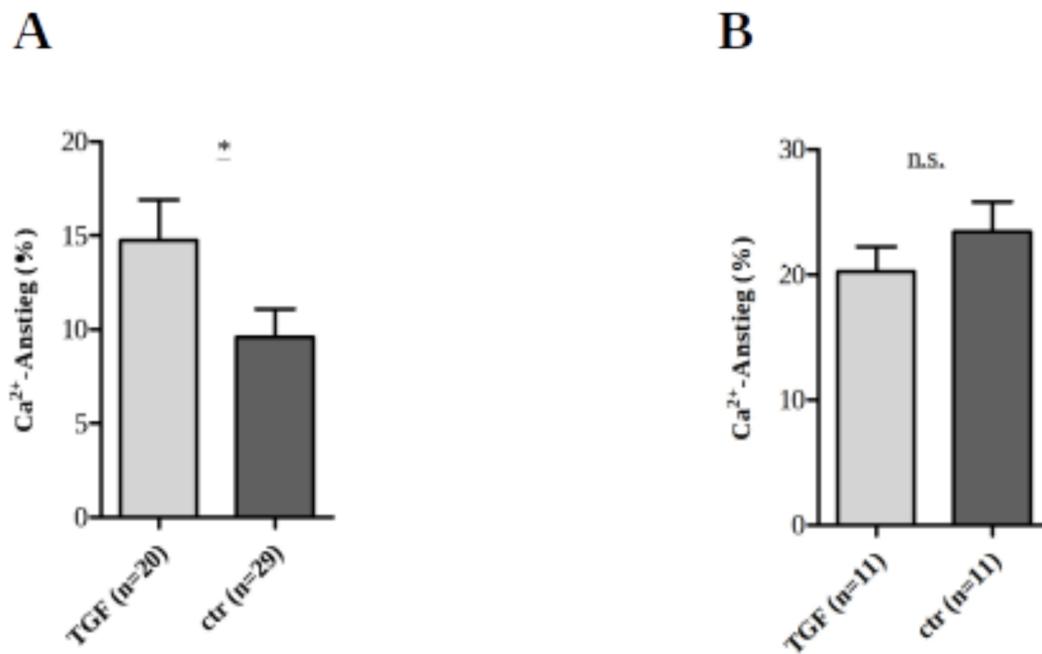


Abbildung 32: Vergleich des Calcium-Einstroms nach TGF β -Stimulation mit und ohne OAG-Applikation

Es wurde ein Quotient t_B/t_A (vgl. Abbildung 31) basierend auf der Fluoreszenzratio 30 s nach bzw. 10 s vor Wechsel der Calciumkonzentration bestimmt. **(A)** Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist der Calciumeinstrom bei den TGF- β -stimulierten NRK-Zellen signifikant erhöht. **(B)** Hier wurde auf eine OAG-Applikation verzichtet, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Calciumeinstrom.

4.2.2.5 Untersuchung der Transdifferenzierung von Fibroblasten-Primärkulturen aus TRPC6-KO Mäusen

Neben den Belegen für eine Beteiligung des TRPC6-Kanals an der Fibroblasten-Transdifferenzierung im NRK-Zellmodell, sollten zusätzliche Hinweise an einem weiteren Zellmodell gesammelt werden. Hierzu wurden Primärkulturen Matrixproduzierender Maus-Fibroblasten stimuliert.

Aus den Nieren einer TRPC6-Knockout-Maus und einer Wildtyp-Maus wurden jeweils Fibroblasten isoliert und kultiviert. Diese wurden synchronisiert und eine Gruppe für 24 Stunden mit 5 ng/ml TGF- β inkubiert, die andere Gruppe ohne TGF- β belassen. Daran schloss sich eine Bestimmung der Expression von α SMA mittels quantitativer PCR an.

Wie in Abbildung 33 dargestellt, ließ sich in den Wildtyp-Zellen ein signifikanter Anstieg der α SMA-Expression von $1,00 \pm 0,07$ auf das $2,18 \pm 0,32$ -fache (Δ ct-Werte $0,28 \pm 0,10$ vs. $-0,83 \pm 0,21$) beobachten. Im Fall der TRPC6-Knockout-Zellen zeigte sich eine nicht signifikante Veränderung des Mittelwerts von $1,00 \pm 0,09$ auf das $1,52 \pm 0,45$ -fache (Δ ct-Werte $0,42 \pm 0,14$ vs. $-0,03 \pm 0,54$).

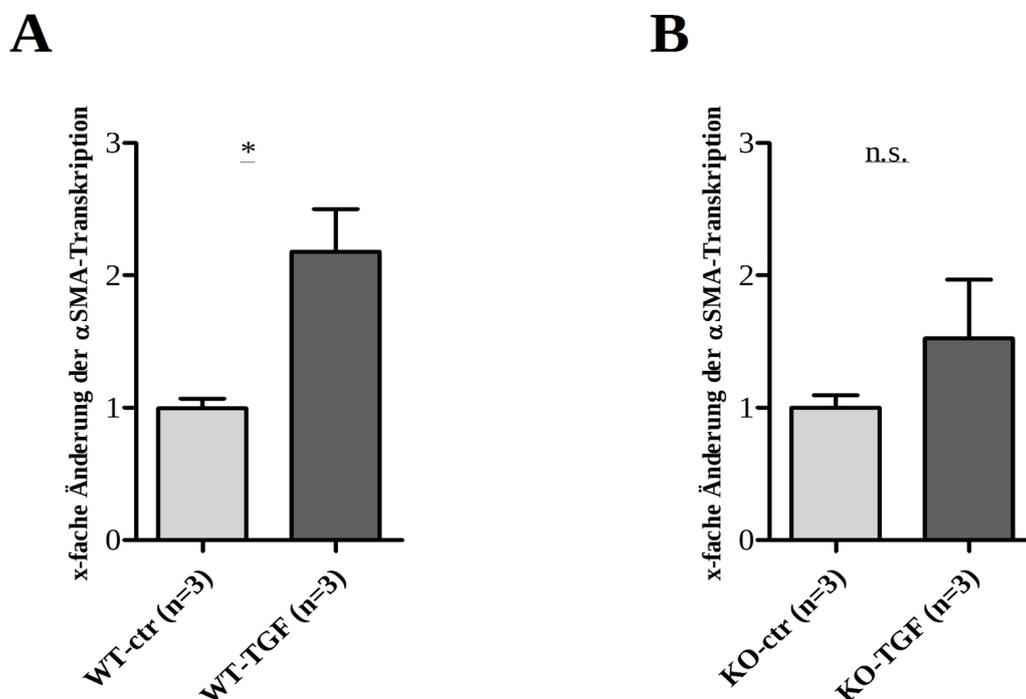


Abbildung 33: Reduzierter Anstieg des Myofibroblasten-Parameters α SMA im TRPC6-KO

Vergleich der Expression von α SMA unter TGF- β -Stimulation in primären renalen Fibroblasten einer TRPC6-Knockout- (KO) bzw. Wildtyp-Maus (WT).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Ionenkanäle an Transdifferenzierungsprozessen von renalen Fibroblasten beteiligt sind. Der Schwerpunkt wurde dabei auf Calcium-permeable Kanäle gesetzt und die Untersuchungen überwiegend am Zellmodell NRK-49F durchgeführt.

Im Voraus hatte die Arbeitsgruppe der nephrologischen Klinik in Marburg bereits demonstriert, dass die Aktivierung des Calcium-abhängigen Kaliumkanals $K_{Ca}3.1$ für die Proliferation von renalen Fibroblasten notwendig ist. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen Kanalexpression und Fibrosierung im Tiermodell aufgezeigt. Ein Zusammenhang zwischen Kanalexpression und Transdifferenzierung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit am NRK-49F-Zellmodell validiert werden. Weitere Untersuchungen lieferten den Hinweis, dass die Aktivierung von $KCa3.1$ -Kanälen in NRK-Zellen konsekutiv einen Calcium-Einstrom induziert.

Das führte zu der Fragestellung, welche Calcium-permeable Ionenkanäle in NRK-Zellen exprimiert sind. Diese könnten einerseits für die calcium-abhängige Aktivierung von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen benötigte Calciumionen in die Zelle leiten, andererseits auf eine Hyperpolarisation mit einem Calciumeinstrom reagieren. In der Folge konnte die Expression von zwei Kanälen der TRP-Familie nachgewiesen werden. Die Funktion der identifizierten Ionenkanäle TRPM7 und TRPC6 wurde anschließend mittels quantitativer PCR, elektrophysiologischer Methodik und Calcium-Imaging weiter charakterisiert. Die dabei erhobenen Befunde lassen darauf schließen, dass diese Ionenkanäle einen wesentlichen Einfluss auf die Calcium-Homöostase in NRK-Zellen haben. Daraus folgt, dass die Transdifferenzierung renaler Fibroblasten wahrscheinlich von der Ionenkanalaktivität beeinflusst wird beziehungsweise abhängig ist.

5.1 Das NRK-Zellmodell

Stabile NRK-49F-Zellkulturen wurden bereits in den 70er Jahren etabliert und dienten ursprünglich der Erforschung von interzellulären Signalprozessen. Es handelt sich um renale Fibroblasten, welche die stabile Fähigkeit zur Transdifferenzierung zum Myofibroblasten aufweisen. Diese Eigenschaft wird auch von anderen Arbeitsgruppen zur Erforschung der Nierenfibrose genutzt [Yi et al, 2018] und stellt auch im Rahmen dieser Arbeit das zelluläre Modell des Fibroseprozesses dar. Vor allem die

elektrophysiologische Charakteristik von NRK-Zellen war bis jetzt nur partiell geklärt. Diese wird durch die hier gewonnenen Ergebnisse weiter definiert und bietet Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen.

Durch ihre unkomplizierte Kultivierbarkeit und schnelles Wachstum eigneten sich NRK-Zellen für die Untersuchung durch alle gängigen molekularbiologischen, proteinbiochemischen und insbesondere elektrophysiologischen Methodiken. Für den Grad der Transdifferenzierung ist die Expression von α SMA ein zuverlässiger Marker und wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Durchführung der Versuche immer begleitend bestimmt. Durch Stimulation der NRK-Zellen mittels TGF- β konnte der beschriebene Transdifferenzierungsvorgang induziert und anschließend untersucht werden. Das NRK-Zellmodell vermittelt dementsprechend einen Eindruck davon, wie Fibroseprozesse in der humanen Niere grundsätzlich ablaufen könnten.

Eine Einschränkung liegt dahingehend vor, dass die Beteiligung von anderen Zellarten nicht berücksichtigt wird und auch der in der Realität vorliegende Zellverbund, beispielsweise mit definierter dreidimensionaler Struktur, nur unzureichend abgebildet werden kann. Auch wenn teilweise anderen Zelltypen, wie Perizyten, die Fähigkeit zur Transdifferenzierung zugeschrieben wird, geht man davon aus, dass überwiegend renale Fibroblasten an der Produktion extrazellulärer Matrix beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde TGF- β zur Induktion der Transdifferenzierung verwendet. Hinsichtlich der nachfolgenden Signalwege könnten, durch andere Zytokine vermittelt, weitere oder modifizierte Mechanismen zur Fibrosierung beitragen. Die Relevanz der hier vorgestellten Ergebnisse bezieht sich folgerichtig primär auf die TGF- β abhängige Signaltransduktion.

5.2 Calcium-abhängige Kaliumkanäle

Ein Zusammenhang zwischen fibrotischen Prozessen in Nierengewebe und der gesteigerten Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals kann, auf dem Boden der Ergebnisse von mehreren Arbeitsgruppen, als gesichert angesehen werden [Grgic et al. 2009; Huang et al. 2014]. Dieser Kaliumkanal gilt daher als ein möglicher Kandidat für die pharmakologische Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz [Köhler et al. 2016]. Dabei ist nur unzureichend geklärt, in welchen Zelltypen die erhöhte Kanalaktivität vorrangig zu finden ist. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass diese Kanaleigenschaft nicht exklusiv für die Niere zutrifft, sondern auch in anderen Organsystemen eine Rolle spielt

(Kapitel 1.4.1.1).

In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass der $K_{Ca3.1}$ -Kanal im renalen Fibroblasten-Zellmodell NRK-49F exprimiert ist, eine wesentliche elektrische Aktivität aufweist und im Rahmen der Myofibroblasten-Differenzierung eine Hochregulation erfährt. Dieses Erkenntnis bestätigt die vorbestehenden Befunde aus Experimenten an renalen Fibroblasten, welche bei Fibrose-Induzierung ebenso eine gesteigerte Kanalexpression zeigten [Grgic et al. 2009; Fu et al. 2014].

Wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, hat in NRK-Zellen die Aktivierung von $K_{Ca3.1}$ -Kanälen einen Calciumeinstrom zur Folge. Dieser Zusammenhang ist durch eine Hyperpolarisation der Zelle und der daraus resultierenden vergrößerten Triebkraft für Calciumionen zu erklären. Die Regulation von calcium-permeablen Ionenkanälen durch das kalium-abhängige Membranpotential ist in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden. Beispielsweise decken sich die Messergebnisse am NRK-49F-Modell mit Beobachtungen in U937-Zellen [Penna et al. 2015]. In U937-Zellen resultierte die $K_{Ca3.1}$ -Aktivierung ebenso in einem Calciumeinstrom.

Ein Vorteil der indirekten Regulation von Calciumkanälen liegt wahrscheinlich darin, dass sie eine feinere und stabilere Einstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ermöglicht. Konsekutiv können intrazelluläre Calciumionen wiederum Kaliumkanäle aktivieren.

5.3 TRPM7

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren erstmalig die Expression und elektrische Aktivität des TRPM7-Kanals in NRK-Fibroblasten. Zusätzlich wurde aufgezeigt, dass die Aktivierung von TRPM7-Kanälen die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Eine Hochregulation der Expression dieses Kanals konnte während des Transdifferenzierungsprozesses nicht beobachtet werden. Die elektrophysiologische Untersuchung zeigte nach der Behandlung mit TGF- β eine geringe Zunahme der Kanalaktivität, die sich jedoch in der statistischen Auswertung als nicht signifikant darstellte. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Calciumeinstrommenge nicht durch Hochregulation des TRPM7-Kanals, sondern vielmehr der Triebkraft liefernden $K_{Ca3.1}$ -Kanals geregelt wird.

Im Gegensatz dazu kamen andere Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass bei einer

Fibrosierung in Leber-, Lungen- oder Herzgewebe eine Expressionssteigerung dieses Kanals vorliegt [Fang et al. 2014; Yu et al. 2013] bzw. eine Inhibition der Expression den Grad der Fibrose verringert [Guo et al. 2014]. Du et al. demonstrierten 2010 an humanen atrialen Zellen des Herzens sowohl eine Expressionszunahme als auch Steigerung der elektrophysiologisch messbaren Kanalaktivität unter Applikation von TGF- β . Bis dato untersuchte keine andere Arbeitsgruppe den TRPM7-Kanal in renalen Fibroblasten auf seine elektrische Aktivität und Expression.

Es kann somit vermutet werden, dass der Ionenkanal in renalen Fibroblasten eine von den oben genannten Organsystemen abweichende physiologische Funktion und Regulation aufweist. Folglich ist auch von einer verschiedenartigen pathophysiologischen Rolle auszugehen.

Denkbar wäre auch eine Regulation der Kanalaktivität über Prozesse, die mit der konventionellen whole-cell Konfiguration nicht detektierbar sind bzw. durch diese maskiert werden. Beispielhaft sei hier die Kanalaktivität in Abhängigkeit von der PIP₂-Konzentration genannt [Runnels et al. 2002]. Eine erhöhte Konzentration von PIP₂ wäre nach dem Öffnen der Zelle und des Austauschs der ursprünglichen intrazellulären Flüssigkeit gegen die PIP₂-freie Pipettenlösung, nicht mehr detektierbar. Um diese Fragestellung weiter zu bearbeiten, wären beispielsweise Einzelkanal-Untersuchungen unter nativen intrazellulären Bedingungen sinnvoll. Auch eine Messung mittels der perforated Patch-Clamp-Technik würde etwaige Kanalmodulatoren bedeutend weniger beeinflussen. Sofern die Ausprägung von Zell-zu-Zell-Kontakten einen wesentlichen Einfluss auf die Kanalaktivität hat, stößt die elektrophysiologische Methode an ihre Grenzen.

Weitere Untersuchungen mit Fokus auf die Rolle des TRPM7-Kanals bei Fibroseprozessen, könnten in Zukunft eine differenzierte Bewertung der Ergebnisse ermöglichen. Dabei sind an renalen Fibroblasten gewonnene Erkenntnisse gleichermaßen relevant, wie die Forschung an Fibroblasten anderer Organsysteme und bleiben abzuwarten.

5.4 TRPC6

Die in Kapitel 4.2.2 aufgeführten Versuchsergebnisse zeigen die Expression des TRPC6-Ionenkanals in NRK-49F-Zellen. Weiter konnte eine Hochregulation der Expression nach Induktion der Myofibroblasten-Transdifferenzierung beschrieben

werden. Wie für viele TRP-Kanäle auf Grund der geringen Leitfähigkeit typisch, konnte die Kanalaktivität mit dem gewählten experimentellen Aufbau nicht direkt elektrophysiologisch nachgewiesen werden. Jedoch konnte in Calcium-Imaging-Versuchen ein gesteigerter Calciumeinstrom nach TGF- β -Behandlung in Verbindung mit dem TRPC6-Aktivator OAG demonstriert werden. Zu beachten ist, dass OAG nicht exklusiv den TRPC6-Kanal aktiviert, sondern auch die der gleichen Kanalfamilie angehörigen TRPC3 und TRPC7 [Hofmann et al. 1999]. Deren Expression im NRK-49F-Modell kann jedoch durch Ergebnisse vorangehender Untersuchungen vernachlässigt werden [Dernison et al. 2010].

Eine Abhängigkeit der Transdifferenzierung von der TRPC6-Aktivität kann folgerichtig als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Die Annahme, dass während der Transdifferenzierung eine Hochregulation des TRPC6-Kanals erfolgt, wird durch Versuche mit renalen Mausfibroblasten unterstützt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei einem Knockout des TRPC6-Gens in diesen Fibroblasten die Expression des Myofibroblasten-Markers α -SMA reduziert ist.

Zeitgleich zur Durchführung der hier beschriebenen Versuche, wurden weitere Hinweise für die TRPC6-Funktion bei fibrotischen Prozessen veröffentlicht. Bei Fibroseprozessen in Lungengewebe scheint der Kanal beteiligt zu sein, da ein Knockout des Kanals im Mausmodell eine verminderte Fibroseneigung zur Folge hat [Hofmann et al. 2017]. Ergänzend konnte eine Verminderung des Calciumeinstroms nach erfolgten TRPC6-Knockout nachgewiesen werden. Eine weitere Arbeitsgruppe demonstrierte kürzlich ebenfalls die Hochregulation von TRPC6 in Abhängigkeit von TGF- β in vaskulären Muskelzellen [Park et al. 2017]. Auch wurden Hinweise für die TRPC6-Funktion bei der renalen Fibrose geliefert. Dafür wurde mittels unilateraler Uretherobstruktion in TRPC6-Knockout- und Wildtyp-Mäusen Nierenfibrose induziert [Wu et al. 2017]. Hier konnte in der Gruppe der Knockout-Mäuse eine Reduzierung des Umfangs der Fibrose festgestellt werden. Ergänzend seien in diesem Zusammenhang die eingangs erwähnten Befunde aufgeführt, die eine TRPC6-Beteiligung im Rahmen der Untersuchung von dermalen Fibroblasten beinhalten [Davis et al. 2012].

In keiner der aufgeführten Veröffentlichungen wurde die elektrische Aktivität des TRPC6-Kanals demonstriert, auch in der vorliegenden Arbeit gelang dies nicht. Dies ist am ehesten technisch bedingt, da die bekanntermaßen geringe Leitfähigkeit der TRPC6-Kanäle eine direkte Messung der Kanalaktivität mit der patch-clamp-Methode

verhindert. Andererseits ist dem TRPC6-Kanal, auf Grund der zahlreichen Veröffentlichungen und den hier dargestellten Untersuchungen, bei Fibroseprozessen eine wesentliche Rolle sehr wahrscheinlich zuzuschreiben. Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich durch die Annahme auflösen, dass bereits geringe Änderungen der Calciumkonzentration wesentliche Auswirkungen auf die Zellfunktionen haben können.

Während der Durchführung der in dieser Arbeit gezeigten FURA-Messungen an NRK-Zellen, konnten sporadisch einzelne spike-artige Anstiege der Calciumkonzentration beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf kurzzeitig aktivierte spannungsabhängig Calciumkanäle sein, die zur zellulären Calciumhomöostase beitragen und in NRK-Zellen bereits beschrieben worden sind [Roos et al. 1997]. Denkbar ist auch die Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen durch den initial vom TRPC6-Kanal getragenen Natriumeinstrom [Estacion et al. 2006]. Auch hier können bereits wenige aktivierte TRPC6-Kanäle in der Folge zu einem signifikanten Calciumeinstrom führen.

Vermutlich auf Grund experimentell-technischer Ursachen war ein direkter elektrophysiologischer Nachweis des TRPC6-Kanals nicht erfolgreich. Dennoch lässt sich in der Zusammenschau der hier gezeigten Ergebnisse und der Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen feststellen, dass der TRCP6-Kanal wahrscheinlich an renalen fibrotischen Prozessen beteiligt ist.

5.5 Resultierende Modellvorstellung

Die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen das bereits bekannte Wissen über den Transdifferenzierungsvorgang renaler Fibroblasten. Daraus resultiert ein zelluläres Modell des Fibroseprozesses, dass unter anderem das Zusammenspiel der untersuchten Ionenkanäle erklärt. Dieses trägt zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Abläufe bei der Entstehung der renalen Fibrose bei und soll hier vorgestellt werden.

Ein wichtiger Triggerfaktor der Nierenfibrose scheint die renale Hypoxie zu sein [Liu et al. 2017]. Die Betrachtung der durch Hypoxie verursachten Fibrosierung lässt eine große Anzahl von beteiligten Signalwegen und Molekülen erkennen. Diese stehen untereinander in einer komplexer Beziehung und beeinflussen sich gegenseitig. Neben dem TGF- β -Signalweg sind beispielsweise die HIF-(*Hypoxia inducible factor*)- und

Notch-Signalwege von Bedeutung. Auch Signalmoleküle wie IL-18 sind über die Induktion einer lokalen Inflammation wichtige Einflussfaktoren auf die Progredienz der renalen Fibrose.

Eine Schlüsselrolle dürfte der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration in Fibroblasten zukommen. Calcium ist bei fast allen zellulären Vorgängen beteiligt und beeinflusst insbesondere Zellfunktionen wie das Expressionsmuster, die Aktivität von Ionenkanälen oder verschiedenen Enzymen. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, ist die zelluläre Calciumhomöostase eng mit dem Aktivierungsgrad von Fibroblasten verknüpft. An der Aufrechterhaltung und Variation der Homöostase sind calcium-leitende Ionenkanäle maßgeblich beteiligt. Die in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle und insbesondere deren Interaktion beeinflusst die intrazelluläre Calciumkonzentration wesentlich und nachhaltig. Auf der Basis der vorliegenden experimentellen Ergebnisse lässt sich folgende Modellvorstellung ableiten (Abbildung 34).

- Die erhöhte Konzentration von TGF- β bei chronischer Nierenschädigung resultiert in einer gesteigerten Expression der $K_{Ca}3.1$ - und TRPC6-Ionenkanäle. Dies führt zum einen zu einer Hyperpolarisation der Zelle durch $K_{Ca}3.1$ -Kanäle, zum anderen zu einem Calciumeinstrom durch die in der Zellmembran vermehrt vorhandenen TRPC6-Kanäle.
- Die Hyperpolarisation hat zur Folge, dass durch den TRPM7-Ionenkanal zusätzliches Calcium in die Zelle strömt.
- Eine zunehmende Calciumkonzentration im Fibroblasten bewirkt wiederum die Aktivierung weiterer $K_{Ca}3.1$ -Kanäle, wodurch die Hyperpolarisation additional zunimmt.
- Das Resultat der beschriebenen Vorgänge ist ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in den Fibroblasten. Die zusätzlichen Calciumionen induzieren zelluläre Prozesse, welche den Transdifferenzierungsvorgang aufrecht erhalten und für die Synthese extrazellulärer Matrix notwendig sind. Dieser auf zellulärer Ebene ablaufende Prozess stellt sich makroskopisch als eine zunehmende Fibrosierung und klinisch als eine fortschreitende Funktionseinschränkung der Niere dar.

Das beschriebene Modell könnte beispielsweise erklären, weshalb in renalen Fibroblasten keine Hochregulation des TRPM7-Kanals erfolgt. Der Calciumeinstrom würde nicht über eine Aktivitätsmodifikation des TRPM7-Kanals, sondern durch gesteigerte KCa3.1-Aktivität mit folgender Hyperpolarisation des Fibroblasten gesteuert. Hierbei ist die in ruhenden NRK-Zellen bereits hohe Leitfähigkeit des TRPM7-Kanals ausreichend, um eine signifikante Veränderung der Calciumkonzentration zu bewirken.

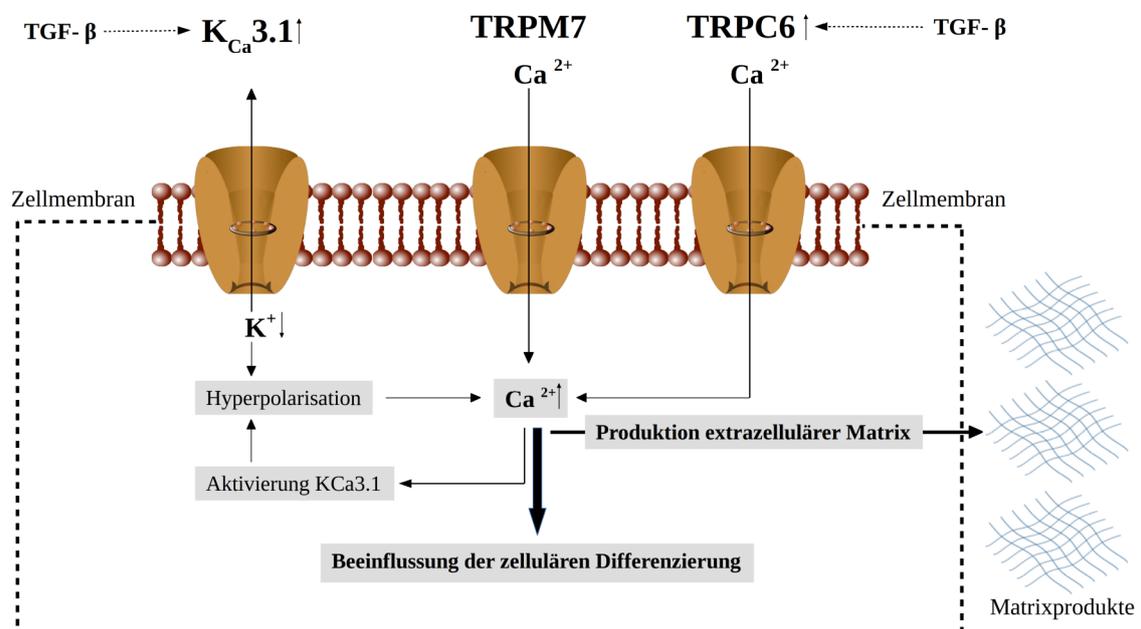


Abbildung 34: Modell des Transdifferenzierungsvorgangs in renalen Fibroblasten unter Beteiligung der Ionenkanäle K_{Ca}3.1, TRPM7 und TRPC6

Bei chronischer Nierenschädigung ist die Konzentration von TGF-β erhöht, dies resultiert in einer gesteigerten Expression der K_{Ca}3.1- und TRPC6-Kanäle. Der auswärts gerichtete Kaliumstrom durch KCa3.1-Kanäle bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle, in der Folge strömt Calcium durch TRPM7-Kanäle ein. TRPC6-Kanäle erhöhen die Calciumkonzentration zusätzlich. Calciumionen sind notwendig für die Synthese extrazellulärer Matrix und induzieren weitere für die Transdifferenzierung relevante Prozesse. Gleichzeitig werden weitere K_{Ca}3.1-Kanäle aktiviert.

5.6 Therapeutische Perspektiven

Beim Großteil der etwa 80 000 dialysepflichtigen Patienten in Deutschland ist eine chronisch progrediente Nierenerkrankung ursächlich [Girndt et al. 2016]. Die chronische Nierenerkrankung ist in den allermeisten Fällen von einem fibrotischen Geschehen begleitet und liegt überwiegend in der Irreversibilität dieses Prozesses begründet. Von einer Unterbrechung oder Verlangsamung der fibrotischen Umwandlung der Niere würden dementsprechend eine große Zahl von Patienten profitieren. Dementsprechend breit und intensiv ist die Erforschung der zu Grunde liegenden physiologischen und pathologischen Mechanismen.

Die Niere ist aus mehreren Gründen besonders anfällig für eine Fibrosierung [Hewitson 2012]. Neben dem großen Spezialisierungsgrad mit mehr als 20 verschiedenen Zelltypen, ist die fehlende Fähigkeit zur Regeneration der einzelnen Nephrone von Bedeutung. Zudem sind diese zahlreichen Toxinen ausgesetzt und reagieren empfindlich auf Schwankungen in der Versorgung mit Sauerstoff.

Als ein wesentlicher Mediator der Nierenfibrose gilt TGF- β in Verbindung mit dem *Smad*-Signalweg [Meng et al. 2015]. Der Einsatz von TGF- β -Inhibitoren zur Behandlung der Fibrose zeigte in klinischen Studien erste Erfolge. Beispielsweise hatte die orale Gabe von Pirfenidon bei Patienten mit diabetischer Nephropathie zur Folge, dass die GFR-Abnahme im Verlauf geringer ausfiel [Sharma et al. 2011]. Jedoch ist eine systemische TGF- β -Blockade mit noch nicht absehbaren Risiken verknüpft, da dessen antiinflammatorische und -tumorale Eigenschaften im gesamten Körper unterdrückt werden. Es bedürfte also einer organ- oder sogar zellspezifischen Therapieform.

Vielversprechend könnte deshalb die selektive Einflussnahme auf Einzelprozesse der Transdifferenzierung von renalen Fibroblasten sein. Gelingt eine Blockade von Mechanismen, die in renalen Fibroblasten weitestgehend spezifisch ablaufen, könnte eine Fibrosierung der Niere effektiv aufgehalten werden. In den meisten Fällen wäre das mit einer deutlichen Steigerung der Lebensqualität von chronischer Niereninsuffizienz betroffener Patienten verbunden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ionenkanäle bieten hierfür einen möglichen Ansatzpunkt.

6 Zusammenfassung

Die chronische Niereninsuffizienz gehört mit einer weltweiten Prävalenz von bis zu 16% zu den häufigsten Krankheitsbildern. Der renale Funktionsverlust ist, unabhängig von der ursächlichen Pathologie, in der überwiegenden Zahl der Fälle von einer irreversiblen Fibrosierung des Nierengewebes begleitet. Die damit einhergehende überschießende Produktion von extrazellulärer Matrix trägt wesentlich zu einem Fortschreiten der Niereninsuffizienz bei. Auf zellulärer Ebene sind für die Synthese der extrazellulären Matrix maßgeblich Myofibroblasten beteiligt. Diese sind eine dauerhaft aktivierte Form von residenten Fibroblasten, die ubiquitär in der Niere vorkommen. Ein wichtiger Regulator des Transdifferenzierungsprozesses von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist hierbei das Zytokin TGF- β .

Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass der kalium-permeable $K_{Ca}3.1$ -Ionenkanal am renalen Fibroseprozess maßgeblich beteiligt ist. Weiterhin besteht eine Abhängigkeit zwischen dem Aktivierungsgrad von Fibroblasten und der intrazellulären Calciumkonzentration. Bei der Untersuchung von Fibrosemechanismen in anderen Organsystemen wurden die calcium-permeablen TRPM7- und TRPC6-Ionenkanäle als weitere Einflussfaktoren identifiziert.

NRK-49F-Zellkulturen sind immortalisierte renale Fibroblasten, die aus der Spezies *rattus norvegicus* stammen. In der vorliegenden Arbeit wurden anhand dieses Zellmodells die $K_{Ca}3.1$ -, TRPM7- und TRPC6-Ionenkanäle im Rahmen des Transdifferenzierungsprozesses unter Einfluss von TGF- β untersucht. Durch die Anwendung molekularbiologischer und proteinbiochemischer Verfahren wurde die Kanalexpression analysiert und mittels Calcium-darstellender sowie elektrophysiologischer Methodik die Kanalfunktion weiterer Betrachtung unterzogen.

Es konnte eine Expression der drei genannten Ionenkanäle in NRK-49F-Zellen nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen wurde demonstriert, dass der Kaliumstrom in diesem Zelltyp überwiegend durch $K_{Ca}3.1$ -Kanäle bedingt ist. Die Aktivierung des Kanals hatte einen nachgeschalteten Einstrom von Calciumionen in die Zelle zur Folge. Weiterhin zeigte die Stimulation mit TGF- β eine Zunahme der Expression von $K_{Ca}3.1$ - und TRPC6-Kanälen. Während der Applikation des TRPC6-Aktivators OAG konnte in stimulierten NRK-49F-Zellen ein erhöhter Calciumeinstrom beobachtet werden. Für den TRPM7-Kanal gelang die Messung einer spezifischen

elektrischen Aktivität. Des Weiteren konnte durch eine Aktivierung des TRPM7-Kanals die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht werden, jedoch blieb sowohl die Expression als auch die Kanalaktivität unbeeinflusst von einer Behandlung mit TGF- β .

Die Hochregulation des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wurde bereits in anderen renalen Zellmodellen beobachtet und weist auf die zentrale Rolle dieses Ionenkanals während der Prozesse der Zellproliferation hin. Ergänzend zu den Erkenntnissen über den TRPC6-Kanal in dermalen und pulmonalen Fibroblasten, ist dem Ionenkanal auch in renalen Fibroblasten eine wesentliche Rolle zuzuschreiben. Erstmals wurde die elektrische Aktivität des TRPM7-Kanals in NRK-Fibroblasten nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen an kardialen Fibroblasten veränderte sich die Kanalaktivität während des Transdifferenzierungsprozesses im NRK-49F-Zellmodell jedoch nicht.

In der Zusammenschau der gewonnenen Erkenntnisse ist anzunehmen, dass ein Zusammenspiel der untersuchten Kanäle die intrazelluläre Calciumkonzentration signifikant beeinflusst. Auf Grund einer Hyperpolarisation des Fibroblasten durch den $K_{Ca}3.1$ -Kanal besteht eine gesteigerte Triebkraft für einen Calciumeinstrom durch die TRPM7- und TRPC6-Kanäle. Die Calciumionen aktivieren im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus wiederum $K_{Ca}3.1$ -Kanäle und scheinen somit die Produktion extrazellulärer Matrix aufrechtzuerhalten.

Die therapeutischen Optionen zur Beeinflussung der Nierenfibrose sind nach wie vor begrenzt. Generelle Blockaden des TGF- β -Signalwegs haben sich hierbei als risikoreich erwiesen, daher könnte eine Beeinflussung von Teilprozessen des fibrotischen Geschehens aussichtsreiche Behandlungsperspektiven eröffnen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, das Verständnis der grundsätzlichen Mechanismen der Transdifferenzierung renaler Fibroblasten zu erweitern und möglicherweise neue therapeutische Ansätze zu eröffnen.

Summary

With a prevalence of up to 16%, chronic kidney disease is one of the most common diseases worldwide. Regardless of the aetiology, usually the pathologic process culminates in irreversible fibrosis. This process is hallmarked by an excessive production of extracellular matrix by so called myofibroblasts, which then promotes renal failure. One important regulator of the transdifferentiation from residential fibroblasts to collagen-producing myofibroblasts is the cytokin TGF- β .

Previously it has been shown that the potassium channel $K_{Ca3.1}$ is involved in the process of renal fibrosis. Furthermore, intracellular concentration of calcium controls activation of fibroblasts. Conclusively, the calcium channels TRPM7 and TRPC6 were identified as regulators of fibrosis in multiple organ systems.

In this thesis, immortalized *rattus norvegicus* renal fibroblasts (NRK-49F) were used to investigate the role of above-mentioned ion channels $K_{Ca3.1}$ -, TRPM7- und TRPC6 during the process of transdifferentiation in vitro. The expression-levels of these channels were analyzed using molecular biology and proteo-biochemical methods. Furthermore, their function was characterized using real-time calcium-imaging and electrophysiological measurements using the patch-clamp technique.

Expression of $K_{Ca3.1}$ -, TRPM7- und TRPC6 was experimentally verified in NRK-49F cells. It was shown that activation of $K_{Ca3.1}$ is followed by an influx of calcium ions. Upon stimulation with TGF- β , $K_{Ca3.1}$ - and TRPC6-expression is increased. In addition, the application of the TRPC6-activator OAG resulted in an increased calcium influx in stimulated cells. It could be demonstrated that $K_{Ca3.1}$ and TRPM7 produced relevant currents. Whereas TRPM7 had an impact on the intracellular calcium concentration, TGF- β -treatment did not significantly change expression or activation of TRPM7 in NRK-49F cells.

The upregulation of $K_{Ca3.1}$ was previously described in different renal cell-culture models. These results approve a major role of this channel in the process of renal fibrosis. Regarding TRPC6, an essential function in renal fibroblasts is very likely besides its already described function in dermal and pulmonal fibroblasts. In this project, relevant currents generated by TRPM7 in NRK-49F cells could be shown for the first time. In contrast to the upregulation of this channel during the transdifferentiation in cardiac fibroblasts, there were no significant changes in TRPM7-

activity during NRK-49F transdifferentiation.

Taken together, an interaction between the investigated channels seems to influence the intracellular calcium concentration significantly. Hyperpolarisation caused by $K_{Ca}3.1$ enforces an increased calcium influx through TRPC6 and TRPM7. This again leads to enhanced activation of $K_{Ca}3.1$ channels and therefore increased production of extracellular matrix.

The therapeutical options for the treatment of renal fibrosis are limited. Due to multiple non-beneficial side-effects, upstream-inhibition of TGF- β signaling seems to be risky. Consequently, it is necessary to affect the subprocesses of renal fibrosis. The data given in this thesis contributes to enhanced understanding of the fundamental processes during renal fibrosis and reveals TRPC6 and TRPM7 as possible therapeutic targets.

7 Literaturverzeichnis

- Almirza** WH, Peters PH, van Zoelen EJ, Theuvenet AP (2012): Role of Trpc channels, Stim1 and Orai1 in PGF(2 α)-induced calcium signaling in NRK fibroblasts. *Cell Calcium*. 2012 Jan;51(1):12-21.
- Alpers** CE, Hudkins KL, Gown AM, Johnson RJ (1992): Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis. *Kidney Int* 41(5):1134-42.
- Bessac** BF, Fleig A (2007): TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol*. 582(Pt 3):1073-86.
- Bonaventure** P, Guo H, Tian B, Liu X, Bittner A, Roland B, Salunga R, Ma XJ, Kamme F, Meurers B, Bakker M, Jurzak M, Leysen JE, Erlander MG (2002): Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res*. 2002 Jul 5;943(1):38-47.
- Breyer** MD, Susztak K (2016): The next generation of therapeutics for chronic kidney disease. *Nat Rev Drug Discov* 15(8):568-88.
- Carrillo** C, Hichami A, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, del Mar Cavia M, Abdoul-Azize S, Alonso-Torre SR, Khan NA (2012): Diacylglycerol-containing oleic acid induces increases in [Ca(2+)](i) via TRPC3/6 channels in human T-cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr;1821(4):618-26.
- Cayouette** S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G (2004): Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):7241-6.
- Chen** CL, Liao JW, Hu OY, Pao LH (2016): Blockade of KCa3.1 potassium channels protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Arch Toxicol* 90(9):2249-60.
- Chen** SR, Zhang WP, Bao JM, Cheng ZB, Yin S (2016): Aristoyunnolin H attenuates extracellular matrix secretion in cardiac fibroblasts by inhibiting calcium influx. *Arch Pharm Res*. 40(1):122-130.
- Chigurupati** S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL (2010): Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):418-27.
- Chiluiza** D, Krishna S, Schumacher VA, Schlöndorff J (2013): Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem*. 2013 Jun 21;288(25):18407-20.
- Chokshi** R, Matsushita M, Kozak JA (2012): Sensitivity of TRPM7 channels to Mg²⁺ characterized in cell-free patches of Jurkat T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 302(11):C1642-51.
- Chubanov** V, Mederos y Schnitzler M, Meißner M, Schäfer S, Abstiens K, Hofmann T, Gudermann T (2012): Natural and synthetic modulators of SK (K(ca)2) potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7. *Br J Pharmacol*. 166(4):1357-76.
- Coleman** N, Brown BM, Oliván-Viguera A, Singh V, Olmstead MM, Valero MS, Köhler R, Wulff H (2014): New positive Ca²⁺-activated Kchannel gating modulators with selectivity for KCa3.1. *Mol Pharmacol* 86(3):342-57.
- Cosens** DJ, Manning A (1969): Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature* 224(5216):285-7.
- Crottès** D, Félix R, Meley D, Chadet S, Herr F, Audiger C, Soriani O, Vandier C, Roger S, Angoulvant D, Velge-Roussel F (2016): Immature human dendritic cells enhance their migration through KCa3.1 channel activation. *Cell Calcium* 59(4):198-207.
- Darby** IA, Hewitson TD (2007): Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257:143-179.
- Davis** J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD (2012): A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell*. 2012 Oct 16;23(4):705-15.

- de Roos AD**, Willems PH, Peters PH, van Zoelen EJ, Theuvenet AP (1997): Synchronized calcium spiking resulting from spontaneous calcium action potentials in monolayers of NRK fibroblasts. *Cell Calcium*. 1997 Sep;22(3):195-207.
- Demeuse P**, Penner R, Fleig A (2006): TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *J Gen Physiol*. 127(4):421-34.
- Dernison MM**, Almirza WH, Kusters JM, van Meerwijk WP, Gielen CC, van Zoelen EJ, Theuvenet AP (2010): Growth-dependent modulation of capacitative calcium entry in normal rat kidney fibroblasts. *Cell Signal*. 2010 Jul;22(7):1044-53.
- Desai BN**, Krapivinsky G, Navarro B, Krapivinsky L, Carter BC, Febvay S, Delling M, Penumaka A, Ramsey IS, Manasian Y, Clapham DE (2012): Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis. *Dev Cell*. 22(6):1149-62.
- Dhemin-Duthille I**, Gautier M1, Korichneva I1, Ouadid-Ahidouch H1 (2014): TRPM7 involvement in cancer: a potential prognostic factor. *Magnes Res*. 2014 Jul-Sep;27(3):103-12.
- Dietrich A**, Gudermann T (2011): TRP channels in the cardiopulmonary vasculature. *Adv Exp Med Biol*. 2011;704:781-810.
- Dietrich A**, Gudermann T (2014): TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;222:157-88.
- Dietrich A**, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T (2003): N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):47842-52.
- Dong D**, Bai Y, Cai BZ (2016): Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 104:233-261.
- Du J**, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H, Fusco D, Silverman D, Liang B, Yue L (2010): TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res*. 2010 Mar 19;106(5):992-1003.
- Eckel J**, Lavin PJ, Finch EA, Mukerji N, Burch J, Gbadegesin R, Wu G, Bowling B, Byrd A, Hall G, Sparks M, Zhang ZS, Homstad A, Barisoni L, Birbaumer L, Rosenberg P, Winn MP (2011): TRPC6 enhances angiotensin II-induced albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):526-35.
- Estacion M**, Sinkins WG, Jones SW, Applegate MA, Schilling WP (2006): Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca²⁺ permeability. *J Physiol*. 2006 Apr 15;572(Pt 2):359-77.
- Fang L**, Huang C2, Meng X2, Wu B2, Ma T2, Liu X2, Zhu Q2, Zhan S3, Li J4 (2014): TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Oct 15;280(2):335-44.
- Finney-Hayward TK**, Popa MO, Bahra P, Li S, Poll CT, Gosling M, Nicholson AG, Russell RE, Kon OM, Jarai G, Westwick J, Barnes PJ, Donnelly LE (2010): Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Sep;43(3):296-304.
- Foller M**, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM (2008): TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(1-3):183-92.
- Fu RG**, Zhang T, Wang L, Du Y, Jia LN, Hou JJ, Yao GL, Liu XD, Zhang L, Chen L, Gui BS, Xue RL (2014): Inhibition of the K⁺ channel K(Ca)_{3.1} reduces TGF- β 1-induced premature senescence, myofibroblast phenotype transition and proliferation of mesangial cells. *PLoS One* 9(1):e87410.
- Fuchs B**, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N (2011): Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir Res*. 2011 Feb 4;12:20.
- Fujiwara Y**, Minor DL Jr (2008): X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol* 383(4):854-70.

- Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida C, Aoki M, Hosono M, Kitagawa M, Hishida A (2004):** Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling. *KidneyInt* 65(1): 63-74 .
- Gardos G. (1958):** The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30: 653-654.
- Ge R, Tai Y, Sun Y, Zhou K, Yang S, Cheng T, Zou Q, Shen F, Wang Y (2009):** Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett.* 2009 Sep 28;283(1):43-51.
- Gibon J, Tu P, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2011):** The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Dec;1808(12):2807-18.
- Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A (2016):** The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int.* 2016 Feb 12;113(6):85-91.
- Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD (2012):** The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 27(2):183-93.
- Grgic I, Kiss E, Kaistha BP, Busch C, Kloss M, Sautter J, Müller A, Kaistha A, Schmidt C, Raman G, Wulff H, Strutz F, Gröne HJ, Köhler R, Hoyer J (2009):** Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of KCa3.1 potassium channels. *PNAS* 106(34):14518-23.
- Gudermann T, Hofmann T, Mederos y Schnitzler M, Dietrich A (2004):** Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp.* 2004;258:103-18; discussion 118-22, 155-9, 263-6.
- Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Hiani YE, Haren N, Khorsi H, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H (2008):** Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2008 May 2;8:125.
- Guo JL, Yu Y, Jia YY, Ma YZ, Zhang BY, Liu PQ, Chen SR, Jiang JM (2014):** Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) contributes to H₂O₂-induced cardiac fibrosis via mediating Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(2):184-92.
- Harteneck C, Klose C, Krautwurst D (2011):** Synthetic modulators of TRP channel activity. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:87-106.
- Hewitson TD (2012):** Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012 Jun 6;5(Suppl 1):S14.
- Hewitson TD, Becker GJ (1995):** Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 15(2):111-7.
- Hewitson TD, Darby IA, Bisucci T, Jones CL, Becker GJ (1998):** Evolution of tubulointerstitial fibrosis in experimental renal infection and scarring. *J Am Soc Nephrol* 9(4):632-42.
- Hofmann K, Fiedler S1, Vierkotten S2, Weber J1, Klee S2, Jia J3, Zwickenpflug W1, Flockerzi V4, Storch U1, Yildirim AÖ3, Gudermann T1, Königshoff M2, Dietrich A5 (2017):** Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017 Feb;1863(2):560-568.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999):** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):259-63.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002):** Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 28;99(11):7461-6.
- Hofmann T, Schäfer S, Linseisen M, Sytik L, Gudermann T, Chubanov V (2014):** Activation of TRPM7 channels by small molecules under physiological conditions. *Pflugers Arch.* 466(12):2177-89.

- Hsu** YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ (2007): TRP channels in kidney disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):928-36.
- Huang** C, Pollock CA, Chen XM (2015): KCa3.1: a new player in progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Jan;24(1):61-6.
- Huang** C, Shen S, Ma Q, Gill A, Pollock CA, Chen XM (2014): KCa3.1 mediates activation of fibroblasts in diabetic renal interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Feb;29(2):313-24.
- Huber** TB, Schermer B, Benzing T (2007): Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;106(2):e27-31.
- Inoue** K, Branigan D, Xiong ZG (2010): Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem*. 2010 Mar 5;285(10):7430-9.
- Jardin** I, Gómez LJ, Salido GM, Rosado JA (2009): Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca²⁺ entry pathways. *Biochem J*. 2009 May 13;420(2):267-76.
- Jha** V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW (2013): Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 382(9888):260-72.
- Jung** S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2002): TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Feb;282(2):C347-59.
- Kerschbaum** HH, Kozak JA, Cahalan MD (2003): Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores. *Biophys J*. 84(4):2293-305.
- Kessler** D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B (2001): Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem* 276(39): 36575-85.
- Kim** JY, Saffen D (2005): Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):32035-47.
- Kini** V, Chavez A, Mehta D (2010): A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca²⁺ entry, endothelial permeability, and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2010 Oct 22;285(43):33082-91.
- Knapp** S (2016): miRNAs in kidney fibroblasts. Masterarbeit AG Hoyer, nephrologische Klinik Marburg.
- Köhler** R, Oliván-Viguera A, Wulff H (2016): Endothelial Small- and Intermediate-Conductance K Channels and Endothelium-Dependent Hyperpolarization as Drug Targets in Cardiovascular Disease. *Adv Pharmacol* 77:65-104.
- Kopp** JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Böttinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS (1996): Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab. Invest* 74(6): 991-1003.
- Kozak** JA Kerschbaum HH, Cahalan MD (2002): Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol*. 120(2):221-35.
- Kunert-Keil** C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H. (2006): Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics*. Jun 20;7:159.
- Kurahara** LH, Sumiyoshi M, Aoyagi K, Hiraishi K, Nakajima K, Nakagawa M, Hu Y, Inoue R (2015): Intestinal myofibroblast TRPC6 channel may contribute to stenotic fibrosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Mar;21(3):496-506.
- Kwon** Y, Hofmann T, Montell C (2007): Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell*. 2007 Feb 23;25(4):491-503.

- LeBleu** VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013): Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Med.* 19(8):1047-53.
- Leuner** K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007): Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* 2007 Dec;21(14):4101-11.
- Li** M, Jiang J, Yue L (2006): Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol.* 127(5):525-37.
- Liu** M1,2, Ning X3, Li R1, Yang Z1,2, Yang X1,2, Sun S1, Qian Q4 (2017): Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2017 Jul;21(7):1248-1259.
- Loboda** A, Sobczak M, Jozkowicz A, Dulak J (2016): TGF- β 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. *Mediators Inflamm* 2016: 8319283.
- Louvet** L, Büchel J, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Massy ZA (2013): Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Apr;28(4):869-78.
- Lovisa** S, Zeisberg M, Kalluri R (2016): Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 27(10):681-95.
- Meng** XM1, Tang PM2, Li J1, Lan HY3 (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015 Mar 19;6:82.
- Miehe** S, Crause P, Schmidt T, Löhn M, Kleemann HW, Licher T, Dittrich W, Rütten H, Strübing C (2012): Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One.* 2012;7(4):e35393.
- Monet** M, Francoeur N, Boulay G (2012): Involvement of phosphoinositide 3-kinase and PTEN protein in mechanism of activation of TRPC6 protein in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2012 May 18;287(21):17672-81.
- Monteilh-Zoller** MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003): TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol.* 121(1):49-60.
- Montell** C, Rubin GM (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2(4):1313-23.
- Mottl** AK, Lu M, Fine CA, Weck KE (2013): A novel TRPC6 mutation in a family with podocytopathy and clinical variability. *BMC Nephrol.* 2013 May 10;14:104.
- Nadler** MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001): LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411(6837):590-5.
- Nilius** B, Owsianik G (2011): The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12(3):218.
- Oancea** E, Wolfe JT, Clapham DE (2006): Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circ Res.* 98(2):245-53.
- Olson** ER, Shamhart PE, Naugle JE, Meszaros JG (2008): Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 51(3):704-11.
- Paravicini** TM, Chubanov V, Gudermann T (2012): TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Aug;44(8):1381-4.
- Parekh** AB, Putney JW Jr (2005): Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):757-810.

- Park S**, Lee S2, Park EJ1, Kang M1, So I3, Jeon JH4, Chun JN5 (2017): TGF β 1 induces stress fiber formation through upregulation of TRPC6 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):129-134.
- Penna A**, Stutzin A (2015): KCa3.1-Dependent Hyperpolarization Enhances Intracellular Ca²⁺ Signaling Induced by fMLF in Differentiated U937 Cells. *PLoS One* 10(9):e0139243.
- Prakriya M**, Lewis RS (2002): Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol*. 119(5):487-507.
- Qin X**, Yue Z, Sun B, Yang W, Xie J, Ni E, Feng Y, Mahmood R, Zhang Y, Yue L (2013): Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *Br J Pharmacol*. 168(6):1294-312.
- Runnels LW**, Yue L, Clapham DE (2002): The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol*. 4(5):329-36.
- Ryazanova LV**, Dorovkov MV, Ansari A, Ryazanov AG (2004): Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* 279(5):3708-16.
- Ryazanova LV**, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, Mazur A, Fleig A, Ryazanov AG (2010): TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. *Nat Commun*. 2010 Nov 2;1:109.
- Saliba Y**, Karam R1, Smayra V2, Aftimos G3, Abramowitz J4, Birnbaumer L4, Farès N5 (2015): Evidence of a Role for Fibroblast Transient Receptor Potential Canonical 3 Ca²⁺ Channel in Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Aug;26(8):1855-76.
- Sankaranarayanan A**, Raman G, Busch C, Schultz T, Zimin PI, Hoyer J, Köhler R, Wulff H (2009): Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa2 and KCa3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. *Mol Pharmacol* 75(2):281-95.
- Schaefer M** (2005): Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* ;451(1):35-42.
- Schlingmann KP**, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. (2002): Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*. 31(2):166-70. Epub 2002 May 28.
- Schmitz C**, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kuroski T, Fleig A, Scharenberg AM (2003): Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*. 114(2):191-200.
- Sharma K**, Ix JH, Mathew AV, Cho M, Pflueger A, Dunn SR, Francos B, Sharma S, Falkner B, McGowan TA, Donohue M, Ramachandrarao S, Xu R, Fervenza FC, Kopp JB (2011): Pirfenidone for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun;22(6):1144-51.
- Shi J**, Geshi N, Takahashi S, Kiyonaka S, Ichikawa J, Hu Y, Mori Y, Ito Y, Inoue R (2013): Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Physiol*. 2013 Jun 1;591(11):2851-66.
- Soboloff J**, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL (2005): Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):39786-94.
- Sontia B**, Montezano AC, Paravicini T, Tabet F, Touyz RM (2008): Downregulation of renal TRPM7 and increased inflammation and fibrosis in aldosterone-infused mice: effects of magnesium. *Hypertension*. 2008 Apr;51(4):915-21.
- Staa S**, Franck MC, Marmigère F, Mattsson JP, Ernfors P (2010): Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expr Patterns* 10(1):65-74.

- Strübing C**, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003): Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):39014-9.
- Su LT**, Liu W, Chen HC, González-Pagán O, Habas R, Runnels LW (2011): TRPM7 regulates polarized cell movements. *Biochem J*. 2011 Mar 15;434(3):513-21.
- Sun YB**, Qu X, Caruana G, Li J (2016): The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation* 92(3):102-107 .
- Tseveleki V**, Rubio R, Vamvakas SS, White J, Taoufik E, Petit E, Quackenbush J, Probert L (2010): Comparative gene expression analysis in mouse models for multiple sclerosis, Alzheimer's disease and stroke for identifying commonly regulated and disease-specific gene changes. *Genomics*. 2010 Aug;96(2):82-91.
- Urban N**, Hill K, Wang L, Kuebler WM, Schaefer M (2012): Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell Calcium*. 2012 Feb;51(2):194-206.
- Urban N**, Wang L1, Kwiek S1, Rademann J1, Kuebler WM1, Schaefer M2 (2016): Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Mol Pharmacol*. 2016 Jan;89(1):197-213.
- Vriens J**, Nilius B, Vennekens R (2008): Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacol* 6(1):79-96.
- Wang LP**, Fan SJ, Li SM, Wang XJ, Gao J, Yang XH (2016): Protective role of ACE2-Ang-(1-7)-Mas in myocardial fibrosis by downregulating KCa3.1 channel via ERK1/2 pathway. *Pflugers Arch*;468(11-12):2041-2051.
- Wang Y**, Yue D, Li K, Liu YL, Ren CS, Wang P (2010): The role of TRPC6 in HGF-induced cell proliferation of human prostate cancer DU145 and PC3 cells. *Asian J Androl*. 2010 Nov;12(6):841-52.
- Wes PD**, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995): TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 10;92(21):9652-6.
- Wu YL**, Xie J2, An SW2, Oliver N3, Barrezueta NX3, Lin MH4, Birnbaumer L5, Huang CL6 (2017): Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int*. 2017 Apr;91(4):830-841.
- Wulff H**, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001): Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276(34):32040-5.
- Xu T**, Wu BM, Yao HW, Meng XM, Huang C, Ni MM, Li J (2015): Novel Insights Into TRPM7 Function in Fibrotic Diseases:A Potential Therapeutic Target. *J. Cell. Physiol* 230(6):1163-9.
- Yi Y**, Ma J, Jianrao L, Wang H, Zhao Y (2018): WISP3 prevents fibroblast-myofibroblast transdifferentiation in NRK-49F cells. *Biomed Pharmacother* 99:306-312.
- Yu M**, Huang C, Huang Y, Wu X, Li X, Li J (2013): Inhibition of TRPM7 channels prevents proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. *Inflamm Res*. 2013 Nov;62(11):961-70.
- Zhang B**, Jiang J, Yue Z, Liu S, Ma Y, Yu N, Gao Y, Sun S, Chen S, Liu P (2016): Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) contributes to angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci*. 132(3):171-180.
- Zhang SS**, Wen J, Yang F, Cai XL, Yang H, Luo KJ, Liu QW, Hu RG, Xie X, Huang QY, Chen JY, Fu JH, Hu Y (2013): High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2013;30(3):607.
- Zhou J**, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, Ding Y, Wang Y (2008): Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci*. 2008 Jul;11(7):741-3.
- Zierler S**, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Pörzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A (2011): Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *J Biol Chem*. 286(45):39328-35.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die im Folgenden aufgeführten Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Baumann, Becker, Bette, Braun, Brehm, Bücking, Cetin, Czubayko, Daniel, Daut, Decher, del Rey, Dodel, Eberhart, Eickmann, Eisoldt, Feuser, Fritz, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Höffken, Homberg, Hoyer, Kann, Kinscherf, Kircher, Köhler, König, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Maier, Mandic, Meissner, Moll, Morin, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pankuweit, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Roelcke, Rost, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schratt, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Stuck, Timmesfeld, Vassiliou, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf und Zemlin.

8.2 Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich die Gelegenheit nutzen und allen Menschen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben, meinen Dank aussprechen. Im folgenden sei nur ein kleiner Teil dieser Personen namentlich genannt.

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Hoyer für die großzügige Bereitstellung des interessanten Themas, der benötigten Mittel und Gerätschaften. Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Ivica Grgic danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge sowie die Betreuung, die erst zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für das mir entgegen gebrachte Vertrauen in meine Person und meine Arbeit sage ich herzlichen Dank.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. med. Thomas Hofmann für die spannende Einführung in die Welt der Elektrophysiologie. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Andreas Hofmeister und Frau Sabrina Markert für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die Einarbeitung in die Thematik und die verschiedenen Methodiken. Mein Dank gebührt ebenso Dr. Sybelle Goedicke-Fritz für Ihre umfangreiche Hilfestellung bei jeglichen Problemen beim Experimentieren. Darüber hinaus danke ich meinen Mitdoktoranden Herrn Maximilian Thomaßen und Frau Lisa Görg-Reifenberg für die netten Momente während unserer gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Partnerin Lisa, meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung sowie Ratschläge bedanken, die jederzeit zuverlässige Ansprechpartner bei allen nicht-wissenschaftlichen Problemen waren und sind.