

Untersuchung Ca^{2+} -aktivierter Ionenkanäle in Epithelien des Auges

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susanne Keckeis
aus Waren (Müritz)

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2013 bis August 2017 in der Experimentellen Ophthalmologie der Charité Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Strauß angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Olaf Strauß
Abteilung Augenheilkunde
Charité Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Koch
Institut für Biologie
Freie Universität Berlin

Disputation am: 12.12.2017

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“

Enrico Fermi (1901-1954)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	VI
Zusammenfassung.....	IX
Summary	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Linse.....	3
1.1.1 Anatomie und Physiologie der Linse	3
1.1.2 Ionenregulation (Na^+ , K^+ , Cl^-) in der Linse.....	6
1.1.3 Ca^{2+} -Regulierung in der Linse	7
1.1.4 Katarakt	9
1.1.5 Ionenhomöostase und Katarakt	10
1.1.6 Einfluss kataraktogener Faktoren.....	12
1.1.6.1 Oxidativer Stress.....	12
1.1.6.2 Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF β)	13
1.2 Ca^{2+} -aktivierte Kationenkanäle	14
1.2.1 K_{Ca} -Kanäle	15
1.2.2 Ca^{2+} -abhängige TRP-Kanäle.....	17
1.3 Das retinale Pigmentepithel.....	19
1.3.1 Aufbau des RPE	19
1.3.2 Funktionen des RPE.....	20
1.3.3 Funktionen der Cl^- -Kanäle und assoziierte Erkrankungen im RPE	26
1.3.4 Der CaCC im RPE.....	27
1.4 Anoctamine.....	28
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	31
2. Material und Methoden.....	32
2.1 Chemikalien und Reagenzien	32
2.2 Herstellung von Lösungen und Puffern.....	32
2.2.1 PCR	32
2.2.2 Western Blot.....	32
2.2.3 Immunzytochemie.....	33
2.2.4 Patch-Clamp-Versuche.....	34
2.3 Zelllinien.....	35

2.4	Gewebepräparation, Zellkultur und Transfektion	35
2.4.1	Allgemeines.....	35
2.4.2	Passagieren von Zellen.....	35
2.4.3	Gewinnung und Kultivierung primärer Maus-RPE-Zellen	36
2.4.4	Gewinnung und Kultivierung von Linsenepithelzellen aus kindlichen Vorderkapseln	36
2.4.5	Kultivierung von Zelllinien	36
2.4.6	Stimulierung mit TGF β 2	36
2.4.7	siRNA-Transfektion	37
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.5.1	RNA-Isolierung.....	38
2.5.2	Reverse Transkription der RNA.....	38
2.5.3	Primer	38
2.5.4	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
2.5.5	Agarosegelelektrophorese	40
2.5.6	SYBR Green-basierte quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).	40
2.5.7	TaqMan-basierte qPCR.....	41
2.5.8	Auswertung der Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung	41
2.6	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	42
2.6.1	Gewinnung der Proteinlysate	42
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.6.3	Western Blot und Immunodetektion	43
2.6.4	Immunzytochemie	44
2.7	Elektrophysiologie.....	45
2.7.1	Patch-Clamp-Technik.....	45
2.7.1.1	Entwicklung der Patch-Clamp-Technik	45
2.7.1.2	Grundlagen und Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik	45
2.7.1.3	Messplatzaufbau	48
2.7.1.4	Versuchsdurchführung.....	50
2.7.1.5	Spannungsprotokolle	53
2.7.1.6	Lösungen	54
2.7.1.7	Pharmakologische Modulatoren	55
2.7.1.8	Auswertung und Analyse der Messdaten	56
2.7.2	Calcium-Imaging.....	59

2.7.2.1	Messprinzip und Fura-2.....	59
2.7.2.2	Versuchsdurchführung.....	60
2.7.2.3	Auswertung.....	60
2.8	Statistik.....	61
3.	Ergebnisse.....	62
3.1	Ionomycin-induzierte Leitfähigkeiten von humanen Linsene- pithelzellen unter K ⁺ -haltigen Bedingungen.....	62
3.1.1	Leitfähigkeit von HLE B-3 Zellen unter K ⁺ -haltigen Bedingungen.....	62
3.1.2	K ⁺ -Leitfähigkeit primärer Linsene- pithelzellen.....	64
3.1.3	Effekt von TGFβ2 auf K ⁺ -Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen.....	67
3.2	Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in humanen Linsene- pithelzellen unter Ausschluss von K ⁺ -Strömen.....	71
3.2.1	Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen unter Ausschluss von K ⁺ -Strömen.....	72
3.2.2	Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in primären Linsene- pithelzellen unter K ⁺ -freien Bedingungen.....	74
3.2.3	Ionomycin-induzierte Ströme in Lösungen mit asymmetrischen Konzentrationen monovalenter Kationen.....	75
3.2.4	Genexpression verschiedener Ca ²⁺ -aktivierter nicht selektiver Kationenkanäle.....	78
3.2.5	Pharmakologische Charakterisierung der Ionomycin-induzierten Ströme.....	80
3.2.6	H ₂ O ₂ -induzierte Leitfähigkeit in humanen Linsene- pithelzellen unter K ⁺ -freien Bedingungen.....	90
3.2.7	Proteinexpression und Lokalisation von TRPM2 in Linsene- pithelzellen.....	92
3.2.8	Einfluss von TGFβ2 auf TRPM2 in HLE B-3 Zellen.....	95
3.3	Untersuchung eines CaCCs in RPE-Zellen.....	97
3.3.1	Effekt von ATP auf freies zytosolisches Ca ²⁺ und Ca ²⁺ -abhängige Leitfähigkeiten.....	97
3.3.2	Reaktion der ATP-induzierten Leitfähigkeiten auf Cl ⁻ -Kanalinh- bitoren.....	102
3.3.3	Genexpression von Ano2 im RPE.....	107
3.3.4	Herunterregulierung von Ano2 in ARPE-19 Zellen.....	108
3.3.5	ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit von ARPE-19 Zellen in Perforated-Patch- Versuchen.....	110
3.3.6	ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit in primären RPE-Zellen der Maus.....	113
3.4	Hitze- und Cannabidiol-aktivierte Ionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen.....	118
4.	Diskussion.....	120
4.1	Ca ²⁺ -aktivierte Kationenkanäle in humanen Linsene- pithelzellen.....	120

4.1.1	Veränderte K ⁺ -Leitfähigkeit in immortalisierten Linsene­pithelzellen.....	121
4.1.2	Funktionelle Expression von Maxi-K-Kanälen in HLE B-3 Zellen durch TGFβ2	122
4.1.2.1	Mögliche Bedeutung einer vermehrten Maxi-K-Expression.....	124
4.1.3	Induzierung eines Ca ²⁺ -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals in humanen Linsene­pithelzellen.....	125
4.1.4	Genexpression verschiedener Ca ²⁺ -aktivierter nicht-selektiver Kanäle in humanen Linsene­pithelzellen	126
4.1.5	Biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften des Ca ²⁺ -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals in humanen Linsene­pithelzellen	127
4.1.6	TRPM2-charakteristische Aktivierung des Ca ²⁺ -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals durch H ₂ O ₂	130
4.1.7	Endogene Expression und Lokalisation von TRPM2 in Linsene­pithelzellen..	131
4.1.8	Mögliche physiologische Rolle von TRPM2 im Linsene­pithel	131
4.1.9	Mögliche Rolle von TRPM2 bei der ROS-bedingten Kataraktogenese	132
4.1.10	Erhöhte TRPM2-Expression und Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen durch TGFβ2	134
4.2	Ano2 im RPE.....	136
4.2.1	Aktivierung einer Anionenleitfähigkeit durch ATP in ARPE-19 Zellen.....	136
4.2.2	Endogene Ano2-Expression im RPE	140
4.2.3	Reduzierte Anionenleitfähigkeit durch Herunterregulierung von Ano2.....	141
4.2.4	Ano2-Strom in ARPE-19 Zellen unter physiologischen intrazellulären Bedingungen.....	142
4.2.5	Ano2-artige Anionenleitfähigkeit im nativen RPE	143
4.2.6	Ano2 als einer von verschiedenen Cl ⁻ -Kanälen im RPE.....	145
4.3	Expression von TRPV2 in ARPE-19 Zellen und seine Rolle im RPE.....	146
4.4	Fazit	150
4.5	Weiterer Forschungsbedarf.....	151
5.	Literaturverzeichnis	153
6.	Publikationen	183
7.	Danksagung.....	184
8.	Anhang.....	185
8.1	Pharmakologisches Profil des untersuchten Kationenkanals in Linsene­pithelzellen....	185
8.2	Sensitivität von Ano2 gegenüber T16A _{inh} -A01.....	187
8.2.1	Material und Methoden:	187

8.2.2	Ergebnisse und Interpretation.....	188
8.3	Effizienz der Ano2-siRNA-Transfektion	190
8.3.1	Material und Methoden	190
8.3.2	Ergebnisse	191

Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AD/DA	Analog-Digital/Digital-Analog
ADPR	Adenosindiphosphatribose
Ano	Anoctamin (auch TMEM16), z.B. Anoctamin-2 (Ano2)
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
Best1	Bestrophin-1
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVMD	Best'sche Vitelliforme Makuladystrophie; Morbus Best
Bzw.	beziehungsweise
CaCC	Ca ²⁺ -aktivierter Cl ⁻ -Kanal; Ca ²⁺ -activated Cl ⁻ channel
cADPR	cyclische Adenosindiphosphatribose
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca _v	spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHO Zellen	Chinesische Hamsterovarialzellen; chinese hamster ovarian cells
ClC-2	Chloridkanal-2; <i>chloride channel-2</i>
CRALBP	<i>cellular retinaldehyde-binding protein</i>
dc-ERG	Gleichstromelektroretinogramm; <i>direct current electroretinogram</i>
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e.c.	extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
<i>et al.</i>	und andere (latein <i>et alii</i>)

FFA	Flufenaminsäure
FKS	Fetales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLUT	Glukosetransporter
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonal kidney 293 cells</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
i.c.	intrazellulär
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (engl. <i>insulin-like growth factor-1</i>)
IgG	Immunglobulin G
IK	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit
IP3	Inositol-3-Phosphat
kDa	Kilodalton
K _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal
K _{ir}	einwärts gleichrichtender (engl. <i>inward rectifier</i>)
LEDGF	engl. <i>lens epithelium derived growth factor</i>
LJP	Übergangspotential, <i>liquid junction potential</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein</i> -Kinase
Max.	maximal
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NFA	Nifluminsäure
NGF	Nervenwachstumsfaktor; (engl. <i>nerve growth factor</i>)
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
OPA	Operationsverstärker (engl. <i>operational amplifier</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	engl. <i>platelet derived growth factor</i>
PEDF	engl. <i>pigment epithelium derived factor</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PKD	engl. <i>polycystic kidney disease</i>
PMCA	Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (engl. <i>plasma membrane Ca^{2+}-ATPase</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SERCA	engl. <i>sarco-/endoplasmatic reticulum Ca^{2+}-ATPase</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SK-Kanal	Ca^{2+} -aktivierter K^{+} -Kanal mit geringer Leitfähigkeit
SOCE	engl. <i>store-operated calcium entry</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	TBS mit Tween
TGF β	transformierender Wachstumsfaktor- β (engl. <i>transforming growth factor-β</i>)
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	engl. <i>transient receptor potential</i>
TRPA	TRP <i>ankyrin</i>
TRPC	TRP <i>canonical</i>
TRPM	TRP <i>melastatin</i>
TRPML	TRP <i>mucolipin</i>
TRPP	TRP <i>polycystin</i> , auch PKD
TRPV	TRP <i>vanilloid</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula Occludens-1

Zusammenfassung

Ein kontrollierter Ionen- und Wassertransport ist essentiell für die Funktionsfähigkeit von Strukturen des Auges, von denen die Sehfähigkeit direkt abhängt: die Linse und das retinale Pigmentepithel (RPE).

In der Linse bewirkt ein Ungleichgewicht des Ionenhaushalts einen Verlust der Transparenz. Verantwortlich ist eine erhöhte Kationenpermeabilität der Epithelzellmembranen, der die Aktivierung Ca^{2+} -aktivierter Kationenkanäle zugrunde liegen könnte. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb die funktionelle Expression und molekulare Identität solcher Kanäle im humanen Linseneithel untersucht. Sowohl in primären Linseneithelzellen als auch in HLE B-3 Zellen aktivierte das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin einen nicht-selektiven Kationenkanal. Durch Analyse des Kationenkanalexpressionsmusters, der biophysikalischen Eigenschaften und des pharmakologischen Profils konnte dieser Kanal als TRPM2 identifiziert werden. Kataraktogene Faktoren steigerten die Aktivität des in der Zytoplasmamembran der Linseneithelzellen lokalisierten TRPM2: H_2O_2 aktivierte es, *transforming growth factor* (TGF)- β 2 verstärkte die Expression und den Strom von TRPM2. TRPM2 wird demnach funktionell in humanen Linseneithelzellen exprimiert, wo es maßgeblich an der Leitfähigkeit und dem Potential der Zellmembran beteiligt ist und aufgrund seiner Aktivierung durch kataraktogene Faktoren in Linsentrübungen involviert sein kann.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit dem elektrophysiologischen Verhalten des RPE. Es stellt durch einen streng kontrollierten Ionen- und Wassertransport die Integrität der Retina als neuronale Einheit des Auges sicher. Eine wichtige Rolle spielt der basolateral lokalisierte Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal (CaCC). Dieser Teil der Arbeit widmete sich der Frage, ob es sich bei dem CaCC im RPE um Anoctamin-2 (Ano2) handelt, dem er in seinen Eigenschaften ähnlich ist. In Ganzzelleableitungen wurde durch verschiedene Cl^- -Kanal-Blocker die funktionelle Expression eines CaCC in ARPE-19 Zellen und primären murinen RPE-Zellen bestätigt, wobei ATP als physiologisches Stimulanz zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} diente. Eine siRNA-Herunterregulierung der Ano2-Expression führte zu einer Reduzierung des Cl^- -Stroms. Die Studie zeigt, dass Ano2 an der Cl^- -Leitfähigkeit des RPE maßgeblich beteiligt ist.

Zusammen mit Frederik Fried und Dr. Nadine Reichhart wurde die Regulierung des Ca^{2+} -leitenden Ionenkanals TRPV2 in ARPE-19 Zellen untersucht. TRPV2-Ströme wurden durch Erhitzen der Badlösung auf 45 °C induziert. Einen deutlich stärkeren Stromanstieg

bewirkten Cannabidiol und *insulin-like growth factor* (IGF)-1 durch eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-abhängige Erhöhung der Oberflächenexpression. Somit kann eine Steigerung der TRPV2-Aktivität durch exogene Agonisten zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen und möglicherweise Ano2 aktivieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass in der Linse ein Ca^{2+} -aktivierter TRP-Kanal und im RPE Ano2 funktionell exprimiert und ihre Aktivitäten durch verschiedene, mitunter pathologische, Faktoren modifiziert werden. Dies legt den Grundstein für weitere Untersuchungen, inwieweit die beiden Kanäle in den physiologischen Ionen- und Wassertransport sowie in assoziierte pathologische Ereignisse involviert sind.

Summary

A regulated transport of ions and water is essential for ocular structures on which vision directly depends: the crystalline lens and the retinal pigment epithelium (RPE).

In the lens, an ion imbalance results in the loss of transparency caused by an increased cation permeability of epithelial cell membranes, which might be a result of the activation of Ca^{2+} -activated cation channels. Thus, in the first part of this thesis, functional expression and molecular identity of such channels were investigated. The Ca^{2+} -ionophore ionomycin activated a non-selective cation channel in both primary lens epithelial and HLE B-3 cells. By analysis of cation channel expression pattern, biophysical properties, and pharmacological profiling, the channel was identified as TRPM2. Cataractogenous factors increased the activity of TRPM2, which was localized in cytoplasm membranes of lens epithelial cells: H_2O_2 activated TRPM2; transforming growth factor (TGF)- β 2 increased the expression and current of TRPM2. Thus, TRPM2 is functionally expressed in human lens epithelial cells, where it strongly participates in the conductance and the potential of the cell membrane. Due to its activation by cataractogenous factors, TRPM2 might be involved in lens opacification.

The second part of the work dealt with the electrophysiological behavior of the RPE. By precise control of the ion and water transport, the RPE ensures integrity of the retina as neuronal component of the eye. The basolateral localized Ca^{2+} -activated Cl^- channel (CaCC) plays an important role. This part of the thesis addressed the question if the CaCC is anoctamin-2 (Ano2), which resembles the CaCC in the RPE. Whole-cell measurements and different Cl^- channel blockers confirmed functional expression of a CaCC in ARPE-19 cells and primary murine RPE cells, where ATP served as physiological stimulus in order to increase intracellular Ca^{2+} . Down-regulation of Ano2 expression by siRNA approaches decreased the Cl^- current. This study demonstrates that Ano2 participates significantly to the Cl^- conductance of the RPE.

In cooperation with Frederik Fried and Dr. Nadine Reichhart, regulation of the Ca^{2+} -conducting ion channel TRPV2 in ARPE-19 cells was examined. TRPV2 currents were induced by heating the bath solution to 45 °C. By a phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-dependent increase of surface expression, cannabidiol as well as insulin-like growth factor (IGF)-1 led to a current increase that was significantly larger than that of heating alone. Thus, enhancement of TRPV2 activity by exogenous agonists may increase intracellular Ca^{2+} concentration and possibly activate Ano2.

In summary, these studies show that a Ca^{2+} -activated TRP channel is functionally expressed in the lens, and Ano2 is functionally expressed in the RPE. In addition, it has been found that the activity of both might be modified by different, possibly pathological, factors. These results may serve as the basis for further studies, how far specifically the activity of both channels is involved in the physiological transport of ion and water, or with regard to associated pathological events.

1. Einleitung

Das Auge des Menschen setzt sich aus zwei Funktionseinheiten zusammen: Dem optischen Apparat sowie dem neuronalen System der Retina. Der dioptrische Apparat besteht aus der Kornea (Hornhaut), der Linse, dem Kammerwasser und dem Glaskörper. Er kann in seiner Funktion vereinfacht als Sammellinse betrachtet werden. Lichtstrahlen, die von beobachteten Objekten ausgehen, werden von den Elementen des dioptrischen Apparates gebrochen und als verkleinertes, umgekehrtes Bild auf die Retina projiziert. Hat das Licht die Retina erreicht, wandeln Photorezeptoren die Lichtreize in elektrische Signale um, was als Phototransduktion bezeichnet wird. Die elektrischen Signale werden von Interneuronen vorverarbeitet und an Ganglienzellen weitergeleitet, welche die Reize wiederum zur abschließenden Verarbeitung an das Gehirn weiterleiten.

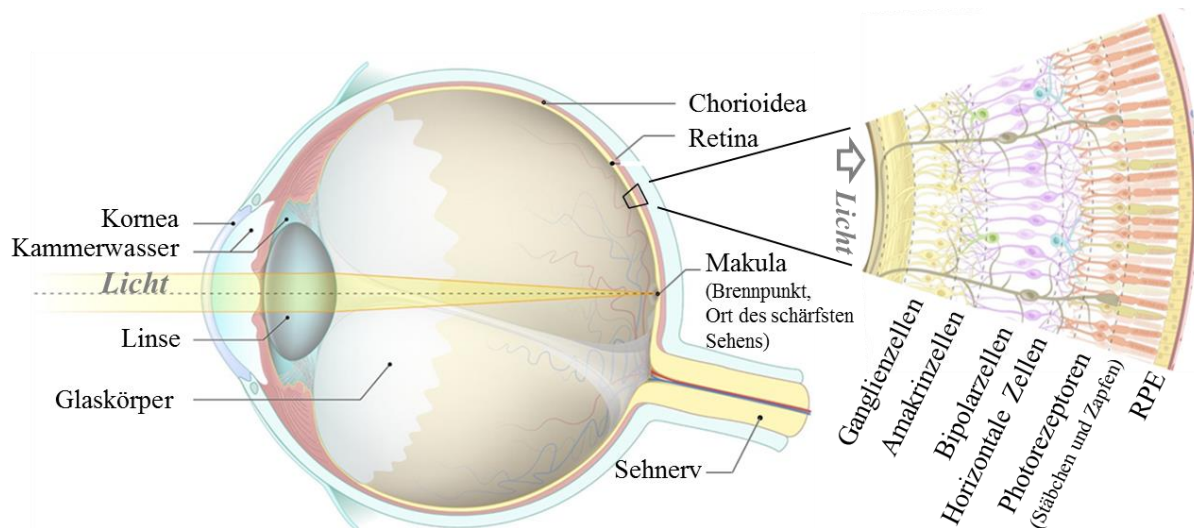


Abbildung 1.1: Lichtbrechende und -wahnehmende Abschnitte des Auges (Bildquelle: https://amboss.miamed.de/wissen/Visuelles_System, modifiziert). Im dioptrischen Apparat, bestehend aus Kornea, Kammerwasser, Linse und Glaskörper, wird das Licht gebrochen und auf die Makula der Retina fokussiert. In der Retina wird der Lichtreiz umgewandelt, vorverarbeitet und an das Gehirn weitergeleitet.

Damit das Sehvermögen nicht beeinträchtigt wird, müssen alle Elemente im dioptrischen Apparat und der Netzhaut im Besitz ihrer vollen strukturellen und funktionellen Funktionsfähigkeit sein. Hieran sind Ionenkanäle maßgeblich beteiligt. Zu ihren Aufgaben gehören die Etablierung des Membranpotentials, die Regulation des Zellvolumens, die Vermittlung von intra- und interzellulären Transportvorgängen sowie die Konstanzhaltung der intrazellulären Ionenkonzentrationen. Eine intakte Ionenhomöostase ist für viele okuläre Funktionen dabei von besonderer Bedeutung. Der kontrollierte Transport von Ionen und Wasser bedingt die Transparenz der Kornea und Linse. Er regelt die Produktion und den

Abfluss von Kammerwasser und somit den intraokulären Druck. In der Retina gewährleisten der Ionen- und Wassertransport durch das retinale Pigmentepithel (RPE) und die Müllerzellen die Integrität der Retina. Ionenkanäle sind folglich auch in Störungen der Ionenhomöostase und resultierende pathophysiologische Ereignisse im Auge involviert. Solche Ereignisse können unter anderem Kornea- und Linsentrübungen, Ödeme, Glaukome und retinale Degenerationen sein.

Zwei Strukturen im Auge sind besonders anfällig für pathophysiologische Abweichungen der Ionenhomöostase und demzufolge direkt Ursprung von einem Verlust der vollen Sehfähigkeit: die Linse und die Retina. Sowohl in der Linse als auch in der Retina ist das epitheliale Gewebe, also das Linsenepithel und das RPE, mit seiner Vielfalt an Ionenkanälen und -transportern der primäre Ort von Wasser- und Ionentransporten. Um die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge in der Linse und der Retina zu verstehen, ist es deshalb wichtig sich intensiv mit dem elektrophysiologischen Verhalten und der Identifizierung und konkreten Beteiligung von Ionenkanälen des Linsenepithels und des RPE zu befassen.

Im Jahr 1976 legten Neher und Sakmann den Grundstein für solche elektrophysiologischen Untersuchungen. Sie entwickelten die Patch-Clamp-Technik, die seit 1981 durch Hamill *et al.* auch zur breiten Anwendung nutzbar war. Diese Technik stellte eine ungemeine Bereicherung für die biologische und medizinische Forschung dar, weshalb Neher und Sakmann 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden. Durch die Patch-Clamp-Technik wurde es möglich, grundsätzlich neue physiologische Zusammenhänge zu verstehen und Pathomechanismen von Erkrankungen zu erforschen, die auf der Funktion beziehungsweise Fehlfunktion von Ionenkanälen beruhen. Sie ermöglichte die biophysikalische und pharmakologische Charakterisierung sowie die Erstellung einer Struktur/Funktionskorrelation von Ionenkanälen und ihre molekulare Identifizierung. Man konnte nun gezielt Toxine analysieren und pharmakologische Substanzen entwickeln, welche die Aktivität von Ionenkanälen modulieren und zur Erforschung und Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden können.

Im RPE konnten mithilfe der Patch-Clamp-Technik und anderer elektrophysiologischer Untersuchungen bereits einige Komponenten des Wasser- und Ionentransportsystems sowie ihre Funktionen identifiziert werden. Die Linse ist diesbezüglich weitaus schlechter erforscht. Wenngleich allgemeine Mechanismen der Ionenregulierung aufgeklärt wurden, gibt es kaum Kenntnisse über die molekulare Identität beteiligter Ionenkanäle oder ihre Bedeutung bei pathologischen Ereignissen.

1.1 Die Linse

1.1.1 Anatomie und Physiologie der Linse

Als Teil des dioptrischen Apparates ist es die Aufgabe der Linse Licht auf die Retina zu fokussieren. Hierbei fängt sie zum Schutz der Retina Ultraviolett (UV)-Strahlung ab. Zusätzlich ist sie fähig zur Anpassung der Brechkraft, was man als Akkommodation bezeichnet. Diese Aufgaben bewältigt die Linse aufgrund ihres strukturellen und funktionellen Aufbaus.

Die Linse ist ein transparentes, avaskuläres und flexibles Organ, das frei von Nerven ist. Sie besitzt eine bikonvexe Form mit einer konvexen Hinterfläche und einer abgeflachten Vorderfläche. Sie ist in der hinteren Augenkammer gelegen. Mit ihrem vorderen Pol grenzt die Linse direkt an die Pupille, mit ihrem hinteren Pol an den Glaskörper. Am Linsenäquator ist sie über die Zonulafasern mit dem Ziliarmuskel verbunden, über den die Brechkraft der Linse und somit des gesamten dioptrischen Apparates variiert werden kann. Sie wird allseits von Kammerwasser umspült und ernährt (Yanoff & Duker, 2009).

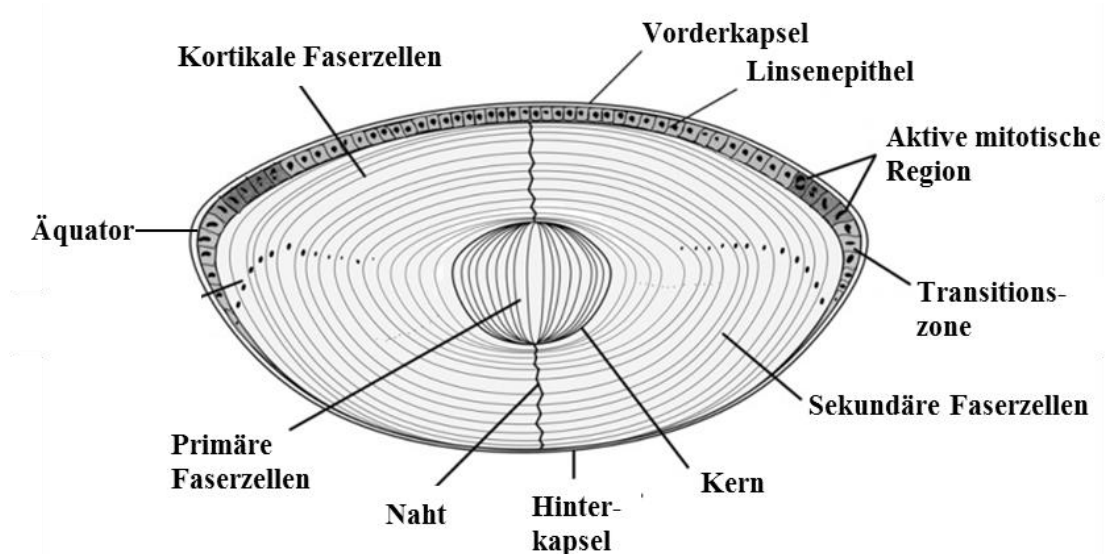


Abbildung 1.2: Anatomischer Aufbau der Linse (modifiziert nach Sharma & Santhoshkumar, 2009).

Die gesamte Linse ist von einer elastischen, aber mechanisch sehr robusten Basalmembran umgeben, die größtenteils aus Kollagen besteht und als Linsenkapsel oder Kapselsack bezeichnet wird. Der Linsenkapsel haftet auf der Linsenvorderseite, also vom vorderen Linsenpol bis hin zum Linsenäquator, das Linsenepithel an, an welches sich die dichte Zellmasse der langgestreckten Linsenfaserzellen anschließt. Das Linsenepithel besteht aus einer einzelnen Schicht kubischer, polarer Linsenepithelzellen. Von ihnen geht das lebenslange Wachstum der Linse aus. Während sich die zentralen Epithelzellen am vorderen

Linsenpol im Ruhezustand befinden, besitzen die Epithelzellen in der prääquatorialen, germinativen Zone eine gewisse Proliferationsrate. Sie migrieren von hier aus in die äquatoriale Transitionszone, wo die Differenzierung zu Linsenfaserzellen beginnt. Die sich differenzierenden Faserzellen strecken sich in die Länge, bis sie an den Polen auf die gestreckten Zellen der entgegengesetzten Linsenseite treffen, wo sie die Linsennaht bilden. So werden wie die Jahresringe eines Baumes ein Leben lang neue Schichten Linsenfaserzellen auf die bereits bestehenden Schichten aufgelagert. Der innere Bereich, der Linsenkern, besteht aus den ältesten, vollständig ausdifferenzierten („reife“) Linsenfaserzellen. Der äußere Bereich, die Linsenrinde oder der sogenannte Kortex, enthält die jüngeren Faserzellen, die sich mitunter noch im Differenzierungsprozess befinden. Ihre flache, hexagonale Form ermöglicht eine dichte, regelmäßige Anordnung mit interzellulären Räumen, die kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind. Die sich differenzierenden Faserzellen akkumulieren lösliche zytoplasmatische Proteine, die Kristalline, und verlieren Zellorganellen wie Nukleus, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Diese Prozesse sind unabdingbar, um die Transparenz und den hohen Refraktionsindex der Linse zu ermöglichen. Mit dem Verlust ihrer Zellorganellen und des Zellkerns verlieren die reifen Linsenfaserzellen nicht nur die Fähigkeit zur Mitose, sondern ebenfalls die Fähigkeit der metabolischen Aktivität. Lediglich den peripheren äußersten, also sich frisch differenzierenden Linsenfaserzellen verbleibt eine Restaktivität. Die Aufrechterhaltung der zur Transparenz notwendigen Homöostase der Linse ist deshalb überwiegend Aufgabe der Linsenepithelzellen, die den metabolisch aktiven Zelltyp in der Linse darstellen. Sie besitzen eine Vielzahl von Ionentransportern und -kanälen, die den reifen Linsenfaserzellen weitestgehend abhandengekommen sind. Dies ermöglicht den Epithelzellen die Aufrechterhaltung der lentikulären Wasser- und Ionenhomöostase sowie die Versorgung der Linsenfaserzellen mit Nährstoffen und Antioxidantien trotz einer fehlenden Blutversorgung (Mathias *et al.*, 1997, 2007; Kaufman *et al.*, 2011).

Die Integrität und das Überleben der Faserzellen und die Transparenz der Linse sind somit abhängig von der einwandfreien Funktion der Epithelzellen und der interzellulären Kommunikation. Um diese Aufgabe zu bewältigen und das Fehlen eines Blutstroms zu kompensieren, besitzt die Linse ein internes Mikrozirkulationssystem (Mathias *et al.*, 2007; Berthoud *et al.*, 2014). Als Antriebskraft dient die Differenz des elektromotorischen Potentials der über Gap Junctions elektrisch miteinander gekoppelten Oberflächenzellen und inneren Faserzellen, die durch die unterschiedlichen Membraneigenschaften der Zellen bedingt ist. Die inneren Faserzellen besitzen vorrangig eine Basisleitfähigkeit für Cl^- - und Na^+ -Ionen. Die Epithelzellen und frisch differenzierenden Faserzellen exprimieren zusätzlich

1.1.2 Ionenregulation (Na^+ , K^+ , Cl^-) in der Linse

Die Differenzierung der Linsenepithel- zu Linsenfaserzellen besteht in der Reifung einer physiologisch-funktionellen Proteinzusammensetzung und -expression. Diese betrifft auch Ionenkanäle und Ionentransporter, wobei es mit fortschreitender Differenzierung insbesondere zu einem Verlust ebendieser kommt. Folglich unterscheiden sich Epithel- und Faserzellen bezüglich ihrer Leitfähigkeit für verschiedene Ionen. Dies ist die Grundlage des lentikulären Mikrozirkulationssystems.

Das Linsenepithel ist reich an Ionentransportern und -kanälen. Die hohe Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, die den Faserzellen verloren geht, ist, wie bereits beschrieben, durch die Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten der Motor für die Mikrozirkulation und somit den funktionierenden Stoffwechsel der Linse. Sie generiert eine hohe intrazelluläre K^+ , aber eine niedrige intrazelluläre Na^+ -Konzentration. Sowohl Linsenfaser- als auch Linsenepithelzellen besitzen eine geringe Na^+ -Leitfähigkeit, die durch die große Masse an Faserzellen zu einem hauptsächlichem Einstrom von Na^+ in diese Zellen führt und für die Ionen-zirkulation essentiell ist (Mathias *et al.*, 2007). Bislang ist unbekannt, über welchen Na^+ -leitenden Kanal die Aufnahme von Na^+ in die Linsenzellen zustande kommt. Es scheint sich allerdings um einen Ionenkanal zu handeln, der durch das Entfernen von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Milieu stimuliert wird und mechanosensitiv ist (Cooper *et al.*, 1986; Rae *et al.*, 1992). Mögliche Kandidaten sind Hemikanäle, die aus Connexinen zusammengesetzt sind (Bao *et al.*, 2004; Beyer & Berthoud, 2014). Linsenepithelzellen exprimieren Connexin-43 und -50, Linsenfaserzellen Connexin-46 und -50. Die Connexine bilden auch die lentikulären Gap Junctions und vermitteln als solche den interzellulären Transport (Beyer & Berthoud, 2014). Ferner wurde ein Tetrodotoxin-sensitiver Na^+ -Kanal beschrieben, aber nicht auf molekularer Ebene *in vivo* verifiziert (Cooper *et al.*; Akaike & Okajima, 1982; Watsky *et al.*, 1991). Auf weitere nicht-selektive Kationenkanäle, die jedoch eher in einen Zusammenhang mit Ca^{2+} -Signalen gebracht werden, wird später eingegangen.

Die Linsenepithelzellen besitzen eine hohe K^+ -Leitfähigkeit, die den Linsenfaserzellen im Verlauf des Differenzierungsprozesses verloren geht. Dadurch gelangen K^+ -Ionen, die durch die Na^+/K^+ -ATPase in das Linsenepithel transportiert werden, überwiegend über dieselben Zellen wieder zurück ins Kammerwasser. Als gegenläufiges Ion zu Na^+ ist die geringfügige Beteiligung von K^+ an der Nettoionenzirkulation der Linse eine Voraussetzung für das effektive Funktionieren des Mikrozirkulationssystems (Mathias *et al.*, 2007). Auf molekularer Ebene konnte bislang die Expression einwärts gleichrichtender (*inward rectifier*, K_{ir}), verzögert gleichrichtender (*delayed rectifier*) sowie Ca^{2+} -aktivierte K^+ (K_{Ca})-Kanäle in

Linseneithelzellen identifiziert werden. Vertreter der ersten beiden Familien sind wahrscheinlich für die Etablierung eines stabilen Ruhemembranpotentials verantwortlich (Lovicu, 2004). Bezüglich der K_{Ca} -Kanäle werden Maxi-K-, IK (*intermediate conductance*) - sowie SK (*small conductance*)-Kanäle exprimiert (Rae *et al.*, 1990; Rae & Shepard, 1998; Rhodes *et al.*, 2003; Lauf *et al.*, 2008). Während Maxi-K-Kanälen eine Rolle bei der Regulierung des Membranpotentials spielen, könnten SK-Kanäle durch eine Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms eine Art Adaption an eine reduzierte Anzahl an Ca^{2+} -Kanälen in den Linseneithelzellen bewirken (Lovicu, 2004; Rhodes *et al.*, 2009). IK-Kanäle sind an der regulatorischen Volumenabnahme beteiligt (Lauf *et al.*, 2008; Chimote *et al.*, 2010).

Eine wichtige Rolle bei der regulatorischen Volumenabnahme nehmen auch Cl^- -Kanäle ein. An der Ionenzirkulation in der Linse sind sie hingegen kaum beteiligt, obwohl die Linsenfaserzellen eine ähnlich hohe Leitfähigkeit für Cl^- wie für Na^+ aufweisen. Der Grund hierfür ist, dass der transmembranäre Gradient von Cl^- , anders als der von Na^+ , seinem elektrochemischen Gleichgewicht sehr nahe ist (Mathias *et al.*, 2007). Mit der Kontrolle des Faserzellvolumens kommt der Cl^- -Homöostase dennoch eine für Transparenz unabdingbare Aufgabe zu. Denn sowohl das Schwellen von Faserzellen als auch eine Ausweitung der extrazellulären Räume kann zu einer gesteigerten Lichtstreuung und verminderten optischen Leistung führen (Jacob, 1999). Die Regulierung ist abhängig von dem Zusammenspiel von Cl^- -Transportern wie dem K^+/Cl^- -Cotransporter oder dem $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Cotransporter, und Cl^- -Kanälen (Lauf *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2007). In Linsenfaserzellen wurde eine konstitutiv aktive und Volumen-regulierte Cl^- -Leitfähigkeit gefunden und charakterisiert. Die Cl^- -Leitfähigkeit ist sensitiv gegenüber den Cl^- -Kanalinhibitoren Tamoxifen, 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB) und 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) (Mathias *et al.*, 1985; Zhang & Jacob, 1994, 1996; Webb *et al.*, 2004; Webb & Donaldson, 2009). Die molekulare Identität des zugrundeliegenden Ionenkanals beziehungsweise der Ionenkanäle ist nicht geklärt. Die Beobachtungen zur Cl^- -Leitfähigkeit in Linseneithelzellen sind kontrovers. Zwar finden sich Hinweise auf eine funktionelle Expression von Cl^- -Kanälen in diesem Zelltyp, doch konnten bisher keine Cl^- -selektiven Ströme identifiziert werden (Jacob, 1988; Zhang & Jacob, 1994a; Mathias *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 2003; Lovicu, 2004; Lauf *et al.*, 2008).

1.1.3 Ca^{2+} -Regulierung in der Linse

Ca^{2+} unterliegt einem ähnlichen intralenticulären Zirkulationsmechanismus wie Na^+ . Die Beteiligung von Ca^{2+} am Nettoionenstrom ist wegen seiner sehr niedrigen Konzentration jedoch gering und für das Mikrozirkulationssystem kaum von Bedeutung (Gao *et al.*, 2004).

Dennoch nimmt Ca^{2+} eine besondere Rolle in der Physiologie der Linse ein. Wie auch in anderen Geweben ist es als universeller intrazellulärer Signalstoff an essentiellen zellulären Prozessen wie Genexpression, Proliferation, Differenzierung und Zelltod beteiligt (Berridge *et al.*, 1998). Dies setzt eine feine Regulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration voraus. Beim Menschen beträgt der Ca^{2+} -Gehalt im Kammerwasser über 1 mM, in ganzen Linsen wurden etwa zwischen 100 und 500 μM Ca^{2+} gemessen (Duncan & Jacob, 1984; Duncan *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2004). Von dieser Gesamtmenge an Ca^{2+} liegt allerdings nur ein Bruchteil frei im Zytoplasma der Linsenzellen vor, und nur dieser Anteil nimmt an regulatorischen Prozessen teil und unterliegt der engmaschig kontrollierten Ca^{2+} -Homöostase. Die freie Ca^{2+} -Konzentration beträgt in Linsenepithelzellen etwa 100 bis 200 nM (Churchill & Louis, 2002; Gupta *et al.*, 2004; Rhodes & Sanderson, 2009). Sie nimmt innerhalb der Linse nach innen hin zu und erreicht bis zu 700 nM in den innersten Schichten des Linsenkerns (Gao *et al.*, 2004; Rhodes & Sanderson, 2009). Der Hauptanteil des lentikulären Ca^{2+} ist gebunden an Ca^{2+} -bindende Proteine wie β - und γ -Kristallin sowie an extrazellulär orientierte Fettmoleküle der Lipiddoppelschicht von Linsenzellen. Im Falle der Epithelzellen befindet es sich zusätzlich in Ca^{2+} -Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und dem Golgi-Apparat (Vrensen & Wolf, 1996; Rajini *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2004). Die Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Gradienten ist notwendig für das Überleben der Zellen und die intakte Funktion und Transparenz der Linse. Die Ca^{2+} -Homöostase ergibt sich aus der Balance der Aktivität von verschiedenen Ca^{2+} -Transportern und -Kanälen, welche hauptsächlich im Linsenepithel exprimiert werden.

Während in Linsenfaserzellen der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Wesentlichen die Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol bewerkstelligen könnte, sind in den Linsenepithelzellen zusätzlich die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran (PMCA) und des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) sowie ein mitochondrialer Uniporter an der Regulierung des Ca^{2+} -Levels beteiligt. Ihre Aufgabe ist neben der Aufrechterhaltung des niedrigen Ca^{2+} -Levels im Grundzustand auch dessen Wiederherstellung nach erfolgtem Ca^{2+} -Signal. Dies geschieht, indem überschüssiges Ca^{2+} in den Extrazellularraum ausgeschleust oder wieder in Speicher aufgenommen wird (Rhodes & Sanderson, 2009).

Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den Linsenepithelzellen erfolgt über Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle der Plasmamembran und die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern. Die Freisetzung aus Speichern wird hauptsächlich über ein Rezeptorsystem aus G-Protein- und Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren an den Zelloberflächen initiiert (Duncan & Collison, 2002; Rhodes *et al.*, 2009). Sie detektieren

extrazelluläre Signale und bewirken eine Zellantwort, die wiederum zu einer Ca^{2+} -Speicherentleerung durch Aktivierung von Inositol-3-Phosphat (IP3)-Rezeptoren führt (Vivekanandan & Lou, 1989). Die Freisetzung aus Ca^{2+} -Speichern wird zudem über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) mediiert, die durch cyclische Adenosindiphosphatribose (cADPR) und Ca^{2+} stimuliert werden (Qu & Zhang, 2003; Ozawa, 2010). Durch die Speicherentleerung wird wiederum ein Ca^{2+} -Einstrom (SOCE; *store-operated calcium entry*) induziert, dessen Aufgabe es ist, die Speicher wieder aufzufüllen und den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg zu verlängern. Mögliche Kandidaten des SOCE sind die nicht-selektiven Kationenkanäle der TRPC (*canonical transient receptor potential*)-Unterfamilie, deren Expression in der Linse bisher jedoch nicht untersucht wurde (Rhodes & Sanderson, 2009; Rhodes *et al.*, 2009).

Neben den am SOCE beteiligten Kanälen werden verschiedene weitere Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle exprimiert. Zu diesen Kanälen zählen spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs, Rezeptor-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle vom Typ der P2X-Purinozeptoren sowie andere nicht-selektive Kationenkanäle (Suzuki-Kerr *et al.*, 2008; Meissner & Noack, 2008; Suzuki-Kerr *et al.*, 2010; Maddala *et al.*, 2013). Nicht-selektive Kationenkanäle, die in den Linsenepithelzellen bereits identifiziert wurden, sind TRPV1 und TRPV4 (Shahidullah *et al.*, 2012; Martínez-García *et al.*, 2013). Beide sind mechanosensitiv und wirken als eine Art Sensor, indem sie auf osmotische Abweichungen entfernter Linsenfaserzellen reagieren und die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase zur Korrektur dieser Abweichung beeinflussen. Dabei wirkt TRPV1 reduzierend, TRPV4 hingegen steigernd auf die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (Gao *et al.*, 2015). Weiterhin führt oxidativer Stress zu einer gesteigerten Kationenpermeabilität der Linse. Es wird vermutet, dass dem ein durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal zugrunde liegt, dessen Aktivierung eine pathophysiologische Veränderung des Ionen-, insbesondere des Ca^{2+} -Haushalts, bewirkt (Sanderson *et al.*, 1999; Rhodes & Sanderson, 2009).

1.1.4 Katarakt

Die Eintrübung der Linse, die als Katarakt oder grauer Star bezeichnet wird, ist eine hauptsächlich im Alter auftretende Augenerkrankung, die zu Beeinträchtigungen des Sehvermögens führt. Sie ist mit 48 % weltweit die häufigste Ursache für Erblindungen beim Menschen und vor allem in Entwicklungsländern ein Problem ('WHO | Causes of blindness and visual impairment').

Katarakte werden nach ihren Ursachen in verschiedene Gruppen eingeteilt. Kongenitale Katarakte manifestieren sich bereits vor der Geburt und machen etwa 1 % aller

Katarakte aus (Grehn, 2011). Den Großteil der Katarakte bilden mit 99 % erworbene Katarakte. Sie werden unter anderem durch Allgemeinerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), andere Augenerkrankungen, Traumata, Medikamente (z.B. Steroide) und physikalische Stressoren wie ionisierende Strahlung verursacht. Die häufigste Ursache erworbener Katarakte sind jedoch altersbedingte Veränderungen der Linse. Diese sogenannten senilen (altersbedingten) Katarakte machen etwa 90 % aller erworbenen Katarakte aus. Sie werden zur näheren Unterscheidung nach ihrer Morphologie klassifiziert. Verschiedenste Risikofaktoren tragen zur Entstehung seniler Katarakte bei. Das sind einerseits exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung (z.B. UV- und Röntgenstrahlung), Rauchen und Medikamente (z.B. Steroide), andererseits endogene Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, hohe Myopie, die Farbe der Iris und das Geschlecht (Grehn, 2011; Gupta *et al.*, 2014). Man kann deshalb von einer multifaktoriellen Erkrankung sprechen.

Momentan gibt es keine wirksamen Medikamente gegen Katarakte. Die einzige effektive Behandlungsmethode ist eine operative Entfernung. Meist wird dabei eine extrakapsuläre Kataraktextraktion durchgeführt. Hierbei wird der trübe Linseninhalt aus dem Kapselsack entfernt; der Kapselsack bleibt erhalten. Nach etwa 20 bis 30 % der extrakapsulären Kataraktextraktionen treten jedoch Spätfolgen in Form des Nachstars auf (Grehn, 2011). Die Entwicklung nicht-operativer Maßnahmen könnte die kostspieligen Operationen und ihre Spätfolgen vermeiden oder hinauszögern. Sie setzt allerdings ein tieferes Verständnis für die molekularen Vorgänge, kataraktogenen Faktoren und Risikofaktoren voraus, die in die Kataraktogenese involviert sind (Vrensen, 1995). Im Folgenden wird auf einige wichtige Faktoren und Prozesse bei der Kataraktogenese eingegangen.

1.1.5 Ionenhomöostase und Katarakt

Schon vor über 100 Jahren wurde festgestellt, dass kataraktöse Linsen verglichen mit normalen Linsen sehr häufig veränderte Ionenbedingungen aufweisen. Die Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen sind hierbei erhöht, die K^+ -Konzentrationen verringert (Burge, 1909). Eine entscheidende Rolle scheint dabei der Anstieg von Ca^{2+} im Zytoplasma zu spielen. Er konnte durch die experimentell induzierte Kataraktogenese in kultivierten Linsen direkt mit der Linseneintrübung in Verbindung gebracht werden (Marcantonio *et al.*, 1986).

Mittlerweile wurde herausgefunden, dass das Ionenungleichgewicht hauptsächlich bei einer bestimmten Form der Katarakt auftritt, nämlich bei der kortikalen Katarakt (Duncan & Bushell, 1975). Bei der kortikalen Katarakt, auch als Rindenstar bezeichnet, finden sich häufig lokal begrenzte Eintrübungen im Linsenkorax. Die betroffenen Regionen weisen

erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen und strukturelle Störungen auf (Duncan & Jacob, 1984). Es wird vermutet, dass die Entstehung dieser Art der Katarakt mit einer Schädigung des Linsenepithels beginnt. Linsenepithelzellen mit ihrer Fülle an Transportern, Ionenkanälen und Ca^{2+} -Speichern sind primärer Ort der Ca^{2+} -Regulierung und nicht nur für die Ionenhomöostase im Linsenepithel selbst, sondern in der gesamten Linse verantwortlich. Eine Störung der Ionenhomöostase führt zunächst zu Schädigungen des Linsenepithels, anschließend zu einem Zusammenbruch der Ionenhomöostase in weiteren Linsenregionen und der dortigen Linsentrübung (Gupta *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006; Gosak *et al.*, 2015).

Es wird vermutet, dass die Schädigung der Linsenepithelzellen durch eine übermäßige Aktivität Ca^{2+} -abhängiger Enzyme ausgelöst wird (Hightower, 1995; Karlsson *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004). Eine wesentliche Rolle spielt Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Cysteinprotease. Calpain bewirkt die Degradierung und den Funktionsverlust von lentikulären Zytoskelett- (z.B. Vimentin, Aktin, Spektrin) und Membranproteinen (z.B. Cadherine, Zonula Occludens (ZO)-1) sowie von Kristallinen (z.B. α -, β -Kristallin) (Yoshida *et al.*, 1984a, 1984b; David *et al.*, 1993; Andersson *et al.*, 1996; Sanderson *et al.*, 1996; Andjelić *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Auch Transglutaminase, ebenfalls ein Ca^{2+} -abhängiges Enzym, ist durch Querverknüpfung von Proteinen in den Prozess involviert (Berbers *et al.*, 1984; Clément *et al.*, 1998; Shridas *et al.*, 2001). Beide Enzyme wurden hauptsächlich im Linsenepithel und peripheren Kortex detektiert, wo sich auch die ersten Anzeichen von Eintrübungen zeigen (Yoshida *et al.*, 1985; Hidasi *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2003).

Ein weiterer Effekt der Ca^{2+} -Überbelastung ist eine gesteigerte Apoptoserate von Linsenepithelzellen. Bei der Apoptose findet ebenfalls ein kontrollierter proteolytischer Abbau von Proteinen des Zytoskeletts sowie der DNA statt. Die wichtigsten Enzyme der Apoptose sind Caspasen, ebenfalls Cysteinproteasen, wobei in Hinblick auf die Ca^{2+} -Sensitivität die proteolytische Aktivität von Calpainen wahrscheinlich ebenfalls involviert ist (Orrenius *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2004; Sharma & Rohrer, 2004). Die hohe Apoptoseaktivität, aus der eine verringerte Zelldichte der Linsenepithelzellen resultiert, wird als Schlüsselprozess in der kortikalen Kataraktogenese diskutiert (Li *et al.*, 1995; Duncan & Wormstone, 1999; Charakidas *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006).

Unter physiologischen Bedingungen vermutlich in den Prozess der Faserzellendifferenzierung involviert, führt die gesteigerte Aktivität der genannten Enzyme an falscher Stelle offensichtlich zu pathologischen Ereignissen (Clark *et al.*, 1999; Wride, 2011). Durch die genannten Prozesse kann es zum Verlust der mechanischen und elektrischen

Verbindung zwischen den Linsenepithelzellen, der Integrität und Barrierefunktion der Epithelzellschicht und womöglich auch zu Störungen bei der Faserzellendifferenzierung kommen (Karim *et al.*, 1987; Yan *et al.*, 2006; Wride, 2011). Daraus resultiert osmotischer Stress auf die unter dem beschädigten Epithelbereich gelegenen kortikalen Faserzellen. Dies führt einerseits zu einem Wassereinstrom und Schwellen der Faserzellen, was sich in einem erhöhten Nassgewicht von Linsen mit kortikaler Katarakt zeigt. Die Wasserakkumulation manifestiert sich in Vakuolen und Spalten, die eine Störung des refraktären Indexes bewirken (Van Heyningen, 1972; Harding & Crabbe, 1984; Jacob, 1999). Zum anderen kommt es zu einem Proteinverlust, was das verringerte Trockengewicht von Linsen mit kortikalen Katarakten bedingt (Van Heyningen, 1972). Betroffen sind vor allem Proteine, die im äußeren Kortex neu gebildet werden und die, vermutlich ebenfalls durch die oben beschriebenen Enzyme, degradiert, aggregiert und teilweise an das Kammerwasser abgegeben werden (Sanderson *et al.*, 2000). Besonders schwer wiegt der Verlust von Kristallinen und ihrer Funktionen. Zum einen wird die regelmäßige Anordnung dieser strukturell essentiellen Proteine zerstört, die Voraussetzung für die Transparenz der Linse ist. Zum anderen geht die Chaperon-artige Wirkung von α -Kristallin verloren, welche die Faserzellen vor stressbedingten Schäden von Proteinen schützt (Jacob, 1999; Bloemendal *et al.*, 2004). Die Ereignisse haben Eintrübungen in Arealen im vorderen und hinteren Kortex der Linse und entsprechend eine stärkere Lichtstreuung zur Folge (Jacob, 1999; Sanderson *et al.*, 2000). Das Licht kann nicht mehr ungehindert auf die Retina fallen und es kommt zu einer Visusminderung.

1.1.6 Einfluss kataraktogener Faktoren

Obwohl Ca^{2+} eine Hauptrolle zu spielen scheint, können auch weitere kataraktogene Faktoren an der Entstehung der lentikulären Ionendyshomöostase beteiligt sein. In diesem Zusammenhang sind zwei kataraktogene Faktoren von besonderer Bedeutung: oxidativer Stress, der Membranproteine schädigen, aber auch die Aktivität von Ionenkanälen regulieren kann, und der transformierende Wachstumsfaktor- β , der unter anderem die Genexpression von Membranproteinen reguliert.

1.1.6.1 Oxidativer Stress

Radikalbildung wird als Schlüsselereignis in der Entstehung seniler Katarakte angesehen. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) wie Superoxid, H_2O_2 und Hydroxylradikale verursachen oxidativen Schaden am Linsengewebe. Ionisierender Strahlung und anderen Faktoren, die zur Bildung von ROS führen, wird deshalb eine besondere

Bedeutung beigemessen. Neben exogenen Quellen wie UV-Strahlung und Rauch werden ROS endogen bei Stoffwechselprozessen produziert, die primär in den Epithelzellen stattfinden. Um sich vor der hohen ROS-Belastung zu schützen, besitzt die Linse ein antioxidatives Schutzsystem. Es besteht aus enzymatischen Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, aus nicht-enzymatischen Antioxidantien, zu denen Ascorbinsäure, α -Tocopherol und reduziertes Glutathion zählen, sowie aus Reparaturenzymen von DNA und Proteinen. Im Alter nimmt die Aktivität des enzymatischen Schutzsystems jedoch ab und die Linse wird oxidativ gestresst (Nita *et al.*, 2016).

Als erste biologische und physische Instanz der Linse ist das Epithel der oxidativen Belastung am stärksten ausgesetzt. Eine zu starke Belastung bewirkt neben der Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA auch eine erhöhte Membranpermeabilität des Linsenepithels für Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Der resultierende intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg führt, wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben, zu einem Verlust der Integrität dieses Zellverbandes (Sanderson & Duncan, 1993; Hightower *et al.*, 1994; Spector, 1995; Andersson *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2004; Babizhayev *et al.*, 2014). Da das Linsenepithel mit seiner Barrierefunktion und metabolischen Funktion die gesamte Linse schützt und versorgt, resultiert eine Schädigung der Linsenfaserzellen. Es kommt zu Eintrübungen in den peripheren Bereichen und zur kortikalen Katarakt.

Aufgrund der ROS-bedingten Steigerung der Kationenpermeabilität liegt der Schluss nahe, dass ROS an der Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals beteiligt sind. Dies könnte durch eine direkte Aktivierung durch ROS als Agonisten geschehen, wie bereits Sanderson *et al.* (1999) vermuteten. ROS könnten aber auch einen synergistischen Einfluss auf die Aktivität von Ionenkanälen wie die eines Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals ausüben.

1.1.6.2 Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF β)

Ein weiterer Faktor, der in der Kataraktogenese von Bedeutung ist, ist der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF β ; *transforming growth factor- β*). Es ist ein Zytokin und Wachstumsfaktor und an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration und der Bildung von extrazellulärer Matrix beteiligt (Nagaraj & Datta, 2010). Seine Wirkung basiert auf der Regulierung der Expression von Genen, die über Smad-abhängige Signalwege oder über Smad-unabhängige Signalwege wie den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Weg verlaufen kann.

In Säugetieren existieren drei TGF β -Isoformen. Sie alle sind im vorderen Augenabschnitt, hauptsächlich in ihrer inaktiven Form, im Kammerwasser zu finden, wo ihre Aktivität streng reguliert wird (de Jongh *et al.*, 2005). Alle Isoformen üben Wirkungen auf die Linse aus, wobei TGF β 2, das vom Linsenepithel sowohl synthetisiert als auch sekretiert wird, die potenteste Isoform darstellt (Allen *et al.*, 1998; Gordon-Thomson *et al.*, 1998). In der Linse ist TGF β in die Faserzellendifferenzierung, die Produktion von Kapselproteinen sowie die Wundheilung involviert (Liu *et al.*, 1994; Richiert & Ireland, 1999; de Jongh *et al.*, 2001). Es spielt außerdem eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Kataraktformen. Am bekanntesten und besten untersucht ist die Rolle von TGF β bei der vorderen subkapsulären Katarakt und dem fibrotischen Nachstar. Dies sind zwei verletzungsbedingte Kataraktformen, bei denen es beim Versuch der Wundheilung durch Umwandlung epithelialer in mesenchymale Linsenzellen, der sogenannten epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), zur Fibrosierung des Linsengewebes kommt.

TGF β kann experimentell außerdem die Entstehung einer PSC und kortikalen Katarakt bewirken (Hales *et al.*, 1999). Es ist unwahrscheinlich, dass hierbei die EMT eine Rolle spielt. Stattdessen könnte ein Zusammenhang mit der erhöhten Kationenpermeabilität bestehen. Eine TGF β -bedingte pathologische Veränderung der Leitfähigkeit wird bereits bei anderen Erkrankungen vermutet, worin verschiedene Ionenkanäle involviert sind: Zum Beispiel wird die Hochregulierung von TRPM7 durch TGF β in hepatischen Sternzellen mit der Leberfibrose, in atrialen Fibroblasten mit Vorhofflimmern assoziiert (Du *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2014); im Atemwegsepithel führt TGF β zu einer verringerten Expression von Cl-Kanälen, was bei verschiedenen Atemwegserkrankungen von Bedeutung sein könnte (Cheng, *et al.* 2007; Sun *et al.*, 2014). Eine veränderte Expression und Aktivierung von Kationenkanälen durch TGF β ist auch bei der kortikalen Katarakt denkbar. Plausibel wäre außerdem ein Zusammenhang von TGF β mit Prozessen wie der Apoptose oder einer fehlerhaften Differenzierung von Linsenepithelzellen, die sowohl mit TGF β als auch der kortikalen Katarakt assoziiert werden (Li *et al.*, 1995; Jobling & Augusteyn, 2002; Yan *et al.*, 2006). Die Funktion von TGF β bei der Kataraktogenese scheint demnach komplex zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.2 Ca²⁺-aktivierte Kationenkanäle

Die erhöhte Membranpermeabilität, die bei kortikalen Katarakten auftritt, lässt sich mit der Aktivierung von Kationenkanälen infolge eines intrazellulären Ca²⁺-Anstiegs erklären, möglicherweise verstärkt von weiteren kataraktogenen Faktoren. Ca²⁺-aktivierte

Kationenkanäle, die Einflüsse auf die Ionenhomöostase, das Membranpotential und das Ca^{2+} -Signaling ausüben, können an verschiedensten zellulären und pathologischen Prozessen wie der Calpain-Aktivierung beteiligt sein.

Es gibt zwei Arten Ca^{2+} -aktivierter Kationenkanäle: K^+ -Kanäle (K_{Ca}) und nicht-selektive Kationenkanäle. Die nicht-selektiven Kationenkanäle lassen sich weiter unterteilen in Kanäle, die für Ca^{2+} sowie monovalente Kationen durchlässig sind, und jene, die selektiv monovalente Kationen passieren lassen. Während die Gruppe der K_{Ca} -Kanäle eine eigene, abgeschlossene Ionenkanalfamilie bildet, findet man Ca^{2+} -aktivierte nicht-selektive Kationenkanäle als einzelne Vertreter übergeordneter Proteinfamilien. Einige Mitglieder der kationenpermeablen TRP (*transient receptor potential*)-Superfamilie werden durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg aktiviert und stellen folglich Ca^{2+} -aktivierte nicht-selektive Kationenkanäle dar. Weiterhin wird diskutiert, ob Anoctamin-6 (Ano6), ein Vertreter der Ca^{2+} -abhängigen Proteinfamilie der Anoctamine (Anos), als Kationenkanal fungiert. Im Folgenden werden die Familien der K_{Ca} - und TRP-Kanäle kurz vorgestellt. Die Vorstellung der Anoctamine erfolgt an späterer Stelle (Kapitel 1.4).

1.2.1 K_{Ca} -Kanäle

Die bislang am besten untersuchte Familie der Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanäle ist die der K^+ -selektiven K_{Ca} -Kanäle. Ihre Mitglieder sind K^+ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (*big conductance*, BK, Maxi-K), mit mittlerer Leitfähigkeit (*intermediate conductance*, IK) und mit geringer Leitfähigkeit (*small conductance*, SK) (Wei *et al.*, 2005). Um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden, lagern sich vier α -Untereinheiten zu einem Tetramer zusammen. Jede einzelne der α -Untereinheiten besteht wiederum aus sechs, im Fall des Maxi-K-Kanals aus sieben transmembranären Domänen. Weiterhin können sich regulatorische β -Untereinheiten anlagern (Berkefeld *et al.*, 2010). Während SK- und IK-Kanäle allein durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg aktiviert werden, ist bei Maxi-K-Kanälen zusätzlich eine Aktivierung durch eine Membrandepolarisation möglich (Vergara *et al.*, 1998). Die Kanäle sind oft in unmittelbarer Nähe zu verschiedenen Ca^{2+} -Quellen lokalisiert (Marrion & Tavalin, 1998; Stocker, 2004; Berkefeld *et al.*, 2006).

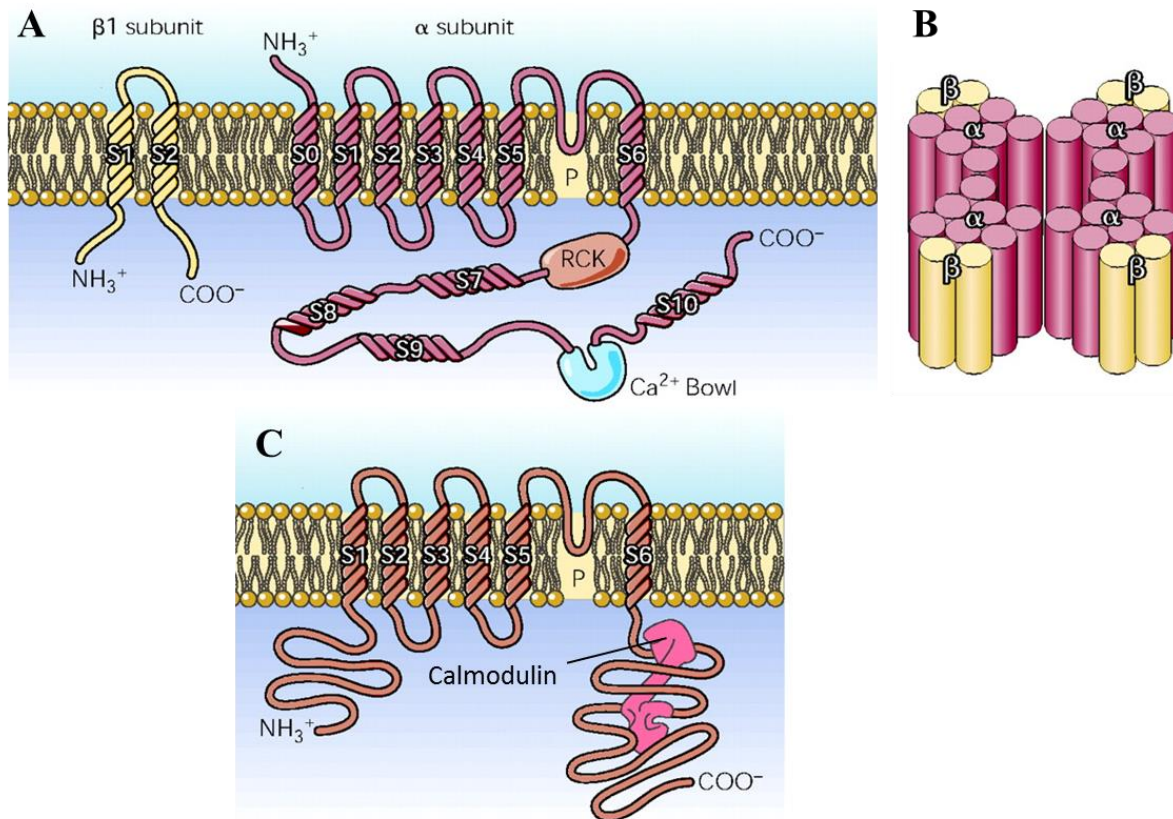


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen (Ledoux *et al.*, 2006). A: Struktur der α - und β 1-Untereinheiten eines Maxi-K-Kanals. Die β 1-Untereinheit setzt sich aus zwei, die α -Untereinheit aus sechs Transmembrandomänen (S; *segments*) zusammen. Die Porenregion befindet sich zwischen Segment 5 und 6. B: Zusammenlagerung von jeweils vier α - und β 1-Untereinheiten zu einem Maxi-K-Kanal. C: Struktur eines SK-Kanals aus sechs Transmembrandomänen. RCK: *Regulator of conductance*.

K_{Ca} -Kanäle finden sich in einer Vielzahl von Geweben. Sie werden sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen exprimiert. Entsprechend vielfältig sind die physiologischen Funktionen dieser Ionenkanalfamilie. Die Grundlage ihrer Wirkweise stellt in erster Linie eine Regulierung der Ionenhomöostase sowie des Zellmembranpotentials dar, wobei die Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen in der Regel eine Hyperpolarisation bewirkt. In Neuronen sind sie an der Repolarisation, an der Generierung von schnellen, mittleren und langsamen hyperpolarisierenden Nachpotentialen und an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt. In glatter Muskulatur sind sie in die Relaxation involviert (Ghatta *et al.*, 2006; Zheng & Trudeau, 2015). Weitere zelluläre Prozesse, an denen sie mitwirken, sind die Proliferation, Differenzierungsvorgänge sowie die regulatorische Volumenabnahme und der transepitheliale Ionentransport, bei denen K^+ häufig als Gegenion zu Cl^- fungiert (Girault & Brochiero, 2014). Die durch die K_{Ca} -Aktivierung bedingte Hyperpolarisation der Zellmembran verstärkt die Antriebskraft eines Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -durchlässige Kanäle, die nicht

spannungsgesteuert sind. Sie hemmt jedoch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, was in erster Linie in erregbaren Zellen von Bedeutung ist (Berkefeld *et al.*, 2010).

Für die K_{Ca} -Kanäle stehen verschiedene Toxine mit einer spezifischen inhibitorischen Wirkung zur Verfügung. SK-Kanäle werden durch das Bienengift Apamin blockiert. Das Skorpiongift Charybdotoxin inhibiert IK- und Maxi-K-Kanäle. Pharmakologisch dennoch unterscheiden lassen sich die beiden Kanäle durch Iberitoxin, ein weiteres Skorpiongift, sowie durch Paxillin, ein Produkt des Pilzes *Penicillium paxilli*. Beide Substanzen hemmen spezifisch Maxi-K-Kanäle (Wei *et al.*, 2005).

1.2.2 Ca^{2+} -abhängige TRP-Kanäle

TRP-Kanäle bilden eine umfangreiche Gruppe von Kationen-permeablen Ionenkanälen. Sie wurden in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie eine Rolle bei der Phototransduktion spielen: Während langandauernde Lichtreize im Wildtyp der *Drosophila melanogaster* ein anhaltendes Rezeptorpotential bewirkten, lösten sie bei Fruchtfliegen mit einer Mutation des TRP-Gens nur eine vorübergehende („transiente“) Antwort aus (Minke *et al.*, 1975). Hierher stammt die Bezeichnung „transient receptor potential“ (TRP). In Säugern konnten bislang 28 TRP-Proteine identifiziert werden. Bei allen lagern sich, ähnlich den K_{Ca} -Kanälen, vier Untereinheiten aus jeweils sechs Transmembrandomänen zu einem kanalbildenden homo- oder heteromeren Tetramer zusammen. Die Porenregion der einzelnen Untereinheiten befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment.

Die verschiedenen porenbildenden Vertreter wurden aufgrund von Aminosäurehomologien in sechs Gruppen eingeteilt: TRPC („classical“ oder „canonical“), TRPV („vanilloid“), TRPM („melastatin“), TRPA („ankyrin“), TRPP („polycystic“) und TRPML („mucolipin“) (Clapham, 2003). Die einzelnen Vertreter variieren stark in ihrer Selektivität gegenüber mono- und divalenten Kationen, ihrem biophysikalischen Verhalten, ihrer Pharmakologie und ihren Aktivierungsmechanismen.

TRP-Kanäle werden sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen exprimiert. Das breite Expressionsspektrum sowie die Diversität innerhalb der Familie korrelieren mit den vielfältigen physiologischen Funktionen der TRP-Kanäle. Ihren Funktionen liegt zum einen zugrunde, dass sie in die Regulierung der Ionenhomöostase und Ionentransportprozesse eingebunden sind, zum anderen, dass ihre Aktivierung eine Depolarisation der Zellmembranen bewirkt. Die meisten Mitglieder der TRP-Familie sind außerdem Ca^{2+} -permeabel, weshalb sie eine Rolle beim Ca^{2+} -Signaling spielen. Im Falle der Ca^{2+} -aktivierten und zugleich Ca^{2+} -permeablen TRP-Kanäle könnte dies einen positiven Rückkopplungsmechanismus bedeuten, indem die Aktivierung der entsprechenden Kanäle

den Ca^{2+} -Einstrom direkt verstärkt. Zu diesen Kanälen zählen TRPC3, TRPC5, TRPM2, TRPP1 (auch Polycystin-2 oder *polycystic kidney disease* (PKD)-2), TRPP2 sowie TRPML1. TRPM4 und TRPM5 werden ebenfalls durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung aktiviert (Numata *et al.*, 2011; Alexander *et al.*, 2015). Sie sind allerdings lediglich für monovalente Kationen durchlässig, für divalente Kationen wie Ca^{2+} impermeabel. Sie kontrollieren den Ca^{2+} -Haushalt und -Signale allein durch ihre depolarisierende Wirkung auf das Membranpotential. Durch Herabsetzen der elektrochemischen Antriebskraft wirken sie einem Ca^{2+} -Einstrom entgegen. Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, welche insbesondere in erregbaren Zellen bestimmend sind, aktivieren sie hingegen (Freichel *et al.*, 2012).

Die genannten Ca^{2+} -aktivierten TRP-Kanäle sind bei einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen von Bedeutung. Dies umfasst die Sinneswahrnehmung, die Entwicklung und Signalübertragung im Gehirn, die kardiovaskuläre Kontraktilität, Immunantworten und sekretorische Prozesse wie die Insulin-Sekretion. Sie sind außerdem an zellulären Prozessen wie Zellwachstum, -proliferation, -migration und Apoptose beteiligt. Mutationen, Fehlregulierungen oder andere Störungen der Kanäle sind in pathologische Ereignisse involviert. Beispielsweise können Mutationen von TRPP1 zur autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung führen (Boucher & Sandford, 2004); Mutationen des MCOLN1-Gens, das TRPML1 kodiert, verursachen Mukopolipidose Typ IV, eine autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit, die unter anderem durch ophthalmologische Störungen gekennzeichnet ist (Puertollano & Kiselyov, 2009). Bei Hypertension könnte eine Hochregulierung von TRPC3 eine Rolle spielen (Liu *et al.*, 2005; Noorani *et al.*, 2011). TRPM2 nimmt pathophysiologisch eine besondere Stellung ein. Es fördert beispielsweise Inflammationen pathologisch, was eine Bedeutung bei entzündlichen Erkrankungen impliziert (Jiang *et al.*, 2010). Da die Aktivierung von TRPM2 zudem zur Apoptose prädisponiert, scheint es in verschiedene degenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer involviert zu sein (Xie *et al.*, 2010; Nazıroğlu, 2011).

Die Identifizierung der TRP-Kanäle und Erforschung ihrer Beteiligung an physiologischen Funktionen und pathologischen Ereignissen wird durch einige Umstände erschwert. Zum einen sind die Aktivierungsstimuli der TRP-Kanäle vielfältig. Sie können sowohl chemischer als auch physikalischer Natur sein (Abe & Puertollano, 2011). Für dasselbe Protein existieren oft mehrere Stimuli und diverse Modulatoren. Die pharmakologischen Eigenschaften können sich mitunter je nach Zelltyp und Expressionssystem unterscheiden. Des Weiteren stellt die mangelnde Spezifität der bereits

identifizierten Agonisten und Antagonisten ein Problem dar. Für die meisten Vertreter der TRP-Superfamilie, so auch für die Ca^{2+} -aktivierten Mitglieder, wurden bislang keine spezifischen Substanzen gefunden oder entwickelt. Untersuchungen der Kanäle im endogenen Expressionssystem sind deshalb oft aufwändig und die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen mitunter konträr. Es besteht Unklarheit über genauere physiologische und pathologische Funktionen der einzelnen Vertreter, die unter anderem in der Linse von Relevanz sein könnten.

1.3 Das retinale Pigmentepithel

1.3.1 Aufbau des RPE

Nachdem das Licht den dioptrischen Apparat passiert hat, trifft es auf die Retina, welche die innere Oberfläche des Augapfels auskleidet. Genauer gesagt wird das Bild auf die Makula fokussiert, die den schärfsten Ort des Sehens darstellt. In der Retina wird das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt, vorverarbeitet und an das Gehirn weitergeleitet (Kandel *et al.*, 1995). Die äußerste Schicht der Retina ist das RPE. Es ist ein einschichtiges Epithel aus hexagonal-prismatischen Zellen (Abbildung 1.5) (Strauss, 2005). Die Zellen sind auf den lateralen Seiten ihrer Membranen über Tight Junctions miteinander verbunden, wodurch das RPE ein dichtes Epithel darstellt. Auf basaler Seite an die Bruch-Membran, eine Grenzschicht zwischen RPE und Choriocapillaris, und auf apikaler Seite an die Photorezeptoren angrenzend, bildet das RPE deshalb eine Schranke zwischen Blut und Retina. Es ist außerdem eine polarisierte Zellschicht. Der apikale und basolaterale Bereich der RPE-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer Morphologie, Organisation der Organellen und Verteilung von Membranproteinen (Abbildung 1.5) (Strauss, 2005). Dies äußert sich in einer unterschiedlichen Funktionalität der beiden Seiten. Die basolaterale Membran des RPE zeigt Einfaltungen, woraus sich eine vergrößerte Oberfläche und eine verbesserte Absorption und Sekretion von Stoffen aus dem Blutstrom durch die fenestrierte Choriocapillaris ergibt. Auf apikaler Seite besitzt das RPE Fortsätze, die sogenannten Mikrovilli, die ebenfalls der Membranvergrößerung dienen und außerdem die äußeren Segmente der Photorezeptoren umgreifen. Dies ermöglicht einen engen Kontakt und Stoffaustausch zwischen RPE und Photorezeptoren, die eine funktionelle Einheit bilden und intensiv interagieren. Zwischen dem RPE und den Photorezeptoren befindet sich der subretinale Raum. Er ist mit einer Matrix gefüllt, über die der Austausch von Stoffen und Signalen erfolgt. Ein weiteres Charakteristikum ist die starke Pigmentierung des RPE, die durch den hohen Gehalt an

Melanin in zahlreichen Melanosomen zustande kommt (Strauss, 2005). Diese Eigenschaft verleiht dem RPE seinen Namen.

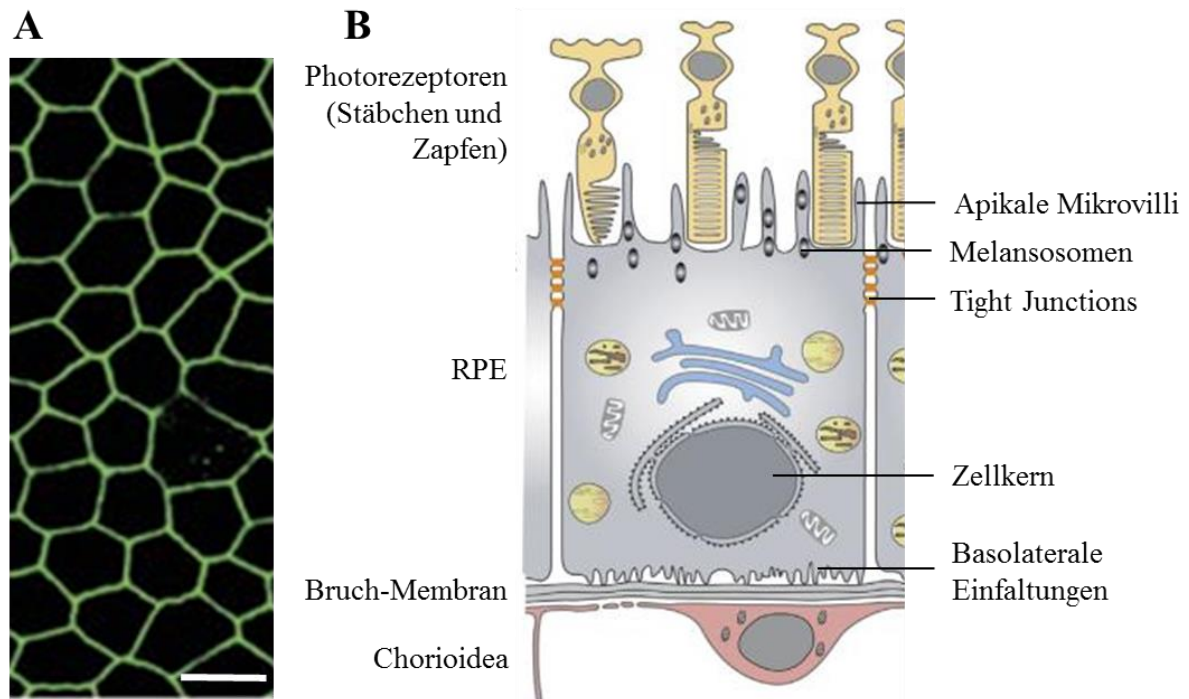


Abbildung 1.5: Aufbau des RPE. A: Konfokal mikroskopische Aufnahme von humanen fetalen RPE-Zellen, die 4 Wochen auf Transwell-Filtern kultiviert wurden. Angefärbt wurde das Tight Junction-Protein ZO-1 (modifiziert nach Sonoda *et al.*, 2009). Markierungsbalken 10 µm. B: Polarer Aufbau einer RPE-Zelle (modifiziert nach Lehmann *et al.*, 2014).

1.3.2 Funktionen des RPE

Der Aufbau und die Lage des RPE bestimmen seine vielfältigen Funktionen. Neben der Barrierefunktion als Epithel, das den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem subretinalen Raum vermittelt, übernimmt es auch Glia- und Makrophagenfunktionen und bedingt das Immunprivileg des Auges (Steinberg, 1985). Die wichtigsten Aufgaben des RPE sind die Sekretion, Phagozytose, Sehzyklus, Pufferung von Ionen, transepithelialer Transport und Lichtabsorption. Sie alle tragen dazu bei, dass die Erregbarkeit der Photorezeptoren und die Integrität der Retina aufrechterhalten werden. Ist auch nur eine der Funktionen gestört, kann dies zur Schädigung der Retina und zum Sehverlust führen (Strauss, 2005).

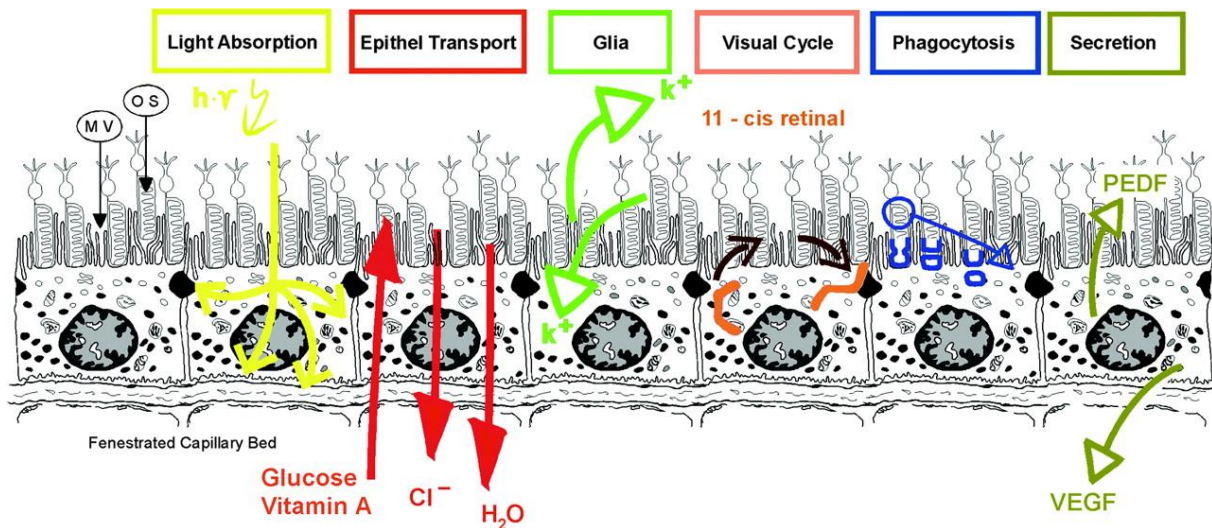


Abbildung 1.6: Schematischer Überblick über die Funktionen des RPE (nach Strauss, 2005). Das RPE steht über seine Mikrovilli apikal mit dem subretinalen Raum und den Außensegmenten der Photorezeptoren, basolateral über die Bruch-Membran mit der fenestrierten Choriocapillaris in Kontakt. Über laterale interzelluläre Tight Junctions bildet es eine dichte Barriere. Die Hauptfunktionen des RPE sind Lichtabsorption, epithelialer Transport, Aufrechterhaltung der subretinalen Ionenzusammensetzung, Sehzzyklus, Phagozytose und Sekretion. MV: Mikrovilli, OS: Photorezeptoraußensegment, PEDF: *Pigment epithelium-derived factor*, VEGF: *Vascular endothelial growth factor*.

Sehzzyklus

Die Phototransduktion in den Photorezeptoren ist an die Isomerisierung von 11-cis-Retinal, das Chromophor des Sehpigments Rhodopsins, zu all-trans-Retinal geknüpft. Damit Rhodopsins erneut aktiviert werden kann, ist eine Reiseromerisierung zu 11-cis-Retinal notwendig. Den Photorezeptoren fehlt allerdings die nötige Enzymausstattung für diesen Vorgang (Rando, 2001). Deshalb wird das all-trans-Retinal ins RPE transportiert, wo es in einem mehrstufigen Prozess reiseromerisiert wird. Das zentrale Enzym der Reiseromerisierung ist die Isomerohydrolase RPE65 (Moiseyev *et al.*, 2005). Im Anschluss wird das 11-cis-Retinal den Photorezeptoren wieder zur Verfügung gestellt. Zusätzlich existiert vermutlich ein alternativer zapfenspezifischer Zykus in den Müllerzellen (Mata *et al.*, 2002).

Phagozytose

Durch die Fokussierung des Lichts auf die Makula ist die Konzentration an photooxidativer Energie in der Retina hoch. Die Spitzen der lichtsensitiven Photorezeptoraußensegmente unterliegen hierdurch einer permanenten Schädigung. Sie müssen ständig erneuert werden, um die fortwährende Erregbarkeit der Photorezeptoren zu gewährleisten. Die alten zerstörten Spitzen werden abgestoßen, vom RPE phagozytiert und verdaut. Wichtige Moleküle (z.B. Retinal) werden recycelt und den Photorezeptoren wieder zur Verfügung gestellt (Strauss,

2005). Der Erneuerungsprozess unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Die Umsatzrate eines Photorezeptoraußensegments beträgt zwischen 9 und 13 Tagen (Young, 1971).

Lichtabsorption

Auch das RPE ist der hohen photooxidativen Energie von der retinalen Seite her ausgesetzt. Die Phagozytose und der Verdau der ebenfalls oxidativ belasteten Photorezeptoraußensegmente sowie die sauerstoffreiche Umgebung durch die intensiv durchblutete Chorioidea stellen eine zusätzliche oxidative Belastung für das RPE dar. Um diese zu bewältigen, besitzt das RPE verschiedene Schutzmechanismen wie Antioxidantien und antioxidative Enzyme (Plafker *et al.*, 2012). Der stärkste Abwehrmechanismus ist aber die Absorption von Licht durch die zahlreichen Melanosomen, wobei diese auf über 40 °C aufheizen können (Auker *et al.*, 1982; Parver, 1991). Ein weiterer Vorteil der Absorption von überschüssigem Licht durch die Melanosomen ist, dass es die Lichtstreuung minimal hält. Hierdurch wird eine hohe Bildqualität ermöglicht (Strauss, 2005).

Sekretion und Immunprivileg

Das RPE synthetisiert und sezerniert eine Reihe von Wachstumsfaktoren, immunmodulatorischen Substanzen und anderen Signalmolekülen. Das erweitert die Möglichkeiten der parakrinen oder autokrinen Kommunikation. Zu den sezernierten Substanzen zählen bFGF (*basic fibroblast growth factor*), TGF β , IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), PEDF (*pigment epithelium-derived factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*) (Sternfeld *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1992; Tanihara *et al.*, 1993; Adamis *et al.*, 1993; Campochiaro *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2001). VEGF zum Beispiel ist ein angiogenetischer Faktor, der im gesunden Auge für die Fenestrierung des Endothels der Choriocapillarisgefäße essentiell ist. Eine unkontrollierte Sekretion kann aber pathogene Folgen wie Neovaskularisation zur Folge haben (Ishibashi *et al.*, 1997; Marneros *et al.*, 2005). Ein starker Auslöser für die Sekretion ist die intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung, an der verschiedene Transporter und Ca²⁺-permeable Kanäle wie der nicht-selektive Kationenkanal TRPV2 und der spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanal Ca_v1.3 mitwirken (Rosenthal *et al.*, 2005; Wimmers *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2010).

Eine besondere Eigenschaft des Auges ist auch, dass es von dem Immunsystem des Blutstroms abgetrennt ist; das Innere des Auges besitzt ein sogenanntes Immunprivileg. Es schützt die empfindlichen Strukturen des Auges, das in seiner Regenerationsfähigkeit limitiert

ist, vor deletären Entzündungsreaktionen. Solche würden die Sehfähigkeit einschränken, zum Beispiel durch Narbenbildungen im Bereich der optischen Achse (Grisanti, 1998; Pleyer, 2014). Für das Immunprivileg ist das RPE mitverantwortlich, das eine zuverlässige funktionelle Barriere zwischen Blut und Auge bildet. Das RPE kann mit dem Immunsystem kommunizieren und entsprechende Reaktionen im Auge durch Sekretion von Immunmodulatoren unterdrücken oder modifizieren (Streilein *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2003).

Aufrechterhaltung des Ionenmilieus im subretinalen Raum

Eine stabile Ionenkomposition im subretinalen Raum ist wichtig für die Erregbarkeit der Photorezeptoren. Unter Lichteinfluss ändern sich in kürzester Zeit die Ionenzusammensetzung und folglich das Volumen im subretinalen Raum. Primär bedeutet das, dass die K^+ -Konzentration im subretinalen Raum sinkt (von 5 auf 2 mmol/l) (Bialek & Miller, 1994; Strauss, 2005). Weil dies die Erregbarkeit der Photorezeptoren beeinträchtigt, muss das K^+ -Defizit zügig kompensiert werden. Hierfür ist das RPE zuständig, das durch adaptive Transportprozesse die Veränderungen behebt, sobald sie auftreten (Steinberg, 1985; Strauss, 2005).

Transepithelialer Transport

Die interzellulären Tight Junctions bewirken einen hohen transepithelialen Widerstand des RPE. Unter diesen Umständen ist kein para-, sondern nur ein transzellulärer Transport von Stoffen über das RPE möglich. Das RPE bildet demnach eine dichte, undurchlässige Blut-Retina-Schranke, die den Stoff- und Informationsaustausch zwischen der Retina und dem Blut selektiert und steuert (Rizzolo, 1997).

Um die Versorgung der Retina zu gewährleisten, werden Nährstoffe vom Blut zur Retina, also von basal nach apikal, transportiert (Strauss, 2005). Der Transport der Glukose erfolgt über die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3 in der basolateralen und apikalen Membran der RPE-Zellen. GLUT3 deckt den Grundbedarf an Glukose; GLUT1 wird bei einem zusätzlichen Bedarf aktiv (Ban & Rizzolo, 2000; Rizzolo, 2008). Weiterhin wird Vitamin A in geringen Mengen aus dem Blut aufgenommen. Es dient unterstützend zum Sehzyklus dem Aufbau von 11-cis-Retinal. Die Aufnahme erfolgt rezeptorvermittelt (Pfeffer *et al.*, 1986). Auch einige essentielle ω -3-Fettsäuren, insbesondere die 22:6 ω -3-Fettsäure Docosahexaensäure, werden aus dem Blut aufgenommen und der Retina zur Verfügung gestellt. Dort werden sie für den Aufbau von Membranen der Neuronen, Photorezeptoren und

Photorezeptorscheiben benötigt (Bazan *et al.*, 1992, 1994). Der Transport von basal nach apikal wird als Sekretion bezeichnet.

Stoffwechselmetabolite, Wasser und Ionen werden hingegen vorrangig vom subretinalen Raum zur Chorioidea transportiert. Der Transport von apikal nach basal wird als Absorption bezeichnet. Die Retina besitzt eine hohe Zelldichte und ist ein sehr aktives Gewebe. Dementsprechend hat sie einen hohen Stoffwechselumsatz, bei dem unter anderem Laktat als metabolisches Endprodukt anfällt (Strauss, 2005). Dieses wird über den Monocarboxylat-Transporter (MCT)1 in der apikalen Membran aus dem subretinalen Raum in das RPE aufgenommen. Über die basolaterale Membran wird es über den MCT3 an die Chorioidea abgegeben (Philp *et al.*, 1998).

Durch die hohe Stoffwechselaktivität der Retina fallen außerdem erhebliche Mengen Wasser an. Zusätzlich führt der intraokuläre Druck zu einem Wassereinstrom von Seiten des Glaskörpers in die Retina. Das überschüssige Wasser wird zum einen aus der inneren Retina über die Müllerzellen, zum anderen aus dem subretinalen Raum über das RPE ins Blut abtransportiert (Simó *et al.*, 2010). Der Wassertransport durch das RPE erfolgt über Aquaporine, vermutlich Aquaporin-1 (Stamer *et al.*, 2003; Juuti-Uusitalo *et al.*, 2013; Schey *et al.*, 2014). Die Eliminierung des Wassers wird hauptsächlich durch den Transport von Cl^- -Ionen angetrieben, der osmotisch Wasser mit sich zieht. Die Antriebskraft für den transepithelialen Transport liefert die Na^+/K^+ -ATPase, die im RPE im Gegensatz zu anderen Epithelien in der apikalen Membran lokalisiert ist. Einwärtsrektifizierende K^+ - (K_{ir} -)Kanäle colokalisieren mit der Na^+/K^+ -ATPase. Das hat eine Zirkulation der K^+ -Ionen und den Transport von Na^+ aus der Zelle zur Folge und erleichtert somit die Aufrechterhaltung eines Na^+ -Gradienten durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (Strauss, 2005; Sparrow *et al.*, 2010). Der Na^+ -Gradient fördert die Aufnahme von Na^+ , K^+ und Cl^- über den $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (Kennedy, 1990; Adorante & Miller, 1990; Joseph & Miller, 1991). Da sowohl Na^+ durch die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität, als auch K^+ durch K_{ir} -Kanäle die Zelle über die apikale Membran direkt wieder verlassen, wird netto primär Cl^- aufgenommen und akkumuliert. Es besitzt eine hohe intrazelluläre Aktivität von etwa 20 bis 60 mM (Wiederholt & Zadunaisky, 1984; Joseph & Miller, 1991).

Cl^- verlässt die RPE-Zelle über die basolaterale Membran. Die Cl^- -Leitfähigkeit der basolateralen Membran ist die Determinante des gesamten transepithelialen Cl^- - und somit Flüssigkeitstransports. Hier sind verschiedene Typen von Cl^- -Kanälen lokalisiert, sodass der transepitheliale Transport an unterschiedliche metabolische Bedürfnisse angepasst werden kann. Während ClC-2 eine Grundleitfähigkeit für Cl^- vermittelt, moduliert CFTR den Cl^- -

Transport vermutlich in Abhängigkeit von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Miller & Farber, 1984; Bösl *et al.*, 2001; Blaug *et al.*, 2003; Hartzell & Qu, 2003). Es wurde außerdem eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Leitfähigkeit der basolateralen RPE-Zellmembran gefunden, die molekulare Identität des zugrundeliegenden Ionenkanals bislang aber nicht aufgeklärt (Ueda & Steinberg, 1994; Strauss *et al.*, 1996; Hartzell & Qu, 2003). Dieser Kanal reguliert den Cl^- -Transport über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Er spielt in erster Linie eine Rolle bei lichtinduzierten Transportprozessen (Gallemore & Steinberg, 1989; Peterson *et al.*, 1997). Die hohe Cl^- -Leitfähigkeit der basolateralen Membran verursacht ein basolateral-negatives transepitheliales Potential von 5 bis 15 mV (Miller & Steinberg, 1977a, 1977b). Entsprechend der erhöhten basolateralen Cl^- -Leitfähigkeit ist das transepitheliale Potential unter Lichteinfluss basolateral negativer.

Die Cl^- -Extrusion wird weiterhin vom pH-Wert des subretinalen Raums und des intrazellulären Milieus der RPE-Zellen beeinflusst. Bei höheren pH-Werten wird HCO_3^- in Richtung des Blutstroms transportiert. Über den apikalen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter wird HCO_3^- in die Zelle aufgenommen und über den basolateralen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher ausgeschleust (Lin & Miller, 1994; Kenyon *et al.*, 1997). Dies reduziert die Cl^- - und Wasserextrusion. Bei niedrigem pH ist es umgekehrt. Der apikale $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter befördert HCO_3^- in den subretinalen Raum. Da HCO_3^- im Austausch gegen Cl^- durch den $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher zuvor aus der Chorioidea aufgenommen wurde, verstärkt dies den Cl^- - und Wassertransport (Dornonville de la Cour, 1993; Edelman *et al.*, 1994; Strauss, 2005).

Der kontinuierliche Strom von Ionen und Wasser bewirkt die Adhäsion der Retina an das RPE.

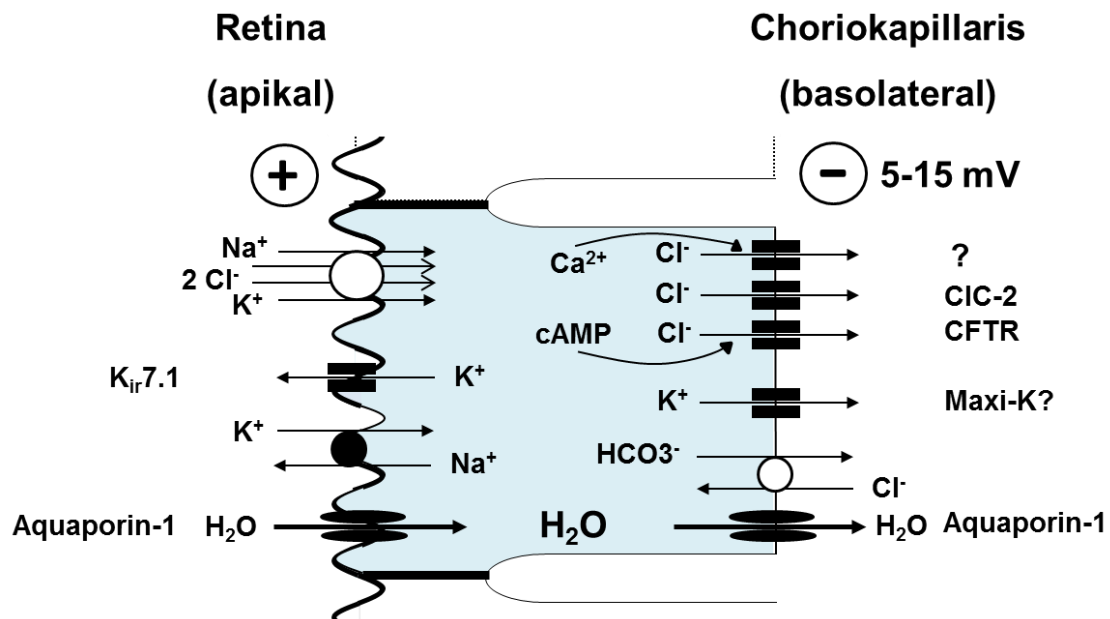


Abbildung 1.7: Transepithelialer Transport im RPE (modifiziert nach Strauss, 2005). Die Antriebskraft des epithelialen Transports stellt die apikal lokalisierte Na⁺/K⁺-ATPase durch Etablierung eines Na⁺-Gradienten zur Verfügung. In die Zelle transportiertes K⁺ verlässt die Zelle direkt über K_{ir}-Kanäle der apikalen Membran wieder. Dies unterstützt die Aufrechterhaltung des Na⁺-Gradienten, der die Aufnahme von K⁺, Na⁺ und Cl⁻ durch den apikalen Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Cotransporter bewirkt. Cl⁻ verlässt die Zelle wieder über verschiedene Cl⁻-Kanäle der basolateralen Membran. Der Cl⁻-Transport von apikal nach basolateral bedingt die Extrusion von Wasser durch Aquaporine aus dem subretinalen Raum in die Choriocapillaris. Die Effizienz des Cl⁻-Transports wird durch die Aktivität des HCO₃⁻/Cl⁻-Austauschers gemindert. Bei intrazellulärer Azidifizierung ist die Aktivität des HCO₃⁻/Cl⁻-Austauschers jedoch vermindert und der Cl⁻- und Wassertransport erhöht. CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CIC-2: *chloride channel protein 2*, K_{ir}: *inwardly rectifying K⁺ channel*.

1.3.3 Funktionen der Cl⁻-Kanäle und assoziierte Erkrankungen im RPE

Die einwandfreie Funktion des RPE ist essentiell, um die Integrität der Retina und somit das Sehvermögen zu erhalten. Fehler beim transepithelialen Transport können in die Pathogenese verschiedener retinaler Erkrankungen eingebunden sein. Im Zentrum steht die basolaterale Leitfähigkeit von Cl⁻, die der ausschlaggebende Faktor für den Transport ist. Verschiedene Ionenkanäle sind an dieser Leitfähigkeit beteiligt.

Der CIC-2-Kanal dient der Cl⁻-Grundleitfähigkeit des RPE. Versuche an CIC-2-Knockout-Mäusen zeigten, dass Fehlen des Kanals einen Verlust der Cl⁻-Leitfähigkeit und des transepithelialen Potentials bewirkt (Bösl *et al.*, 2001). Das könnte wiederum die Entsorgung von Laktat aus dem subretinalen Raum stören, was zu Stress und Degeneration der Photorezeptoren führt. Die retinalen Degenerationen, die sich in den CIC-2-Knockout-Mäusen entwickelten, waren phänotypisch mit Retinitis pigmentosa, einer vererbten retinalen Dystrophie, vergleichbar (Jentsch *et al.*, 2002; Strauss, 2005).

Weiterhin wird im RPE der cAMP-aktivierte CFTR-Cl⁻-Kanal exprimiert, wo er unter anderem in der basolateralen Membran lokalisiert ist (Blaug *et al.*, 2003). Bei CFTR-Knockout-Mäusen, CFTR-Mutanten-Knockin-Mäusen und Patienten mit der Diagnose der zystischen Fibrose ist der Cl⁻-Transport des RPE vermindert. Das äußert sich in einer Reduktion der „Fast oscillation“-Phase, eine Hyperpolarisation der basolateralen RPE-Zellmembran durch eine verminderte Cl⁻-Aktivität, der Lichtreaktion im Gleichstromelektroretinogramm (dc-ERG; *direct current electroretinogram*) beziehungsweise Elektrookulogramm (EOG). Dennoch treten aber weder in Mäusen mit veränderter CFTR-Expression noch bei Patienten mit zystischer Fibrose retinale Degenerationen auf (Lara *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). Der Kanal scheint demnach am transepithelialen Cl⁻-Transport beteiligt zu sein, ist aber im Vergleich zu ClC-2 nicht essentiell für die Funktionsfähigkeit des RPE.

Für den Ca²⁺-abhängigen Cl-Kanal CaCC im RPE stellt sich das gegenteilige Problem: Man weiß, dass er funktionell relevant ist, konnte ihn aber bislang nicht auf molekularer Ebene identifizieren. Die Hauptfunktion des CaCC ist der Ausgleich des lichtbedingten Volumenanstiegs im subretinalen Raum. Durch seine Aktivierung durch die Light-Peak-Substanz, wahrscheinlich Adenosintriphosphat (ATP), steigt die Cl⁻-Leitfähigkeit der basolateralen RPE-Membran und folglich die Wasserabsorption. Die Aktivierung des CaCC bewirkt eine Depolarisation der basolateralen RPE-Membran, die den Hellanstieg (Light-Peak) im EOG widerspiegelt (Gallemore & Steinberg, 1993). Ein Fehlen oder eine Verminderung dieses Light-Peaks kann bei der „Best’schen vitelliformen Makuladystrophie“ (BVMD, Morbus Best) beobachtet werden. Die BVMD ist eine autosomal dominant vererbte, juvenile Erkrankung der Netzhaut. Sie wird mit einer Mutation von VMD2, dem Gen von Bestrophin-1 (Best1), assoziiert (Petrukhin *et al.*, 1998; Marquardt *et al.*, 1998). Da der Light-Peak auf der Aktivität des CaCC beruht, ist ein verminderter Light-Peak vermutlich auf eine Störung des CaCC oder seiner Aktivierung zurückzuführen (Strauss, 2005; Arden & Constable, 2006). Ein reduzierter epithelialer Cl⁻-Transport könnte durch extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung die für Morbus Best typischen Läsionen bewirken (Strauss, 2005).

1.3.4 Der CaCC im RPE

Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten die Existenz des CaCC im RPE, indem sie Patch-Clamp-Versuche und Messungen des transepithelialen Transports durchführten. Die Ströme des CaCC zeigen eine Auswärtsrektifikation, eine zeitabhängige Aktivierungskinetik und sind sensitiv gegenüber Cl⁻-Kanalinhibitoren wie Fenamaten und DIDS. Aktiviert werden sie durch einen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg, den extrazelluläres ATP oder Epinephrin

verursachen. Ursprünglich wurde vermutet, dass Best1 der verantwortliche CaCC ist. Die biophysikalischen Eigenschaften von Best1-Cl⁻-Strömen stimmen allerdings nicht mit denen des CaCC im RPE überein. Außerdem tritt in Best1-Knockout-Mäusen sowie in Mäusen mit mutiertem Best1-Gen weder eine veränderte Cl⁻-Leitfähigkeit noch ein verminderter Light-Peak auf (Marmorstein *et al.*, 2006). Bei der pathologischen Light-Peak-Reduzierung bei Morbus Best scheint demnach nicht Best1, sondern ein anderer, bislang unbekannter CaCC die Hauptrolle zu spielen.

Vor weniger als 10 Jahren wurde eine weitere Ca²⁺-abhängige Proteinfamilie entdeckt: die TMEM16-Familie oder Anoctamine (Anos). Bislang konnten zwei Vertreter als CaCCs identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Anoctamin-1 (Ano1) und Anoctamin-2 (Ano2). Beide sind, wie auch der CaCC im RPE, sensitiv gegenüber Fenamaten und DIDS. Ferner zeigen sie beide auswärtsrektifizierende Ströme, wobei speziell Ano2 und der CaCC im RPE eine große Übereinstimmung in weiteren biophysikalischen Eigenschaften wie der Aktivierungskinetik aufweisen. Im Folgenden soll die Familie der Anoctamine kurz vorgestellt werden.

1.4 Anoctamine

Anoctamine (Anos, TMEM16) sind eine Familie Ca²⁺-regulierter Proteine. In Säugern sind zehn Mitglieder bekannt, Anoctamin-1 (Ano1) bis -10 (Ano10) (auch *transmembrane protein* (TMEM)16A bis -K). Der erste Vertreter, Ano1, auch als TMEM16A bezeichnet, konnte 2008 als CaCC identifiziert werden (Schroeder *et al.*, 2008; Caputo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Der ursprüngliche Name TMEM16 wurde daraufhin in Anoctamin umgeändert. Der Grund war, dass man davon ausging, dass sämtliche Mitglieder der Familie als CaCC funktionierten, also **An**ionen leiteten, und aus acht (griechisch „**octo**“) Transmembrandomänen bestünden. Beides wurde inzwischen jedoch widerlegt. X-Ray-Kristallstrukturanalysen eines Anoctamins im Pilz *Nectria haematococca* zeigten, dass das entsprechende Anoctamin, nhTMEM16, als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten funktioniert, und dass eine Untereinheit nicht acht, sondern zehn Transmembrandomänen enthält (Abbildung 1.8) (Brunner *et al.*, 2014). Wie genau die Ionen permeieren, ist jedoch noch nicht geklärt (Abbildung 1.8). Zum anderen ist mittlerweile bekannt, dass nicht alle Anoctamine Anionen-permeabel sind. Lediglich die beiden Vertreter Ano1 und Ano2 fungieren als CaCC (Brunner *et al.*, 2016; Whitlock & Hartzell, 2017). Anoctamin-3 bis -10 scheinen hingegen Scramblase-Aktivität zu besitzen.

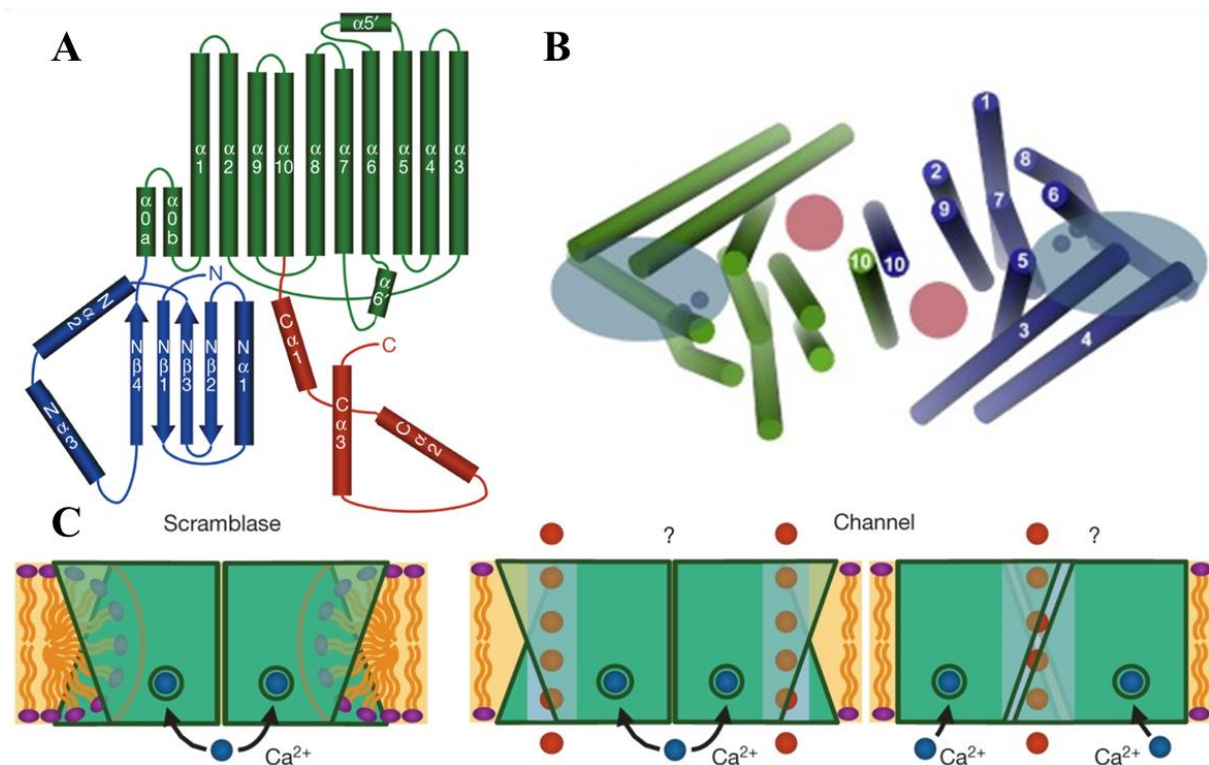


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Anoctamine (nach Brunner *et al.*, 2014, 2016). A: Topologie einer nhTMEM16-Untereinheit. Dargestellt sind die Transmembrandomänen (grün), der N-Terminus (blau) und C-Terminus (rot). B: Dimerenanordnung (jeweils ein Dimer blau und grün) der Transmembranhelices als Aufsicht von extrazellulärer Seite. Die Kavitäten des Dimers (rot) und Untereinheiten (blau, Aquädukt) sind eingezeichnet. C: Mögliche Organisation der Anoctamine als Scramblasen (links) und Ionenkanäle (Mitte und rechts), für den Fall, dass die Permeation von Phosphatidylserin und Ionen über die Aquädukte verläuft. Die Aquädukte des Dimers könnten zwei separate Ionenporen bilden (Mitte) oder sich zu einer monomeren Pore zusammenlagern (rechts).

Scramblasen sind membranständige Proteine, die Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Oberfläche der entsprechenden Membran auf die äußere beziehungsweise luminalen Seite transportieren. In der Zytoplasmamembran kann dies Vorgänge wie die Apoptose oder Blutkoagulation auslösen (Bever *et al.*, 1982; Fadok *et al.*, 1992). Nicht funktionstüchtiges Ano6 ist eine mögliche Ursache des Scott-Syndroms (Suzuki *et al.*, 2010). Für Ano6 wurde neben einer Funktion als Scramblase jedoch auch die eines nicht-selektiven Kationenkanals sowie eines Cl^- -Kanals beschrieben (Martins *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Es ist nicht geklärt, ob die Scramblase-Aktivität mit einem Ionenleckstrom verbunden ist oder ob Ano6 tatsächlich funktionelle Ionenkanäle formen kann (Kmit *et al.*, 2013; Scudieri *et al.*, 2015).

Die CaCCs Ano1 und Ano2 sind physiologisch besser erforscht als ihre Familienmitglieder. Ano1 wird unter anderem im Atemwegsepithel, im Darmepithel und interstitiellen Cajal-Zellen, in Hinterwurzelganglien, in pankreatischen β -Zellen und in der Niere exprimiert (Zhu *et al.*, 2009; Namkung *et al.*, 2011; Ousingsawat *et al.*, 2011; Cho *et*

al., 2012; Huang, Zhang, *et al.*, 2012; Buchholz *et al.*, 2014; Crutzen *et al.*, 2016). Entsprechend wird eine Beteiligung an der pulmonalen und intestinalen Mucinsekretion, Darmmotilität, Nozizeption und Insulinsekretion angenommen. Ano1 spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Zellproliferation und -migration; in diesem Zusammenhang ist es vermutlich an der Tumorgenese beteiligt (Duran & Hartzell, 2011; Pedemonte & Galletta, 2014; Jang & Oh, 2014; Oh & Jung, 2016).

Ano2 wird in erster Linie mit sensorischen Transduktionen in Verbindung gebracht. Es wird in den Endigungen der Photorezeptorsynapsen, in olfaktorischen sensorischen Neuronen sowie in Geschmackszellen funktionell exprimiert und könnte dort in die Signalübertragung involviert sein (Stöhr *et al.*, 2009; Stephan *et al.*, 2009; Billig *et al.*, 2011; Cherkashin *et al.*, 2016). Außerdem wurde Ano2 im Kleinhirn und im Hippocampus identifiziert, wo es die synaptische Transmission moduliert (Huang, Xiao, *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

Ano1 und Ano2 werden unter anderem durch allgemeine Cl⁻-Kanal-Blocker wie Nifluminsäure und DIDS inhibiert. Aktuell wird an der Entwicklung selektiver Inhibitoren gearbeitet, um die weitere Identifizierung und Aufklärung der physiologischen Funktionen dieser Kanäle zu vereinfachen.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Voraussetzung für eine unverminderte Sehfähigkeit sind die intakte Funktion der Retina sowie die Transparenz der Linse. Hierbei spielt ein kontrollierter Transport von Ionen und Wasser eine entscheidende Rolle, der in der Retina primär durch das RPE und in der Linse durch das Linsenepithel reguliert wird. Das Linsenepithel besitzt eine Leitfähigkeit für Kationen, die fehlreguliert zum Transparenzverlust führen kann, über deren molekulare Hintergründe bislang aber nur wenig bekannt ist. Im RPE nimmt ein CaCC eine wichtige Rolle beim transepithelialen Transport ein, dessen molekulare Identität zu Beginn der Arbeit ungeklärt war. Ich vermute, dass im Linsenepithel Ca^{2+} -aktivierte nicht-selektive Kationenkanäle funktionell exprimiert werden, die der Anoctamin- oder TRP-Familie angehören. Weiterhin vermute ich, dass es sich bei dem CaCC im RPE um Ano2 handelt, das prägnante Ähnlichkeiten mit diesem aufweist.

Um die oben formulierten Hypothesen zu prüfen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der molekularen Identifizierung von Ca^{2+} -aktivierten Kationenkanälen in der Linse und des CaCC im RPE. Des Weiteren soll der modulierende Einfluss pathogener Faktoren untersucht werden. Die Arbeit wird zu diesem Zweck in zwei Teile gegliedert:

1. In humanen Linsenepithelzellen wird untersucht, ob eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung die Aktivierung von Kationenkanälen bewirkt. Zur molekularen Identifizierung werden die Ionenkanäle biophysikalisch und pharmakologisch charakterisiert und mit endogen exprimierten Ca^{2+} -aktivierten Kationenkanälen verglichen. Es wird getestet, welchen Einfluss kataraktogene Faktoren auf die Leitfähigkeit ausüben.
2. Mithilfe einer pharmakologischen und biophysikalischen Charakterisierung sowie siRNA-Knockdown wird getestet, ob Ano2 der ATP-aktivierte CaCC in RPE-Zellen ist. Abschließend wird analysiert, in welchem Ausmaß verschiedene TRPV2-Aktivatoren und -Inhibitoren die Leitfähigkeit von RPE-Zellen beeinflussen, in denen TRPV2 als Ca^{2+} -permeabler Ionenkanal im RPE an der Aktivierung des CaCC beteiligt sein könnte.

Die Versuche werden an Zelllinien durchgeführt und an primär kultivierten Linsenepithel- und RPE-Zellen überprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht gesondert gekennzeichnet, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Cayman Chemical (Ann Arbor, USA), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) und Tocris (Bristol, Großbritannien) bezogen.

2.2 Herstellung von Lösungen und Puffern

Falls nicht gesondert aufgeführt, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Cayman Chemical (Ann Arbor, USA), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) und Tocris (Bristol, Großbritannien) bezogen. Für die Lösungen wurde entionisiertes Wasser (dH₂O) verwendet. Die Lösungen der Patch-Clamp-Versuche wurden mit Wasser zu Injektionszwecken hergestellt und nach der Herstellung gefiltert.

2.2.1 PCR

<u>TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer 50x</u> (Elektrophoresepuffer)	242,0 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100,0 ml	EDTA 0,5 M (pH 8)

Auf 1 l mit dH₂O auffüllen.

2.2.2 Western Blot

<u>Lysepuffer</u>	0,9 g	NaCl
Nach Rosenthal <i>et al.</i> (2001)	5,0 ml	Tris-HCl
	0,018 g	Natriumorthovanadat
	0,002 ml	NaF

pH 7,6 mit NaOH

	0,2 ml	Triton X-100 5%
	0,5 g	Natriumdesoxycholat
	0,05 ml	EDTA 5mM
	0,25 ml	SDS 20%

Auf 100 ml mit dH₂O auffüllen.

Frisch hinzugeben:

	0,1 ml	Aprotinin
	1,0 ml	PIC

<u>Sammelgel</u>	5,7	ml	dH ₂ O
(Polyacrylamid-Gelelektrophorese = PAGE)	1,7	ml	Acrylamid 30%
	2,5	ml	Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)
	0,1	ml	SDS 10%
	0,05	ml	APS 10%
	0,005	ml	TEMED

<u>Trenngel</u>	8%:	4,7	ml	dH ₂ O
(PAGE)		2,7	ml	Acrylamid 30%
	oder 10%:	4,1	ml	dH ₂ O
		3,3	ml	Acrylamid 30%
		2,5	ml	Tris 1,5 M (pH 8,8)
		0,1	ml	SDS 10%
		0,05	ml	APS 10%
		0,005	ml	TEMED

<u>Laufpuffer</u>	25	mM	Tris
(PAGE)	190	mM	Glycin
	0,1	%	SDS

<u>Tranferpuffer</u>	20	%	Methanol
(Proteintransfer)	25	mM	Tris
	190	mM	Glycin
	0,1	%	SDS

Auf 4 °C runterkühlen bis zur Nutzung.

<u>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10x</u>	200	mM	Tris
	1,5	M	NaCl
	Auf etwa 800 ml dH ₂ O auffüllen, pH 8,1-8,5 einstellen, dann auf Gesamtvolumen von 1 l auffüllen.		

<u>TBS-Tween (TBST)</u>	1	l	TBS
	500	µl	Tween 20%

2.2.3 Immunzytochemie

<u>TBS 10x</u>	100	mM	Tris
	46	mM	Tris-HCl
	1,5	M	NaCl
	Auf etwa 800 ml dH ₂ O auffüllen, pH 7,6 einstellen, dann auf Gesamtvolumen von 1 l auffüllen.		

2.2.4 Patch-Clamp-Versuche

Badlösungen

Nach Fox <i>et al.</i> (1988)	K ⁺ -haltig	K ⁺ -frei	frei von monovalenten Kationen
136,43 mM	NaCl	NaCl	NMDG-Cl
1,1 mM		Na ₂ HPO ₄	
4,17 mM		NaHCO ₃	
0,89 mM		MgCl ₂	
0,95 mM		CaCl ₂	
5,8 mM	KCl	TEA-Cl	TEA-Cl
25,0 mM		HEPES	
11,1 mM		Glukose (am Versuchstag hinzugefügt)	

Einstellen auf pH 7,2 mit Tris und filtrieren.

Pipettenlösungen mit hohem Cl⁻-Gehalt

Nach Fox <i>et al.</i> (1988)	K ⁺ -haltig	K ⁺ -frei	frei von monovalenten Kationen
100,0 mM	KCl	CsCl	NMDG-Cl
10,0 mM	NaCl	NaCl	NMDG-Cl
2,0 mM		MgSO ₄	
0,5 mM		CaCl ₂	
5,5 mM		EGTA	
10,0 mM		HEPES	

Einstellen auf pH 7,2 mit KOH bzw. CsOH und sterilfiltrieren.

Pipettenlösungen mit niedrigem Cl⁻-Gehalt

Nach Fox <i>et al.</i> (1988)	K ⁺ -haltig	K ⁺ -frei	frei von monovalenten Kationen
80,0 mM	Kalium-Gluconat	Cäsium-MeSO ₄	NMDG-Gluconat
30,0 mM		NaCl	
2,0 mM		MgSO ₄	
0,5 mM		CaCl ₂	
5,5 mM		EGTA	
10,0 mM		HEPES	

Einstellen auf pH 7,2 mit KOH bzw. CsOH und sterilfiltrieren.

Für Versuche, bei denen H₂O₂ als Stimulanz verwendet wurde, wurden 2,3 mM CaCl₂ hinzugefügt (freie Ca²⁺-Konzentration von 150 nM (<http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-NIST-Plot.htm>)).

Badlösung der TRPV2-Versuche

130,0 mM	NaCl
5,0 mM	CsCl
2,0 mM	MgCl ₂
2,0 mM	CaCl ₂
10,0 mM	HEPES
5,0 mM	Glukose (am Versuchstag hinzugefügt)

Einstellen auf pH 7,3 mit NaOH und filtrieren.

<u>Pipettenlösung der TRPV2- Versuche</u>	140,0 mM	CsCl
	2,0 mM	MgCl ₂
	1,0 mM	CaCl ₂
	2,5 mM	EGTA
	10,0 mM	HEPES

Einstellen auf pH 7,2 mit KOH und sterilfiltrieren.

2.3 Zelllinien

Bei der Mehrheit der Experimente wurde mit den Zelllinien HLE B-3 (CRL-1142; ATCC, Wesel, Deutschland) oder ARPE-19 (CRL-2302; ATCC) gearbeitet.

Die humane Linsenepithelzelllinie B-3 (HLE B-3) wurde aus der Linse eines Säuglings mit Frühgeborenenretinopathie gewonnen und mithilfe des Virushybriden Adenovirus 12/Semianvirus 40 immortalisiert. Die Zellen zeigen Linsen-spezifische Eigenschaften wie die Synthese von β - und γ -Kristallinen (Andley *et al.*, 1994; Fleming *et al.*, 1998).

Bei ARPE-19 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanen RPE-Zellen mit diploidem Chromosomensatz. Sie entstammen den normalen Augen eines 19-jährigen männlichen Patienten und wurden durch selektive Trypsinierung isoliert. Die Immortalisierung erfolgte spontan. ARPE-19 Zellen formen stabile „Monolayer“ mit morphologischer und funktioneller Polarität. Sie exprimieren RPE-spezifische Marker wie CRALBP (*cellular retinaldehyde-binding protein*) und RPE-65 und gelten als repräsentativ, weshalb sie in zahlreichen Studien zum RPE verwendet wurden (Dunn *et al.*, 1996).

2.4 Gewebepräparation, Zellkultur und Transfektion

2.4.1 Allgemeines

Jegliche Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt (HERAsafe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Um die Sterilität aller verwendeten Materialien sicherzustellen, wurden sie zuvor autoklaviert oder es wurden sterile Einmalartikel verwendet. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Wasserdampf-gesättigten Begasungsbrutschrank (HERAcell, Thermo Fisher Scientific) bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 %.

2.4.2 Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen Konfluenz erreichten, wurden sie passagiert. Dafür wurden sie durch etwa 3-minütige Inkubation mit 0,05 % Trypsin - 0,02 % EDTA vom Gefäßboden abgelöst und die

Trypsinwirkung im Anschluss durch Zugabe von Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und anschließend bei 800 Umdrehungen pro Minute (RPM) 5 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und erneut in ein Gefäß überführt und kultiviert. Die Zellen wurden im Durchschnitt alle 3 bis 4 Tage passagiert. Im Falle eines späteren Passagierens wurde nach 3 bis 4 Tagen ein Mediumswechsel durchgeführt, indem Dreiviertel des verbrauchten Mediums durch neues ersetzt wurde.

2.4.3 Gewinnung und Kultivierung primärer Maus-RPE-Zellen

Die Präparation und anschließende Kultivierung von murinen RPE-Zellen aus 6 bis 8 Wochen alten C57/BL6J-Mäusen wurde von Dr. Christophe Roubex durchgeführt. Nachdem die Zellen gewonnen worden waren, wurden sie auf 12-mm Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific) in Vertiefungen von 12-Loch-Platten kultiviert. 4 bis 12 Tage nach Präparation wurden die Zellen für elektrophysiologische Experimente verwendet.

2.4.4 Gewinnung und Kultivierung von Linsenepithelzellen aus kindlichen Vorderkapseln

Die kindlichen Vorderkapseln wurden unter sterilen Bedingungen im Verlauf von Kataraktextraktionen bei Kindern unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine Petrischale (Durchmesser: 35 mm, „tissue-culture treated“, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Kapsel wurde zunächst mit einem Tropfen Kulturmedium und anschließend mit einem Deckglas (Durchmesser: 15 mm, Thermo Fisher Scientific, USA) bedeckt, auf das wiederum ein Tropfen Medium gegeben wurde. Als Kulturmedium diente DMEM/Ham-F12 (Sigma-Aldrich), versetzt mit 20 % fetalem Kälberserum (FKS, PAA, Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, PAA). Im Falle einer Proliferation der Zellen, wurden sie nach 13 bis 21 Tagen passagiert und für weitere Experimente vorbereitet.

2.4.5 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden nach dem Auftauen mindestens dreimal passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Die Kultivierung erfolgte in DMEM/Ham-F12, versetzt mit 10 % FKS und 1 % P/S. Nach maximal 20 Passagen wurden die Zellen entsorgt.

2.4.6 Stimulierung mit TGF β 2

Einige Versuche erforderten die Stimulierung von HLE B-3 Zellen mit TGF β 2. Vorbereitend wurden die Zellen über Nacht DMEM/Ham-F12 ohne Serumzusatz kultiviert. Am

darauffolgenden Tag wurde das serumfreie Medium mit 10 ng/ml TGF β 2 (Sigma-Aldrich) versetzt und die Zellen 48 Stunden inkubiert. Mit den Zellen, die als Kontrolle dienen sollten, wurde auf die gleiche Weise verfahren, allerdings wurde dem serumfreien Medium kein TGF β 2 hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen für Experimente verwendet.

2.4.7 siRNA-Transfektion

Es wurden handelsübliche, Alexa 488-markierte Duplex-siRNAs von der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Allen siRNAs war der fluoreszierende Farbstoff Alexa Fluor 488 angehängt, wodurch sich anhand einer bestehenden Fluoreszenz der Erfolg der Transfektion in den Zellen überprüfen lässt. Zur Runterregulierung von Ano2 und Anoctamin-4 (Ano4) wurde eine Mischung aus drei verschiedenen siRNAs gegen dieses Target verwendet. Als Kontrolle diente eine handelsübliche siRNA mit zufälliger, funktionsloser Nukleotidsequenz.

ARPE-19 Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium ausgesät und bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte kultiviert. Für Patch-Clamp-Versuche wurde eine sehr geringe Zelldichte in Vertiefungen von 24-Loch-Platten verwendet, die eine Messung von isolierten Zellen an den folgenden beiden Tagen ermöglichte. Um Proben für PCR oder Western Blot zu gewinnen, wurden die Zellen bei einer Dichte von etwa 50 % in Vertiefungen 6-Loch-Platten transfiziert. Gemäß den Herstellerangaben wurden Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) und die entsprechenden siRNAs in separaten Tubes mit serum-reduziertem Medium (Opti-MEM, Thermo Fisher Scientific) verdünnt, 5 Minuten lang stehen gelassen und anschließend gemischt. Das Gemisch wurde 20 Minuten inkubiert, um eine Liposomenbildung zu bewirken, bevor es vorsichtig dem bereits auf den Zellen vorhandenen Medium hinzugefügt wurde. Die resultierenden Verdünnungen von Transfektionsreagenz und Gesamt-siRNA betragen 1:600, was im Falle der siRNA eine Konzentration von 30 nM ergibt. Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Liposomen-versetzte Medium vorsichtig gegen frisches Antibiotika-freies Medium ausgetauscht. Für die Patch-Clamp-Versuche wurden die Zellen 24 bis 48 Stunden nach begonnener Transfektion verwendet. Es wurden immer parallel Kontroll- und Target-siRNA-transfizierte Zellen vorbereitet und vermessen. Die Zellen, die zur Herstellung der Zelllysate für PCR und Western Blot genutzt wurden, wurden nach jeweils 36 bis 48 Stunden beziehungsweise 48 bis 72 Stunden weiterverarbeitet. Vor Verwendung wurden die Zellen unter einer Fluoreszenzlampe (Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar, Deutschland) auf Gelingen der Transfektion überprüft.

siRNA	Target	Bezugsquelle
HSS125972	Ano2	Thermo Fisher Scientific
HSS125973		
HSS183697		
HSS133556	Ano4	Thermo Fisher Scientific
HSS133557		
HSS174644		
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Kein Target	Thermo Fisher Scientific

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Zuletzt wurde die Qualität und Konzentration der RNA-Probe am Mikro-Volumen Spektralphotometer (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific) bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Im Fall der Isolierung aus primären Linsenepithelzellen wurde die TRIzol-Methode verwendet, durchgeführt von der medizinischen Doktorandin Laura Wernecke. Primaten-RPE (*Callithrix jacchus*) wurde aus der Experimentellen Ophthalmologie des Uniklinikums Münster bezogen. Ratten-RPE wurde von Dr. Nadine Reichhart und Gabriele Fels isoliert. Die RNA sowohl von Primaten- als auch Ratten-RPE wurde von Gabriele Fels isoliert.

2.5.2 Reverse Transkription der RNA

Um cDNA als Template für die nachfolgende PCR zu gewinnen, wurde RNA, im Normalfall 1 µg, mithilfe des QuantiTect-Kits für Reverse Transkriptase (Qiagen) umgeschrieben. Dabei wurde unter Verwendung eines Thermocycler (PTC 100, MJ Research Inc., Bio-Rad, München, Deutschland) gemäß dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die vollständig umgeschriebene cDNA wurde zu 10 ng/µl mit RNase freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Proben von muriner Retina, murinem RPE wurden von Dr. Norbert Kociok bezogen.

2.5.3 Primer

Es wurden Primerpaare aus Vorwärts- (F) und Rückwärtsprimer (R) verwendet, die in vorherigen Publikationen bereits positiv getestet wurden. Alternativ wurden Primerpaare auf der Basis von Sequenzen aus der Sequenzdatenbank GenBank des NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) mithilfe des Programms Primer-Blast (Ye *et al.*, 2012) ausgewählt, die nach Möglichkeit einen Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt von 50 bis 60 %

und eine Schmelztemperatur zwischen 57 und 63 °C aufwiesen. Alle Primer, mit Ausnahme der TaqMan-Primer, wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Das Primerlyophilisat wurde in RNase-freiem Wasser zu einer Stammlösung von 100 µM gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Primer		Basensequenz 5' → 3'	Fragment- größe (bp)	Quelle
hsAno1	F	CGACTACGTGTACATTTTCCG	445	Kmit <i>et al.</i> , 2013
	R	GATTCGGATGTCTTTGGCTC		
hsAno2	F	CAACCAGTCTGCTGTCCAGA	101	-
	R	GGTAACCTGGGAAACGATCC		
cjAno2	F	GGACACCTTCTTTGATAATGC	414	-
	R	GCATTCTGCTGGTCACACAT		
mmAno2	F	ATGTCTACGTGTTTCGACGGTTA	665	Sagheddu <i>et al.</i> , 2010
	R	AAACTGAACCTCCTGGTCGAA		
rnAno2	F	GCCCTCCTCAACAATGTCATCGAA	510	Dauner <i>et al.</i> , 2013
	R	GATCTGGTCGCTGATGTCTGTCGG		
hsAno6	F	GGAGTTTTGGAAGCGACGC	325	Kmit <i>et al.</i> , 2013
	R	GTATTTCTGGATTGGGTCTG		
hs-/cj- GAPDH	F	TCAAGACCACTTTGTCAAGCTCA	119	Kociok <i>et al.</i> , 2002
	R	GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT		
mm-/rn- GAPDH	F	AACTTTGTGAAGCTCATTTCCTGGTAT	122	Kociok <i>et al.</i> , 2006
	R	CCTTGCTGGGCTGGGTGGT		
hsMCOLN1	F	CGGATGACACCTTCGCAGCCTAC	108	Shen <i>et al.</i> , 2012
	R	ACGCATACCGGCCAGTGACAC		
hsPKD1	F	CGCCGCTTCACTAGCTTCGAC	260	Dalagiorgou <i>et al.</i> , 2013
	R	ACGCTCCAGAGGGAGTCCAC		
hsPKD2	F	GTGAAATCTGACTTGGCACAG	824	Miyagi <i>et al.</i> , 2009
	R	TTCCACCTGCACCTTCCA		
hsPKD2L1	F	GCTGCTGCCTCCATATCTGT	105/	-
	R	CCCTCAGGGTGGTCTTGATA	127	
hsTRPC3	F	TGTTCAATGCCTCAGACAGG	343	Wenning <i>et al.</i> , 2011
	R	AGTGTCACCTCACTGAGGTC		
hsTRPC5	F	TGATCGGCAATAAGCTGATAGG	138	Jiang <i>et al.</i> , 2013
	R	CAATGTGAAAGCCAGACACGA		
hsTRPM2	F	TCGGACCCAACCACACGCTGTA	339	Zhang <i>et al.</i> , 2003
	R	CGTCATTCTGGTCCTGGAAGTG		
hsTRPM4	F	CCTCTTTGGCGAGTGCTATC	222	Tran <i>et al.</i> , 2014
	R	CAAAAGAAGGCGAGAACCAG		
hsTRPM5	F	GAGGTGGTTTAGATGGCTGGG	340	-
	R	AGTTTCCAGGTAGGGATGCG		

2.5.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR-Versuche wurden auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt. Für die Untersuchung der Ano1- und Ano2-Expression in verschiedenen Spezies wurde der 2xRed Master Mix (Stratec, Berlin, Deutschland) verwendet. Jeder Ansatz bestand aus 15,5 µl MasterMix, 11 µl RNase-freiem Wasser, jeweils 1,2 µl Rückwärts- und Vorwärtsprimer sowie 2 µl cDNA beziehungsweise Wasser. Es wurde das unten stehende Protokoll im iCycler (Bio-Rad) angewandt.

5 Minuten	95 °C	}	1x
20 Sekunden	95 °C		40 x
20 Sekunden	60 °C		
30 Sekunden	72 °C		
5 Minuten	72 °C		1x
∞	4 °C		

Die übrigen RT-PCR-Versuche wurden mit dem SYBR Green PCR Kit (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt und 1 µl cDNA wurde pro Reaktionsansatz von 25 µl verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß unten stehendem Protokoll im Rotorgene Q (Qiagen) durchgeführt.

5 Minuten	95 °C	}	1x
15 Sekunden	95 °C		40x
20 Sekunden	60 °C		
20 Sekunden	72 °C		

2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA wurde mit Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen (1,5 % Agarose in 1x TAE-Puffer) durchgeführt. Die Proben wurden 5 zu 1 mit 6-fach Ladepuffer (6x Orange DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Bei einer angelegten Spannung von 90 V wurde das Gel 43 Minuten in TAE-Puffer laufen gelassen. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mithilfe eines UV-Transilluminators ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und einer Videokamera dokumentiert.

2.5.6 SYBR Green-basierte quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Expression verschiedener Gene wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green unter Verwendung des SYBR Green PCR Kits (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll quantifiziert. Auch bei der qPCR wurden 10 ng entsprechend 1 µl cDNA pro Reaktionsansatz

von 25 µl verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 40 Zyklen gemäß unten stehendem Protokoll im Rotorgene Q in Triplets durchgeführt. Als Negativkontrolle für jedes Primer-Paar wurde zu einem Reaktionsansatz RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzugefügt.

5 Minuten	95 °C	1x
15 Sekunden	95 °C	} 40 x
20 Sekunden	60 °C	
20 Sekunden	72 °C	

Erhöhung von 72 °C auf 95 °C in Schritten von 1 °C zur Erstellung einer Schmelzpunktkurve.

2.5.7 TaqMan-basierte qPCR

Bei der qPCR von Ano2 in ARPE-19 Zellen mittels SYBR Green traten Primerdimere auf, die eine verlässliche Quantifizierung nicht ermöglichten. Daher wurden bei dieser Versuchsreihe sogenannte TaqMan Assays für Ano2 (Hs00220570_m1, Thermo Fisher Scientific) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Hs02758991_g1, Thermo Fisher Scientific) und der entsprechende Master Mix (TaqMan Universal Master Mix II, with UNG, Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Die Zubereitung der Reaktionsansätze erfolgte nach den Herstellerangaben, wobei 3 µl cDNA pro Ansatz von 20 µl verwendet wurde. Die Amplifizierung erfolgte im Rotorgene Q gemäß folgendem Protokoll:

2 Minuten	50 °C	1x
10 Minuten	95 °C	1x
15 Sekunden	95 °C	} 45x
60 Sekunden	72 °C	

Erhöhung von 72 °C auf 95 °C in Schritten von 1 °C zur Erstellung einer Schmelzpunktkurve.

2.5.8 Auswertung der Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung

Es wurde die vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) gewählt, um sämtliche qPCR-Experimente auszuwerten. Bei dieser Methode wird die Expression eines Zielgens unter Zuhilfenahme eines Referenzgens einer Probe zu einer Kontrolle normalisiert.

Die Berechnung ist wie folgt:

$$(1) \Delta C_T[\text{Kontrolle}] = C_T[\text{Zielgen; Kontrolle}] - C_T[\text{GAPDH; Kontrolle}]$$

$$\Delta C_T[\text{Probe}] = C_T[\text{Zielgen; Probe}] - C_T[\text{GAPDH; Probe}]$$

$$(2) \text{ Bilden des Mittelwertes und des Standardfehlers aller } \Delta C_T[\text{Kontrolle}] \text{ und } \Delta C_T[\text{Probe}]$$

$$(3) \Delta\Delta C_T[\text{Probe}] = \Delta C_T[\text{Probe}] - \Delta C_T[\text{Kontrolle}]$$

$$(4) 2^{(-\Delta\Delta C_T[\text{Probe}])}$$

→ x-fache Änderung der mRNA-Expression des Zielgens von Probe zu Kontrolle

Berechnung des Fehlerintervalls für den $2^{(-\Delta\Delta C_T[\text{Probe}])}$ -Wert:

Obere Grenze = $2^{(-\Delta\Delta C_T[\text{Probe}] + \text{SEM von } \Delta C_T[\text{Probe}])}$

Untere Grenze = $2^{(-\Delta\Delta C_T[\text{Probe}] - \text{SEM von } \Delta C_T[\text{Probe}])}$

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit einem unabhängigen t-Test auf Grundlage der einzelnen ΔC_T -Werte von Kontrolle und Probe.

2.6 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.6.1 Gewinnung der Proteinlysate

Um Proteinextrakte von Zellen zu gewinnen, wurden pro Lysat die entsprechenden Zellen in drei Vertiefungen von 6-Loch-Platten zu 80 bis 95 % Dichte kultiviert und mittels Accutase (Merck Millipore) abgelöst. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 250 μ l Lysis-Puffer nach Rosenthal *et al.* (2001) durch intensives Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat 20 Minuten bei 4 °C mit 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge primo R, Thermo Fisher Scientific) und der Überstand (Lysat) in ein frisches 1,5-ml-Röhrchen überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde am Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Nachdem die Probe in einem Verhältnis von 1 zu 3 mit 4-fach-Lämmli-Puffer (Bio-Rad), welchem zuvor 10 % β -Mercaptoethanol hinzugefügt wurde, versetzt worden war, wurde sie 60 min bei 37 °C im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Mausretina wurden Augen von Wistar-Ratten durch Dr. Nadine Reichhart entnommen und die Retina von Dr. Norbert Kociok isoliert. Anschließend wurde die Probe in 100 μ l Lysispuffer gemörsert und ab der 20-minütigen Inkubation auf Eis identisch zur oben beschriebenen Zelllysatzgewinnung vorgegangen.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Bei dieser Methode wird die Ladung der Proteine durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt, was eine Auftrennung der Proteine allein nach ihrer Größe beziehungsweise ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden

2-phasige, 1,5 mm dicke Gele bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel mit 8- oder 10 % Acrylamid hergestellt. Das Sammelgel diente der Aufkonzentrierung der Proteine, sodass diese auch bei größeren Mengen an Probe zeitgleich ins Trenngel übertreten. Im Trenngel erfolgte die Auftrennung der Proteine ihrer Größe entsprechend. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel pro Tasche mit einem Volumen an Proteinextrakt beladen, das etwa 20 bis 50 µg Protein enthielt. Zudem wurde in einer separaten Tasche ein Proteingrößenmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Proben wurden in einer mit Laufpuffer befüllten Kammer (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad) bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA aufgetrennt, bis die Proben den unteren Rand des Trenngels erreichten.

2.6.3 Western Blot und Immunodetektion

Nach erfolgter Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dies erfolgte elektrophoretisch in einer mit eisgekühltem Transferpuffer befüllten Mini-Protean Tetra Cell Kammer durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 150 Minuten. Freie unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch 1-stündige Inkubation in 5%iger Milch (in TBST) blockiert und die Membran über Nacht in Antikörper-Lösung im Kühlraum inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran 1 Stunde mit einem Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*)-gekoppeltem Sekundäntikörper inkubiert und im Anschluss wiederum dreimal jeweils mit TBST gewaschen. Nach 5-minütiger Inkubation mit Detektionsreagenz (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) konnten Antikörper-bindende Proteine mittels Chemilumineszenz im ChemiDoc XRS (Bio-Rad) detektiert und mit QuantityOne-Software (Bio-Rad) bearbeitet und ausgewertet werden. Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurde das Verhältnis der integralen Dichten der entsprechenden Proteinbanden zu den β -Actin-Banden ermittelt.

Primäntikörper:

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti- β -Actin, Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-Ano2, Kaninchen, polyklonal	Alomone, Jerusalem, Israel	1:500
anti-TRPM2, Kaninchen, polyklonal (A300-414A)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	1:1000

HRP-gekoppelte Sekundärantikörper:

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti-Maus IgG, Ziege	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien	1:5000
anti-Kaninchen IgG, Ziege	GE Healthcare	1:5000
anti-Kaninchen, Esel	Life Technologies	1:1000

2.6.4 Immunzytochemie

Soweit möglich wurden die zu färbenden Zellen bis zur Konfluenz auf 12-mm-Deckgläsern in 24-Loch-Platten wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann vorsichtig mit TBS gewaschen und 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit 0,25 % Triton X-100 (in TBS) 5 Minuten permeabilisiert. Es wurde wiederholt gewaschen (3x 5 Minuten), bevor freie Bindungsstellen durch 1-stündige Inkubation in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden primären Antikörper (in TBS mit 0,8% BSA) inkubiert. Im Anschluss wurde mit TBS (3x 5 Minuten) gewaschen und 1 Stunde lang mit sekundärem Fluoreszenzmarkiertem Antikörper (in TBS mit 0,8 % BSA) inkubiert. Dieser Schritt sowie alle folgenden Schritte wurden abgedunkelt durchgeführt, um das Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers für die spätere Detektion zu erhalten. Zur Färbung der Zellkerne wurde anschließend DAPI-haltiges TBS für 5 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen (3x 5 Minuten) wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit einem Tropfen Eindeckmittel (Fluorescence Mounting Medium, Dako, Hamburg, Deutschland) auf einem Objektträger fixiert und bis zur mikroskopischen Detektion bei 4 °C aufbewahrt. Wenn nicht anders beschrieben, fanden alle Schritte bei Raumtemperatur statt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer AxioCam MRm (Zeiss, Jena, Deutschland), optional gekoppelt mit einem ApoTome.2 (Zeiss), und der Software Zen pro 2002 (Zeiss).

Primärantikörper:

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti-Pan-Cadherin, Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:250
anti-TRPM2, Kaninchen, polyklonal (A300–414A)	Bethyl Laboratories	1:50

AlexaFluor®-markierte Sekundärantikörper:

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti-rabbit Alexa 488, Esel	Thermo Fisher Scientific	1:5000
anti-Maus Alexa 546, Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:5000

2.7 Elektrophysiologie

2.7.1 Patch-Clamp-Technik

2.7.1.1 Entwicklung der Patch-Clamp-Technik

Die Entwicklung der Patch-Clamp-Methode stellte einen revolutionären Schritt für die Elektrophysiologie dar. Ursprünge sind bereits Ende des 18. Jahrhundert zu finden, als Luigi Galvani die Kontraktion von Froschmuskeln untersuchte (Galvani *et al.*, 1791). Ende der 1930er Jahre entwickelten Cole und Curtis die Spannungsklemme (*voltage clamp*), mithilfe derer Hodgkin und Huxley später das Aktionspotential an Tintenfisch-Axonen wissenschaftlich untersuchten und erklärten, wobei sie das „Carrier-Modell“ verwarfen und durch die Theorie von „spannungsabhängigen Toren“ (heute Kanäle) ersetzten. Die Spannungsklemme verwendete zwei intrazelluläre Elektroden zur Messung eines Kompensationsstroms. Eine Elektrode gab eine Kommandospannung an. Über Rückkopplungsmechanismen wurden die Kompensationsströme gemessen. Diese Methode erlaubte allerdings lediglich die Messung von relativ großen Strömen und Potentialänderungen, wie man sie bei Aktionspotentialen von Riesentintenfisch-Axonen findet (Numberger & Draguhn, 1996).

Das Patch-Clamp-Verfahren und damit die Untersuchung einzelner kanalbildender Proteine wurde schließlich 1976 von Neher und Sakmann entwickelt. Diesen gelang es das Rauschen zu vermindern und die Zahl der Elektroden, die an der Zelle anliegen, auf eine zu reduzieren. Diese Elektrode wird zur Messung des Kompensationsstromes und zeitgleich zum Klemmen (= *clamp*) des Haltepotentials verwendet, während eine zweite, in die Badlösung eintauchende Elektrode, die sogenannte Referenzelektrode, nur noch den Bezugspunkt darstellt. Ermöglicht wird dies durch einen Strom-Spannungs-Wandler-Schaltkreis im Vorverstärker, dessen Funktionsprinzip kurz erklärt werden soll. Später konnte die Arbeitsgruppe von Neher und Sakmann das Rauschen weiter vermindern und entwickelte weitere Konfigurationen (Abbildung 2.1) (Hamill *et al.*, 1981; Numberger & Draguhn, 1996).

2.7.1.2 Grundlagen und Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik beruht darauf, dass eine sehr feine, saubere Pipette mit der Oberfläche einer Zelle in Kontakt gebracht und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks (Saugen) die Zelle elektrisch abgedichtet wird. Möglich ist dies, indem durch den Unterdruck ein sehr hoher Widerstand zwischen Pipettenspitze und Zelle ausgebildet wird, der, da er im Gigaohm-Bereich liegt, als „Gigaseal“ bezeichnet wird. Die extra- und intrazellulären Lösungen werden durch eine Zytoplasmamembran voneinander getrennt. Da die Lösungen

eine unterschiedliche Ionenzusammensetzung besitzen, die Ionen jedoch die Membran, die als Lipiddoppelschicht für geladene Teilchen undurchlässig ist, nicht passieren können, besteht eine Spannung zwischen dem Intra- und Extrazellularraum. Diese wird als Membranpotential bezeichnet. Abhängig von der Ionenzusammensetzung des Intra- beziehungsweise Extrazellularraums und der Membranspannung existiert für die jeweiligen Ionen eine treibende Kraft über die Membran hinweg: der elektrochemische Gradient. Ein Austausch von Ionen zwischen den Lösungen ist unter anderem über Ionenkanäle möglich, welche für bestimmte Ionen durchlässig sind. Befindet sich ein solcher Ionenkanal im Membranfleck (Patch), welcher von der Pipette eingeschlossen wird, so kann durch einen Stimulus der Kanal aktiviert und der Ionenfluss, angetrieben durch den Gradienten, durch diesen gemessen werden. Diese sogenannte *cell-attached*-Konfiguration, war die erste von Neher und Sakmann genutzte Konfiguration. Die Pipettenlösung simuliert hierbei das Extrazellulärmilieu. Die Zellmembran unter der Pipettenöffnung wird nicht beschädigt und auch das intrazelluläre Milieu bleibt unangetastet.

Durch einen kurzen Unterdruckpuls kann das umschlossene Membranstück durchbrochen werden, ohne dass der Gigaseal dabei zerstört wird. Das Zellinnere befindet sich in direktem Kontakt mit der Pipettenlösung, welche das Zytoplasma zügig austauscht und dann die intrazelluläre Lösung darstellt. Dies ist die *whole-cell*-Konfiguration (Ganzzell-Konfiguration). Es kann nun der Strom beziehungsweise die Spannungsänderung der gesamten Zellmembran, das heißt die Summe der Ströme aller simultan aktiver Ionenkanäle, gemessen werden (Numberger & Draguhn, 1996). Eine Abwandlung der Ganzzell-Konfiguration stellt der *perforated-patch*-Modus dar. Im Perforated-Patch-Modus bleibt die Zellmembran nahezu intakt und das natürliche intrazelluläre Milieu weitestgehend erhalten. Dies gelingt durch den Zusatz von porenbildenden Substanzen wie Nystatin, Amphotericin B oder Gramicidin zur Pipettenlösung, die eine Passage von monovalenten Kationen ermöglichen. Dies stellt eine elektrische Verbindung zwischen der Elektrode und dem Zellinneren her, wodurch Potentialmessungen der gesamten Zellmembran ermöglicht werden. Der Perforated-Patch-Modus wird bei Untersuchungen von Zellfunktionen angewandt, auf die sich der Austausch des Zytoplasmas gegen die Pipettenlösung negativ auswirken kann (Akaike & Harata, 1994; Ishibashi *et al.*, 2012).

Weitere Konfigurationen, die insbesondere zur Einzelkanalanalyse eingesetzt werden, lassen sich durch Herausreißen des Membranflecks erzielen. Durch Zurückziehen der Pipette im *cell-attached*-Status entsteht die *inside-out*-Konfiguration, bei der die ursprüngliche zytoplasmatische Oberfläche der Zellmembran zur Badlösung gerichtet ist. Diese

Konfiguration wird insbesondere eingesetzt, um die Modulation von Ionenkanälen durch intrazelluläre Faktoren zu untersuchen (Numberger & Draguhn, 1996).

Entgegengesetzt ist es bei der *outside-out*-Konfiguration, welche durch Herausreißen im Ganzzellstatus entsteht, die extrazelluläre Oberfläche der Zellmembran, die der Badlösung zugewandt ist. Die Reaktion von Kanälen auf extrazelluläre Faktoren sowie ligandengesteuerte Kanäle lassen sich hiermit gut untersuchen (Numberger & Draguhn, 1996).

Durch die verschiedenen Konfigurationen sowie die gezielte Auswahl der Bad- und Pipettenlösungen erweitern sich die Einsatzmöglichkeiten der Patch-Clamp-Technik erheblich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Ganzzell- sowie der Perforated-Patch-Modus angewandt.

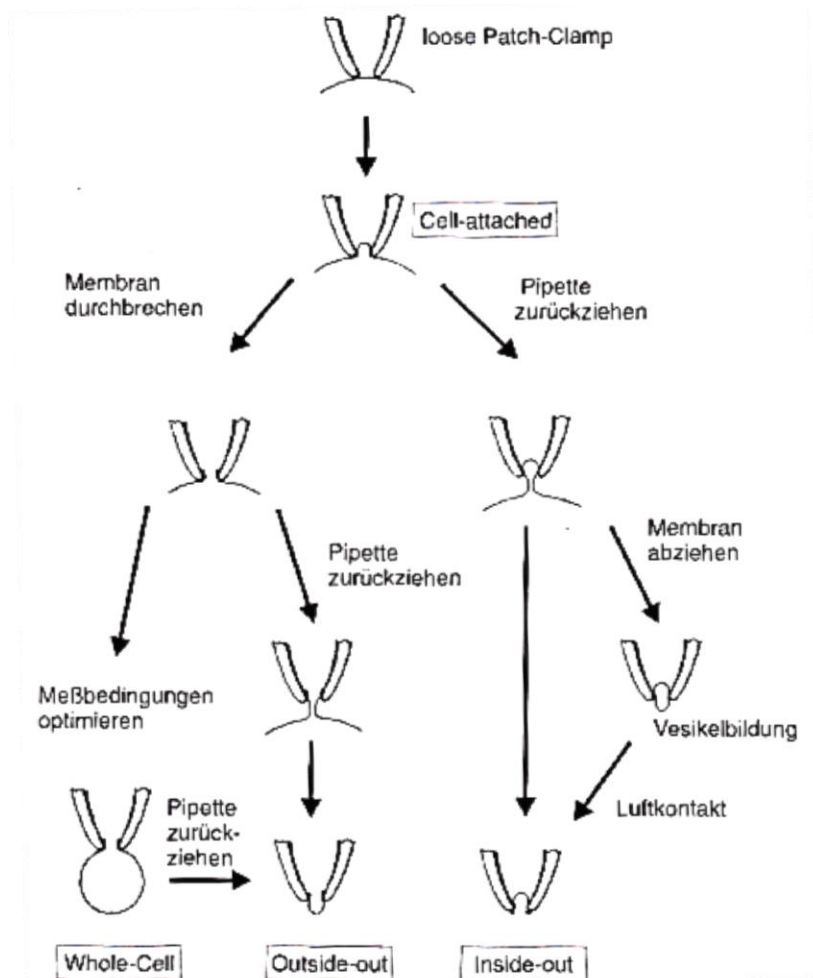


Abbildung 2.1: Die vier wichtigsten Messkonfigurationen und das Prinzip ihrer Herstellung (Numberger & Draguhn, 1996).

2.7.1.3 Messplatzaufbau

Der Messplatz baute sich aus einem Schwingungstisch mit Faraday'schem Käfig und allen außerhalb davon befindlichen Elementen, beispielweise elektronische Komponenten, auf. Auf dem Schwingungstisch waren alle Elemente angebracht, die direkt mechanisch mit Pipette und Probe verbunden waren.

Mechanische Elemente und Schutz vor Umwelteinflüssen

Die Basis des Messplatzes bildete ein schwingungsgedämpfter Tisch. Da die Verbindung zwischen Pipette und Präparat äußerst fragil ist, verhinderte er ein Abreißen des Seals und Erschütterungen durch die Umgebung. Auf dem Schwingungstisch waren das inverse Mikroskop (Olympus CK2, Olympus, Hamburg, Deutschland) mit der Probenkammer sowie an einer Führungsschiene der Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) untergebracht, da diese Komponenten in direkter Verbindung zum Seal, also Probe und Pipette, stehen. Der Mikromanipulator, der für das präzise Heranführen der Pipette an die Zelle benötigt wurde, trug den Pipettenhalter sowie den Vorverstärker (EPC-7, HEKA, Lamprecht, Deutschland). Der Pipettenhalter war mit einem zugentlastetem Schlauchsystem verbunden, welches teilweise (aber in sicherer Entfernung von der Messeinheit) mit Wasser gefüllt war und über das ein Über- und Unterdruck an die Pipette angelegt werden konnte. Der Vorverstärker war sowohl mit der Badelektrode als auch Messelektrode aus Silber/Silberchlorid-Draht verbunden.

Der Schwingungstisch wurde umgeben von einem weiteren Tisch, der ihn zum einen vor ungewollten Berührungen schützte und zum anderen den Faraday'schen Käfig trug. Letzterer schirmte den elektrisch äußerst sensiblen Messstand ab, um ein Hintergrundrauschen während der Messungen zu minimieren. Zu diesem Zweck wurden alle Bestandteile der Messeinheit geerdet, wobei eine Schleifenbildung vermieden wurde. Auch die Fernsteuerung des Mikromanipulators war auf dem umgebenden Tisch untergebracht.

Verstärker und Datenverarbeitung

Der bereits erwähnte Vorverstärker ist Teil des Patch-Clamp-Amplifiers. Er misst das Stromsignal und liest es als Spannung aus. Im Zentrum des Strom-Spannungs-Wandlers stehen der Operationsverstärker (OPA) und der Rückkopplungswiderstand R_f (*feedback resistance*). Am Eingang des OPA liegen die Pipettenspannung U_{PIP} (–, Punkt 1) sowie die vorgegebene Kommandospannung U_{SOLL} (+) an. Sind U_{PIP} und U_{SOLL} gleich, fließt kein Strom. Wenn U_{PIP} und U_{SOLL} voneinander abweichen, da ein Strom durch den Patch

beziehungsweise die Membran fließt, entsteht am OPA-Ausgang eine Spannung proportional zu der Abweichung. Damit weicht die Spannung an Punkt 1 (U_{PIP}) von der Spannung an Punkt 2 ab und es fließt ein Strom durch R_f . Gemäß dem Ohmschen Gesetz ($U_f = R_f \cdot I$) entsteht auch eine Spannung an R_f , welche proportional zum Strom ist. Der in die Pipette injizierte Strom wurde also in Spannung umgewandelt. Da der OPA definitionsgemäß einen unendlich hohen Eingangswiderstand hat, kann der Strom nur in die Pipette fließen, nicht aber zurück in den OPA. Der Strom fließt und ändert U_{PIP} solange, bis U_{PIP} wieder gleich U_{SOLL} ist. Das geschieht so schnell, dass die Spannung quasi die ganze Zeit konstant gehalten wird.

Die zweite Amplifier-Komponente ist der Hauptverstärker (EPC-7, HEKA, Lamprecht, Deutschland) mit der Steuereinheit außerhalb des Faraday'schen Käfigs. In der Steuereinheit wird die Ausgangsspannung U_{AUS} ausgelesen und mit einem Kalibrierungsfaktor für R_f wieder in Strom umgerechnet. Der Hauptverstärker verstärkt und filtert die Signale des Vorverstärkers auf diese Weise. Über einen AD/DA-Wandler (Analog – Digital) (Batelle, Frankfurt am Main, Deutschland) wurden die jeweiligen Signale von Verstärker und Computer, ausgestattet mit der entsprechenden Software (TIDA, HEKA), ineinander umgewandelt und auf dem Monitor angezeigt.

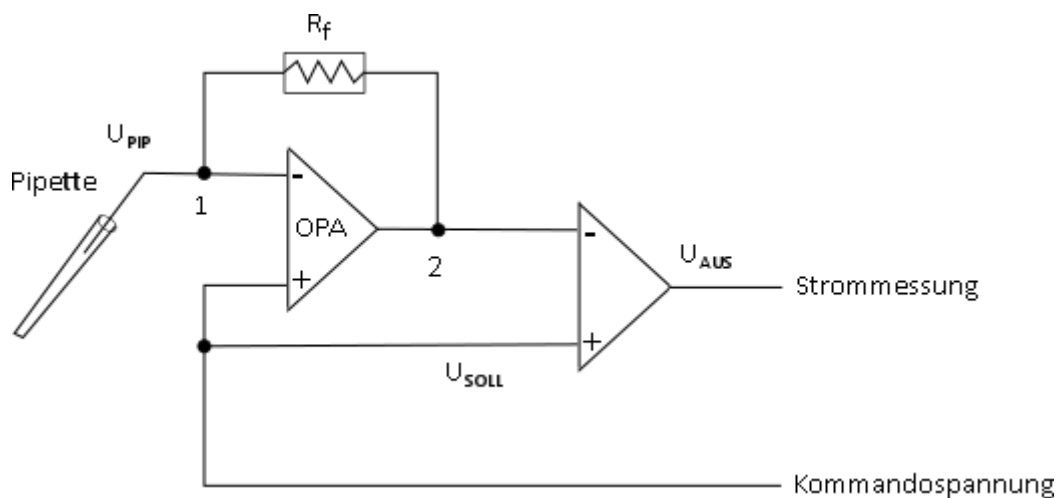


Abbildung 2.2: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers (nach Numberger & Draguhn, 1996). OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{SOLL} : Sollspannung, U_{PIP} : Pipettenpotential, U_{AUS} : Ausgangsspannung proportional zum Strom.

Weitere Elemente

Weitere Bestandteile des Messplatzes waren eine Heizplatte, die oberhalb des Faraday'schen Käfigs untergebracht waren und zur Erwärmung der Badlösung der TRPV2-Versuche diente. Darauf befand sich ein Gefäß zum Befüllen mit der Badlösung, das über ein Schlauchsystem, angetrieben durch eine Rollerpumpe, mit der Messkammer verbunden war. Auf der anderen

Seite der Messkammer war ein Ablaufschlauch angebracht, welcher in eine Abfallflasche mündete und das Perfusionssystem komplettierte. Weitere Elemente waren einen Transformator (BaseTech, Kassel, Deutschland) für die Mikroskopbeleuchtung sowie ein Elektrodenziehgerät (DMZ Universal Microelectrode Puller, Zeitz-Instruments, Augsburg, Deutschland).

2.7.1.4 Versuchsdurchführung

Allgemeines Vorgehen

Der gesamte Patch-Versuch wurde bei Raumtemperatur ausgeführt. Zellen wurden auf 12-mm-Glasdeckgläsern in 24-Loch-Platten in einer Zellzahl ausgesät, sodass sie am Tag des Patch-Experiments subkonfluent ausgewachsen waren, und bis zur Verwendung wie unter 2.4.1 und 2.4.2 kultiviert. Die Messkammer über dem Mikroskop wurde mit einem definierten Volumen raumtemperierter Badlösung gefüllt und die Zellen in dieser platziert. Mit dem Elektrodenziehgerät wurden Pipetten aus Borosilikatglas-Kapillaren (innerer Durchmesser 1,05 mm, äußerer Durchmesser 1,50 mm, Länge 80 mm, Science Products, Hofheim, Deutschland) gezogen und anschließend für einen besseren Kontakt von Zellmembran hitzepoliert. Die Spitze wurde in Pipettenlösung eingetaucht, wodurch die Spitze durch Kapillarkräfte mit der Lösung gefüllt wurde (*tip filling*). So sollte beim folgenden *back filling*, bei dem die Pipette mit einer Spritze mit der Pipettenlösung durch die große, hintere Öffnung gefüllt wird, das Festsetzen von Luftblasen in der Spitze verringert werden. Bildeten sich doch Luftblasen, wurden sie durch vorsichtiges Klopfen an der Pipettenseite entfernt. Die Pipette wurde nun über die Messelektrode gestülpt und dabei im Pipettenhalter luftdicht fixiert, welcher zur Steuerung mit einem Mikromanipulator verbunden war. Über das Schlauchsystem wurde an die Pipette ein leichter Überdruck angelegt, bevor sie in die Badlösung geführt wurde. Das sollte ein Verstopfen der Pipette durch Schmutzpartikel in der Badlösung verhindern.

Wurde an die Elektrode ein repetitiver Spannungspuls von 10 mV („Testpuls“) angelegt, erschien bei Eintauchen der Elektrode in die Badlösung eine Stromamplitude auf dem Monitor. Um das Potential festzulegen, an dem zwischen der Pipette und der Referenzelektrode kein Strom fließt („Nullwert“), wurde die Grundlinie der Stromamplitude bei 0 V auf Höhe von 0 nA geregelt. Eine initiale Abweichung von diesem Wert ist durch sogenannte Offsetpotentiale bedingt, also Spannungen, die an den Übergängen der verschiedenen Elemente der Messkette entstehen und zu einer Verfälschung des eingestellten Kommandopotentials führen (Numberger & Draguhn, 1996). Das Offsetpotential setzt sich

zusammen aus Elektrodenpotentialen, also Polarisierungen an der Elektrode in der Elektrolytlösung, sowie Übergangspotentialen zwischen verschiedenen Elektrolyten wie Pipetten- und Badlösung, das sogenannte „*liquid junction potential*“ (LJP) (Numberger & Draguhn, 1996). Eine Festsetzung des Nullwertes kompensiert das Offsetpotential. Da das LJP zwar bei der offen im Bad befindlichen Pipette, nicht jedoch nach Sealbildung anfällt, wurde das LJP fälschlicherweise mitkompensiert und musste bei der späteren Auswertung des Stromes manuell korrigiert werden. Nach Festsetzung des Nullpotentials konnte nun über die Stromamplitude mittels des Ohmschen Gesetzes der Pipettenwiderstand ausgerechnet werden. Nur Pipetten mit einem Widerstand von 3 bis 5 M Ω wurden für eine Messung verwendet.

Die Pipette wurde unter visueller Kontrolle über das Mikroskop an eine Zelle herangeführt und der Nullwert noch einmal überprüft. Es wurden nur Zellen ausgewählt, die isoliert waren, also keine anderen Zellen berührten, und nicht kreisförmig waren. Nach Berühren der Zelle, was durch eine leichte Verringerung der Stromamplitude sichtbar wurde, wurde der Überdruck von der Pipette genommen. Fiel die Zelle nicht spontan bereits in den Gigaseal, wurde dieser durch Anlegen eines leichten Unterdrucks mittels vorsichtigen Saugens generiert und simultan das Haltepotential schrittweise auf -40 mV runterreguliert.

Am Anfang und Ende des Spannungspulses sind die kapazitiven Artefakte von Pipette, Pipettenhalter und Membranfleck als schnell ansteigende und dann exponentiell abfallende Ströme sichtbar und müssen durch „C-FAST“ kompensiert werden. Durch vorsichtige Saugpulse wurde die Zellemembran durchbrochen, wodurch sich die Zelle nun in der Ganzzell-Konfiguration befand, sichtbar durch eine Erhöhung der kapazitiven Artefakte an Anfang und Ende des Spannungspulses. Die Artefakte wurden aufgenommen, da sie die Membrankapazität repräsentieren und bei der Auswertung zu deren Berechnung genutzt wurden. Membrankapazität und Serienwiderstand wurden vor den Messungen mittels „G-Slow“ und „G-SERIES“ im „RS-COMP“-Modus kompensiert. Alle Einstellungen und Experimente wurden im *voltage clamp*-Modus durchgeführt. Die Spannungsprotokolle wurden durchlaufen und währenddessen bei vielen Experimenten Stimulantien und Blockersubstanzen extrazellulär appliziert. War die Messung abgeschlossen, wurden Pipette, Badlösung und Zellen gegen frische ausgetauscht.

Beim Arbeiten im Perforated-Patch-Modus wurde weitestgehend simultan vorgegangen. Jedoch wurde auf das *tip filling* und das Anlegen eines Überdrucks an die Pipette verzichtet. So konnte verhindert werden, dass Nystatin-haltige Pipettenlösung in die Badlösung gelangte, was die Sealbildung erschweren und zum vorzeitigen Zelltod führen kann. Außerdem wurde die Beleuchtung des Mikroskops ausgeschaltet, sobald sich die Pipette in unmittelbarer Nähe

zur Zelle befand, um die Wirksamkeit des lichtsensitiven Nystatins nicht zu belasten. Sobald sich die Zelle im Gigaseal befand, wurde mehrere Minuten gewartet, bis durch die Porenbildung eine stabile elektrische Verbindung zwischen der Messelektrode und dem Zellinneren, sichtbar an der Zunahme der Membrankapazität, aufgebaut war. Das weitere Vorgehen erfolgte simultan zu dem beim Ganzzell-Modus.

Sobald eine ungewöhnlich starke zusätzliche Drift des Pipettenpotentials auftrat, wurden Bad- und Messelektrode in „DanKlorix Hygienreiniger“ (Colgate-Palmolive, New York, USA) chloriert, um die Silberchloridbeschichtung der Silberelektroden zu regenerieren.

Untersuchung von Temperatur-abhängigen Effekten (TRPV2)

Bei einem Teil der Experimente wurden Reaktionen von ARPE-19-Zellen auf eine Temperaturerhöhung auf 45 °C untersucht. Um diesen Temperatursprung zu erreichen, wurde während Durchlaufen des Spannungsprotokolls von einer Raumtemperatur-warmen Badlösung auf eine Perfusion mit einer zuvor auf 70 °C erwärmten Badlösung umgestiegen, die sich beim Durchlaufen des Schlauchsystems bis zur Ankunft in der Kammer auf eine Temperatur von etwa 45 °C abkühlte.

Ionomycin-basierte Versuche

Ionomycin wurde während Ablauf des Verlaufsspannungsprotokolls appliziert. Um den Effekt verschiedener Modulatoren auf Ionomycin-induzierte Ströme zu untersuchen, wurde das Erreichen eines „Steady State“ abgewartet, bevor der jeweilige Modulator appliziert wurde. Der Steady State galt als erreicht, wenn sich die Stromamplituden von mindestens drei aufeinanderfolgenden Pulsabfolgen nicht wesentlich voneinander unterschieden.

Doppelapplikation bei ATP-basierten Versuchen

Da nicht jede Zelle auf ATP-Applikation reagiert, wurde für die Versuche, welche auf ATP als Stimulanz basierten, ein Verfahren mit doppelter, zeitlich versetzter ATP-Applikation gewählt. Dies ist möglich, da ATP in Zellen einen transienten Ca^{2+} -Anstieg und -Effekt auslöst, welcher sich nach einer kurzen „Ruhephase“ wiederholen lässt. Bei der ersten Applikation wurde kontrolliert, dass ATP in der gemessenen Zelle den untersuchten Effekt auslöste. Vor der zweiten ATP-Applikation wurde ein Blocker zur Badlösung gegeben und dessen Wirkung auf den ATP-induzierbaren Strom untersucht. Zwischen den beiden ATP-Gaben lagen mindestens 3 Minuten.

2.7.1.5 Spannungsprotokolle

Die Messungen bestanden aus dem Anlegen verschiedener Spannungsprotokolle an die Zelle, ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV (ohne LJP-Korrektur). Dies war zum einen das „E9R50“-Protokoll (Abbildung 2.3), das nach der Anzahl von jeweils neun de- und hyperpolarisierenden Spannungsimpulse sowie ihrer jeweiligen Dauer von 50 ms benannt ist. Jeder Spannungssprung betrug 10 mV. Das E9R50-Protokoll wurde zur Untersuchung und Darstellung von Aktivierungskinetiken genutzt.

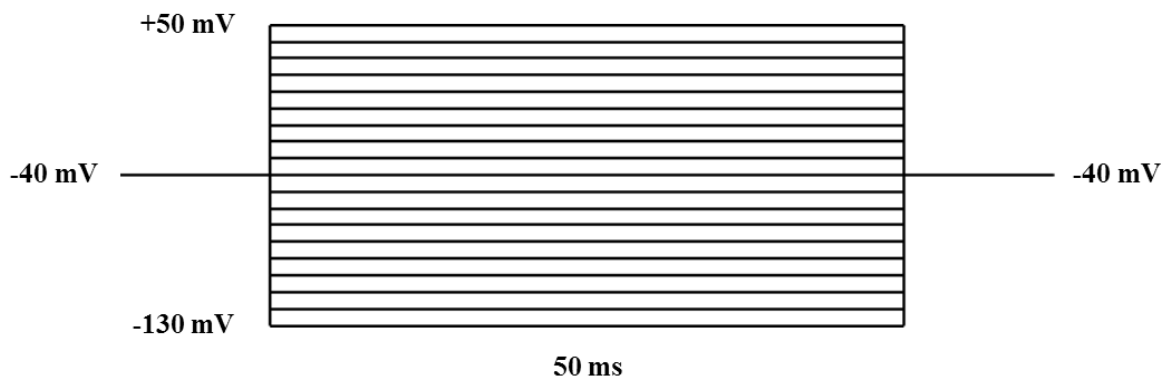


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des E9R50-Pulsprotokolls. Ausgehend vom Haltepotential wurde die Zellmembran in jeweils neun 10 -mV-Schritten erst hyper- und anschließend depolarisiert. Jeder Spannungspuls war 50 ms lang.

Das zweite Protokoll war ein Verlaufsprotokoll bestehend aus einer Wiederholung immer derselben Abfolge von Spannungssprüngen. Die Zellen wurden in zehn Schritten von je 100 ms Dauer mit einer um jeweils 20 mV erhöhten Kommandospannung stimuliert, beginnend bei -140 mV und endend auf 60 mV. Nach jedem Puls erfolgte eine Rückkehr auf das Haltepotential von -40 mV für ebenfalls 100 ms. Eine solche Einheit wird hier als „Pulseinheit“ bezeichnet. Gefolgt wurde die Pulsabfolge von einer 500 ms langen Neutralperiode bei -40 mV, sodass jede dieser Einheiten sich alle $2,5$ s wiederholte. Mit diesem Protokoll wurden akute Veränderungen der Membranleitfähigkeit durch die Zugabe von Stimulanzien oder Inhibitoren beobachtet.

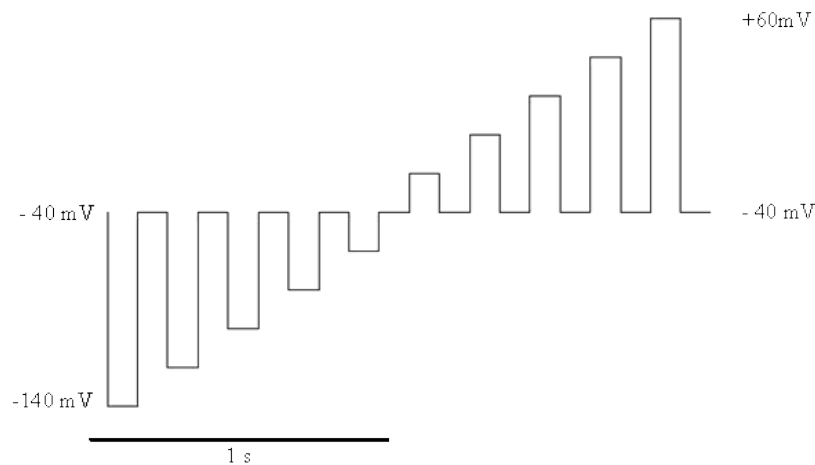


Abbildung 2.4: Einzelne Pulsfolge des Verlaufsspannungsprotokolls (Bildquelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/fidzinski-pawel-2006-03-20/HTML/image013.gif>). In zehn Spannungspulsen wird die Membran in 20-mV-Schritten von -140 mV auf +60 mV stimuliert. Zwischen jedem Schritt erfolgt eine Rückkehr zum Haltepotential von -40 mV. Die Abfolge wird beliebig oft wiederholt.

Bei einem dritten Protokoll, „Rampe“, das zur Untersuchung von temperaturabhängigen TRPV2-Kanälen eingesetzt wurde, wurden die Zellen von einem Haltepotential von -40 mV ausgehend alle 1,5 Sekunden durch wiederholte kontinuierliche Spannungsanstiege von -140 mV auf 60 mV, die Rampen, stimuliert.

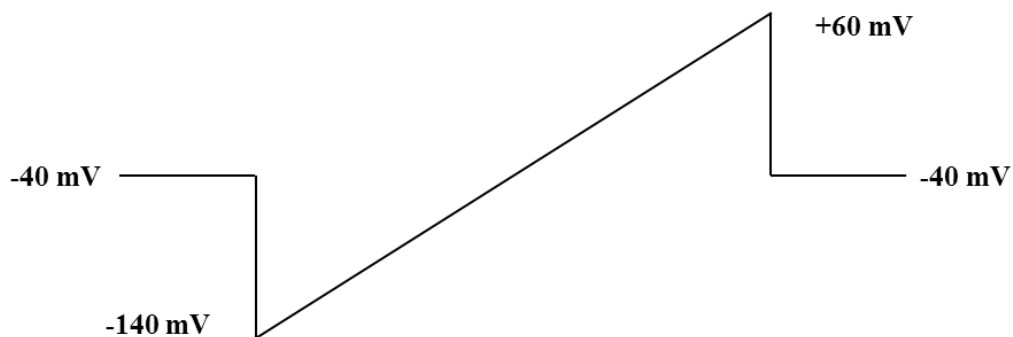


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Protokolls „Rampe“. An die Zellmembran wurde von einem Haltepotential von -40 mV ausgehend ein von -140 mV auf 60 mV kontinuierlich ansteigendes Potential angelegt. Diese Rampen wurden alle 1,5 Sekunden wiederholt.

2.7.1.6 Lösungen

Es wurden die in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Lösungen verwendet, wobei jeweils nur K^+ -haltige Bad- und Pipettenlösungen oder K^+ -freie Lösungen in einem Experiment kombiniert wurden. Für beide Bedingungen wurden wiederum unterschiedliche intra- zu extrazelluläre Cl^- -Verhältnisse getestet. Die K^+ -haltigen Lösungen entsprachen annähernd physiologischen Bedingungen. Deshalb enthielt die Pipettenlösung einen hohen K^+ -Gehalt, die Badlösung hingegen überwiegend Na^+ -Ionen. Um die Leitfähigkeiten ohne eine störende Überlagerung von K^+ -Strömen zu untersuchen, wurde in der Mehrzahl der Experimente K^+ gegen

K⁺-Kanalinhhibitoren ersetzt. Intrazellulär wurde Cs⁺ anstelle von K⁺ verwendet, extrazellulär TEA⁺.

Für jede Lösung wurde ein pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 mit einer entsprechenden Säure oder Base eingestellt. Die Badlösungen wurden gefiltert und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C maximal 10 Tage aufbewahrt. Glukose wurde am Versuchstag frisch hinzugegeben. Die Pipettenlösungen wurden sterilfiltriert, zu 1,5 ml aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.1.7 Pharmakologische Modulatoren

In der vorliegenden Arbeit wurden Ionomycin (1 µM), H₂O₂ (10 mM), ATP (500 µM) und Cannabidiol (45 µM) als Ionenkanalstimulantien eingesetzt. Paxillin diente als Maxi-K-Kanalinhibitor, SKF96365 (20 µM) als TRPV2-Blocker. Flufenaminsäure (FFA; 100 µM), 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB; 50 µM), Rutheniumrot (20 µM), 9-Phenanthrol (30 und 100 µM), Spermin (100 µM), Lanthanum(III)-chlorid (LaCl₃; 100 und 500 µM), Miconazol (10 µM), 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS; 100 µM) und Amilorid (500 µM) wurden als Kationenkanalblocker eingesetzt. Nifluminsäure (NFA; 100 µM), DIDS (100 µM), CaCC_{inh}-A01 (10 und 30 µM) und T16A_{inh}-A01 (10 µM) wurden als Inhibitoren für CaCC verwendet. Die Pharmakologika wurden ihrer Löslichkeit entsprechend in Wasser zu Injektionszwecken oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine Stammlösung herzustellen. Die DMSO-basierte Stammlösung wurde 2000-fach konzentriert zur späteren Arbeitskonzentration hergestellt, um bei Zugabe von Stimulaanz und Blocker zur Badlösung eine Grenze von 0,1 % DMSO nicht zu überschreiten. Denn stärker konzentriert als 0,01 % kann DMSO toxisch auf Zellen wirken. Vor Zugabe zur Badlösung wurden die Substanzen oder Stammlösungen in extrazellulärer Lösung vorverdünnt.

Ionomycin:

Das Polyether-Antibiotikum Ionomycin ist ein sogenanntes Ca²⁺-Ionophor. Ionomycin mobilisiert sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres Ca²⁺ (Bennett *et al.*, 1979; Purkiss & Willars, 1996). Es erhöht die Permeabilität der Zellmembran gegenüber Ca²⁺, wodurch es dem elektrochemischen Gradienten folgend die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht. Liu und Hermann (1978) beschrieben Ionomycin erstmals als ein Ca²⁺-Ionophor, das mobil über einen Carrier-Mechanismus durch die Bildung lipidlöslicher Ca²⁺-Komplexe fungiert. Aufgrund seiner relativ hohen Selektivität für Ca²⁺ wird Ionomycin bevorzugt für die Untersuchung Ca²⁺-abhängiger Vorgänge und Strukturen eingesetzt. Er ist allerdings kein

physiologischer Stimulus. Wie bei Patch-Versuchen üblich wurde Ionomycin in dieser Arbeit extrazellulär in einer Konzentration von 1 μM verwendet.

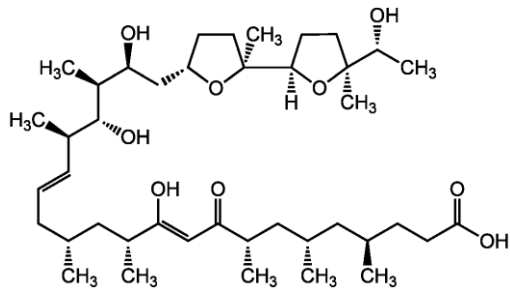


Abbildung 2.6: Strukturformel von Ionomycin (Bildquelle:<http://www.adipogen.com/media/catalog/product/a/g/ag-cn2-0416.png>).

Adenosintriphosphat (ATP):

ATP ist eine lebensnotwendige Substanz und als solche ubiquitär zu finden. Es ist in erster Linie für seine intrazelluläre Wirkung als Energielieferant bekannt, kann aber beispielsweise auch extrazellulär als Ligand an Rezeptoren wie den purinergen Rezeptoren des P2-Typs wirken. Die Aktivierung der purinergen Rezeptoren führt ionotrop (P2X-Rezeptoren) oder metabotrop (P2Y-Rezeptoren) zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Coddou *et al.*, 2011). ATP stellt somit einen physiologischen Stimulus zur intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung dar und wurde als solcher in dieser Arbeit in Patch-Clamp- und Ca^{2+} -Imaging-Versuchen eingesetzt. Die ATP-induzierten Ca^{2+} -Erhöhungen sind transient und in den meisten Fällen vollständig reversibel und wiederholbar. Da die in der Literatur eingesetzten ATP-Konzentrationen stark variieren und von Zelltyp und Lösungsbedingungen abhängig sind, wurden in dieser Arbeit die Effekte verschiedener Konzentrationen an ATP untersucht.

2.7.1.8 Auswertung und Analyse der Messdaten

Software

Zur Auswertung und Darstellung von Rohdaten wurde TIDA (HEKA) verwendet. Die Berechnungen und Darstellungen von Werten und Graphen erfolgten in Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, USA) und SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, USA).

Vorzeichenkonvention

Die Verwendung von Vorzeichen in Bezug auf Ionenströme und Spannungen entspricht der allgemeinen Konvention (Bertl *et al.*, 1992). Das bedeutet, dass die Membranspannung und die Richtungen der Ströme aus der Zellperspektive, also intra- gegenüber extrazellulär,

betrachtet werden. Ein Auswärtsstrom, also positiver Strom, bezeichnet das Ausströmen von Kationen beziehungsweise das Einströmen von Anionen in die Zelle, wird durch einen Ausschlag nach oben dargestellt und mit einem positiven Vorzeichen versehen. Mit dem Einwärtsstrom verhält es sich konträr. Das extrazelluläre Potential wird gemäß der Konvention auf „0“ gesetzt.

Datenverarbeitung und -darstellung

Während Messungen mit dem E9R50-Programm lediglich der Veranschaulichung von Aktivierungskinetiken als Rohdaten dienen, wurden die Messungen des Verlaufsprotokolls zusätzlich manuell ausgewertet. Dafür wurden pro Experiment nach Möglichkeit die Aufnahmen von 5 oder mehr Zellen, mindestens aber von 3 Zellen ausgewertet. An verschiedenen Punkten wurden die Stromwerte von drei benachbarten Pulseinheiten gemittelt und für jede Spannung abgelesen.

Eine präzisere Angabe als der absolute Stromwert ist jedoch die Stromdichte. Je größer die Zelle und damit die Fläche ihrer Zellmembran und die Anzahl der Ionenkanäle sind, desto größer ist in der Regel der Stromfluss. Da sich die Zellmembran wie ein Kondensator verhält, besitzt sie eine Kapazität C_m , die ebenfalls mit der Größe der Zelle zunimmt. Die Stromdichte (pApF^{-1}) ist nun der Strom relativ zur Membrankapazität. Sie bindet somit die Zellgröße mit ein und verbessert die Vergleichbarkeit der Daten. Um die Membrankapazität zu ermitteln, wurde das Integral der Artefakte der unkompensierten Zelle im Testpuls berechnet. Basierend auf den Stromdichten wurden Strom/Spannungs-Kurven (I/U-Kurven) erstellt. Zur Untersuchung spannungsabhängiger auswärtsrektifizierender K_{Ca} - und CaCC-Kanäle wurden maximale Auswärts- und Einwärtsstromdichten analysiert und dargestellt, die aus der Amplitude der Stromdichten zwischen -40 und +60 mV für maximale Auswärtsstromdichten und zwischen -40 und -140 mV maximale Einwärtsstromdichten bestimmt wurden. Mitunter wurden bei diesen Versuchen „bereinigte“ Auswärtsstromdichten zur Analyse verwendet. Sie wurden berechnet, indem jeweils von dem Betrag der maximalen Auswärtsstromdichte der Betrag der maximalen Einwärtsstromdichte subtrahiert wurde. Die bereinigten Auswärtsstromdichten können entsprechend entgegen der Vorzeichenkonvention negative Vorzeichen annehmen.

Auswertungszeitpunkte bei Ionomycin-basierten Versuchen:

Kontrolle	Strom vor Ionomycin-Zugabe
Ionomycin-Effekt	Steady State nach Stromanstieg durch Ionomycin
Blocker-Effekt	Pulsfolge mit minimaler Stromamplitude nach Blockergabe

Auswertungszeitpunkte bei ATP-basierten Versuchen:

Kontrolle	Strom vor ATP-Zugabe
Kationen-Strom	Pulsfolge mit maximalem Einwärtsstrom
Maximaler Auswärtsstrom	Pulsfolge mit maximalem auswärtsrektifizierendem Strom
Cl ⁻ -Strom	Pulsfolge mit größtmöglicher Auswärtsrektifizierung nach Abklingen des größten Teils des „Kationen-Stroms“

Bestimmung der Umkehrpotentiale

Am Schnittpunkt der I/U-Kurven mit der x-Achse wurden die Umkehrpotentiale der Zellen abgelesen. Die Umkehrpotentiale stellen das Membranpotential dar, bei dem netto kein Stromfluss stattfindet, also der Einwärts- und Auswärtsstrom gleich beziehungsweise 0 sind. Wird der Strom nur von einer Ionensorte getragen, entspricht das theoretische Umkehrpotential des Stromflusses dem Gleichgewichtspotential der Ionensorte. Es kann über die Nernst-Gleichung berechnet werden (Nernst, 1888):

$$E(\text{Ion}) = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{Ion}]_{\text{e. c.}}}{[\text{Ion}]_{\text{i. c.}}}$$

$E(\text{Ion})$ = Gleichgewichtspotential des Ions/der Ionen in Volt (V)

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = Absolute Temperatur in Kelvin (K)

z = Ladung des Ions/der Ionen

F = Faraday-Konstante ($9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$[\text{Ion}]_{\text{e. c.}}$ = extrazelluläre Ionenkonzentration

$[\text{Ion}]_{\text{i. c.}}$ = intrazelluläre Ionenkonzentration

Da der Raum, in welchem sich der Messplatz befand, auf $23 \text{ }^\circ\text{C}$ reguliert war, ergibt sich daraus für das Umkehrpotential:

$$E(\text{Ion}) = \frac{59 \text{ mV}}{z} \cdot \log \frac{[\text{Ion}]_{\text{e. c.}}}{[\text{Ion}]_{\text{i. c.}}}$$

Mit $E(\text{Ion})$ in mV.

Korrektur der Übergangspotentiale

Wie bereits beschrieben werden die Offsetpotentiale fälschlicherweise auch um die Übergangspotentiale korrigiert. Deshalb wurden für jede Lösungskombination mit JPCalc V 1.0 (Barry, 1994) die LJP berechnet und alle Spannungen wurden um das jeweilige LJP korrigiert.

2.7.2 Calcium-Imaging

2.7.2.1 Messprinzip und Fura-2

Calcium-Imaging ist eine Methode zur Messung einer Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche auf Fluoreszenzspektrophotometrie beruht. Bei diesem optischen Messverfahren wird die Absorption beziehungsweise die Extinktion von monochromatischem Licht durch eine fluoreszierende Substanz gemessen und anhand dessen ihre Konzentration bestimmt. Wird ein im Grundzustand befindliches Molekül mit Licht bestrahlt, absorbiert es eine bestimmte Wellenlänge des Lichts (Exzitationsstrahlung) und wird angeregt, gelangt also auf ein höheres Energieniveau. Fällt es in seinen Grundzustand zurück, emittiert das Molekül Licht der Wellenlängendifferenz, die sogenannte Fluoreszenz. Da allerdings ein Teil der Energie des absorbierten Lichtes als Bewegungsenergie verloren geht, ist das emittierte Licht energieärmer und seine Wellenlänge länger verglichen mit der Extinktionsstrahlung. Anhand der Intensität der im Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz kann man auf die Anzahl der in der Probe befindlichen Moleküle und somit ihre Konzentration schließen.

Fura-2 ist solch ein Fluoreszenzfarbstoff. Als Chelatbildner mit hoher Affinität für Ca^{2+} kann es mit diesem Komplexe bilden. Die Ca^{2+} -Komplexe besitzen eine maximale Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm, die der ungebunden Form hingegen bei 380 nm. Die Wellenlänge mit maximaler Emission ist 510 nm. Das hier verwendete Fura-2 wurde als Acetoxymethylester (Fura-2-AM) bezogen. Die veresterte Form ist insensitiv für Ca^{2+} und dank ihrer Lipophilie membranpermeabel. Im Zytosol spalten Transferasen den Esterrest ab, wodurch das Fura-2, nun als freie Säure vorliegend, an Hydrophilie gewinnt und in der Zelle „gefangen“ ist. In dieser Form ist es Ca^{2+} -sensitiv. Bei einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} bilden sich Fura-2- Ca^{2+} -Komplexe, wodurch die Emission bei 380 nm sinkt und bei 340 nm steigt (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1990).

2.7.2.2 Versuchsdurchführung

Die ARPE-19 Zellen wurden auf die gleiche Weise vorbereitet, wie es bei den entsprechenden Patch-Versuchen der Fall war, allerdings wurden 15-mm-Deckgläser genutzt. Sie wurden dann am Versuchstag im Dunkeln mit 2 µg Fura-2-AM, welches als Stammlösung in DMSO vorlag, beladen und 45 Minuten lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Deckgläschen mit anhaftenden Zellen wurde vorsichtig in der Badlösung, welche der K⁺-freien Lösung der Patch-Versuche entsprach, gewaschen, um das Fura-2 zu entfernen. Sie wurde in einer Aussparung der Messkammer mithilfe von Klebestreifen und Baysilone-Paste (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) fixiert und mit 150 µl Badlösung bedeckt. Anschließend wurde die Messkammer in einer Halterung auf dem 100-fachen Objektiv, welches mit einem Tropfen Immersionsöl bedeckt war, platziert. Mittels eines vorgeschalteten Filters wurde durch das inverse Mikroskop (Zeiss Axiovert 40 CFL; Zeiss) eine Gruppe von etwa 7 bis 15 Zellen fokussiert. Mithilfe von MetaFluor Fluoreszenzverhältnis-Imaging-Software („Metafluor“, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) wurde die Emission der Fura-2-beladenen Zellen eine Minute vor und mindestens 5 Minuten nach ATP-Zugabe gemessen. Mit einem Hochgeschwindigkeitspolychromatorsystem (Visitron Systems) wurde monochromatische Strahlung von 340 und 380 nm erzeugt. Das von den Fura-2-beladenen Zellen emittierte Licht wurde bei 510 nm gefiltert und mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (CoolSNAP EZ, Photometrics, Tucson, USA) in einem 2-Sekunden-Abstand über die gesamte Messdauer detektiert.

2.7.2.3 Auswertung

Für die Auswertung, welche mit Metafluor und Microsoft Excel durchgeführt wurde, wurde das Verhältnis (*Ratio R*) aus den Fluoreszenzintensitäten bei den Extinktionswellenlängen von 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}) verwendet:

$$R = F_{340}/F_{380}.$$

Auf diese Weise kann eine Beeinflussung durch äußere Faktoren wie Abweichung der hinzugefügten Menge Fura-2, der Intensität an Exzitationsstrahlung und weiterer Faktoren vermieden werden (Moore *et al.*, 1990). Das vereinfacht die Messungen und ihre Vergleichbarkeit erheblich. Die *Ratio* steigt proportional zum intrazellulären Ca²⁺-Anstieg.

Aus jeder Messung wurden mindestens 3 Zellen ausgewertet. Es wurden nur solche Zellen verwendet, bei denen die *Basis-Ratio* zwischen 0,6 und 0,8 lag. Es wurde ein Diagramm aus den Mittelwerten aller *Ratios* zu jedem Messzeitpunkt erstellt.

2.8 Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden statistisch analysiert, wenn Messwerte von mindestens drei Experimenten pro Versuchsgruppe zur Auswertung vorlagen. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben, falls nicht explizit anders vermerkt. „n“ gibt die Anzahl der Experimente einer durchgeführten Messreihe an. Zur Berechnung der Signifikanzniveaus wurde nach Prüfung auf Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests ein parametrischer oder parameterfreier Test für verbundene oder unverbundene Stichproben verwendet. Um unabhängige Datensätze miteinander zu vergleichen, wurde bei Normalverteilung der Daten der ungepaarte t-Test nach Student angewandt, bei nicht normalverteilten Daten oder weniger als vier Werten der Mann-Whitney-U-Test. Wurden zwei abhängige Datensätze verglichen, wurde ein gepaarter t-Test verwendet, lagen keine Normalverteilung oder weniger als vier Werte vor, der Wilcoxon-Test. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn der p-Wert unter 0,05 lag, die Irrtumswahrscheinlichkeit also weniger als 5 % betrug. Die Signifikanzniveaus wurden dem p-Wert entsprechend wie folgt definiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Berechnungen wurden mit Microsoft Excel, SigmaPlot und GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ionomycin-induzierte Leitfähigkeiten von humanen Linsene­pithelzellen unter K^+ -haltigen Bedingungen

Der Einfluss einer gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Leitfähigkeit von humanen Linsene­pithelzellen wurde untersucht. Dafür wurden Stromantworten von in der Ganzzell-Konfiguration befindlichen HLE B-3 Zellen auf die Zugabe von 1 μ M Ionomycin zur Badlösung untersucht. Stimuliert wurden die Zellen stets mit dem Verlaufsspannungsprotokoll (Abbildung 2.4). Zunächst wurden K^+ -haltige Lösungen mit asymmetrischer, intrazellulär niedriger Cl^- -Konzentration verwendet, um unter annähernd physiologischer Elektrolytzusammensetzung zu messen. Zur Differenzierung zwischen Cl^- - und K^+ -Strömen wurde die intrazelluläre Cl^- -Konzentration in einer zweiten Versuchsreihe angehoben. Zur Bewertung der physiologischen Relevanz wurden die Experimente an primären Linsene­pithelzellen wiederholt. Anschließend wurde der Einfluss des kataraktogenen Faktors TGF β 2 auf HLE B-3 Zellen untersucht.

3.1.1 Leitfähigkeit von HLE B-3 Zellen unter K^+ -haltigen Bedingungen

In K^+ -haltigen Lösungen mit asymmetrischer Cl^- -Verteilung reagierten die HLE B-3 Zellen mit einem signifikanten Stromanstieg auf die Ionomycin-Zugabe. Die Gesamtstromdichte, die unter Kontrollbedingungen $5,89 \pm 1,62$ pA/pF (n=8) betrug, stieg auf $46,38 \pm 4,26$ pA/pF (n=8). Die Beziehung von Stromdichte zu Spannung war linear. Kennzeichnend für die Art des Ionenflusses ist auch das Umkehrpotential. Als die Spannung, bei welcher der Stromfluss über die Zellmembran faktisch null ist, wird es als Schnittpunkt der Strom-Spannungskennlinie mit der x-Achse abgelesen. Das Umkehrpotential stieg von $-16,14 \pm 2,05$ mV auf $0,91 \pm 1,36$ mV (n=8), womit es dem Gleichgewichtspotential monovalenter Kationen unter den gegebenen Bedingungen entsprach. Es gab keine Anzeichen auf eine relevante Beteiligung von K^+ -Kanälen.

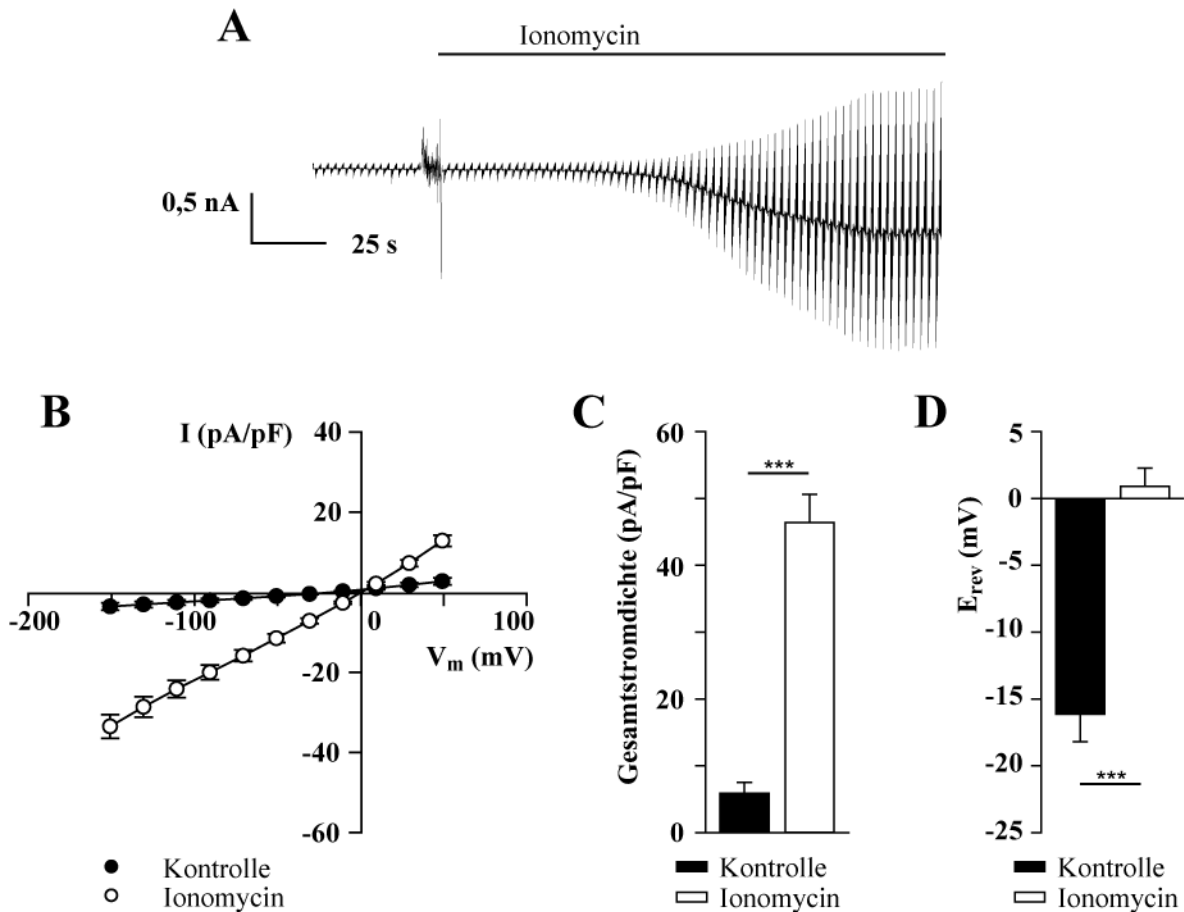


Abbildung 3.1: Effekt von 1 μM Ionomycin auf die Leitfähigkeit von HLE B-3 Zellen in K^+ -haltigen Lösungen mit asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Stroms. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe vergleichen (n=8; Mittelwerte \pm SEM; *** p < 0,001).

Da eine K^+ -Leitfähigkeit der HLE B-3 Zellen erwartet wurde, wurde zur Unterscheidung zwischen potentiellen K^+ - und Cl^- -Strömen der Versuch mit erhöhter intrazellulärer Cl^- -Konzentration durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wies der Kontrollstrom eine leichte Auswärtsrektifikation und ein negatives Umkehrpotential von $-34,98 \pm 4,19$ mV (n=5). Der Ionomycin-induzierte Strom besaß hingegen eine annähernd lineare Strom-Spannungsbeziehung und ein erhöhtes Umkehrpotential von $-1,21 \pm 1,36$ mV (n=5). Die Gesamtstromdichte stieg von $3,00 \pm 0,97$ pA/pF auf $52,51 \pm 5,06$ pA/pF (n=5).

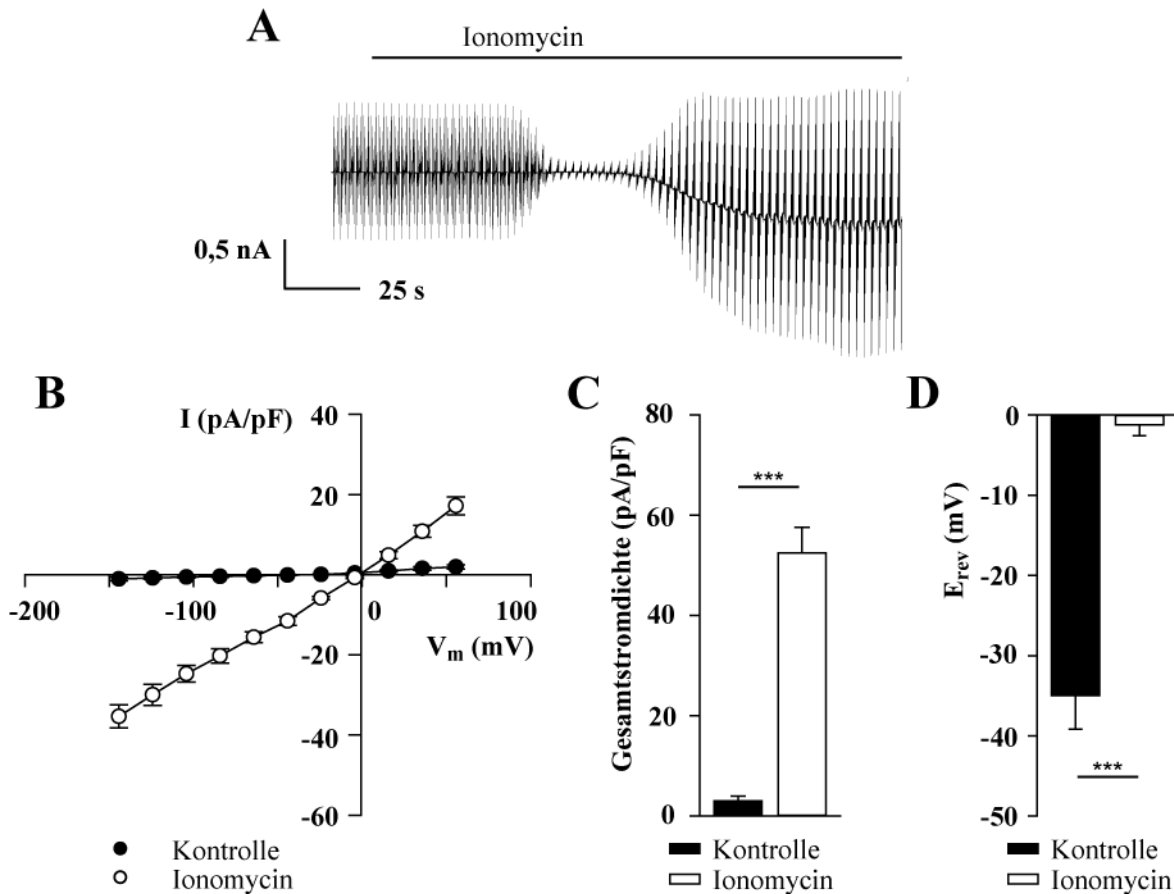


Abbildung 3.2: Ionomycin-induzierte (1 μ M) Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen in K^+ -haltigen Lösungen unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe vergleichen (n=5; Mittelwerte \pm SEM; *** p < 0,001).

3.1.2 K^+ -Leitfähigkeit primärer Linseneithelzellen

Um die physiologische Relevanz der Beobachtungen an der Zelllinie bewerten zu können, wurde der Versuch mit primären Linseneithelzellen wiederholt.

Bereits unter Kontrollbedingungen zeigten die primären Linseneithelzellen einen auswärtsrektifizierenden Strom unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. Die Zugabe von Ionomycin bewirkte einen Rückgang des Auswärtsstroms bei 4 von 7 HLE B-3 Zellen, bevor es wie auch bei der Zelllinie bei allen Zellen zu einem Anstieg von gleichermaßen auswärts- und einwärtsgerichtetem Strom und einer Depolarisation der Zellen kam. Die Stromdichte sank dabei von anfänglichen $18,88 \pm 4,32$ pA/pF (n=7) auf $3,81 \pm 1,31$ pA/pF (n=4) während des Minimums und stieg dann auf Werte von $58,93 \pm 12,31$ pA/pF (n=7). Das Umkehrpotential stieg von $-40,34 \pm 4,31$ (n=7) vor Ionomycin-Applikation auf $-10,04 \pm 6,33$ mV (n=7) im Steady State der Stromantwort.

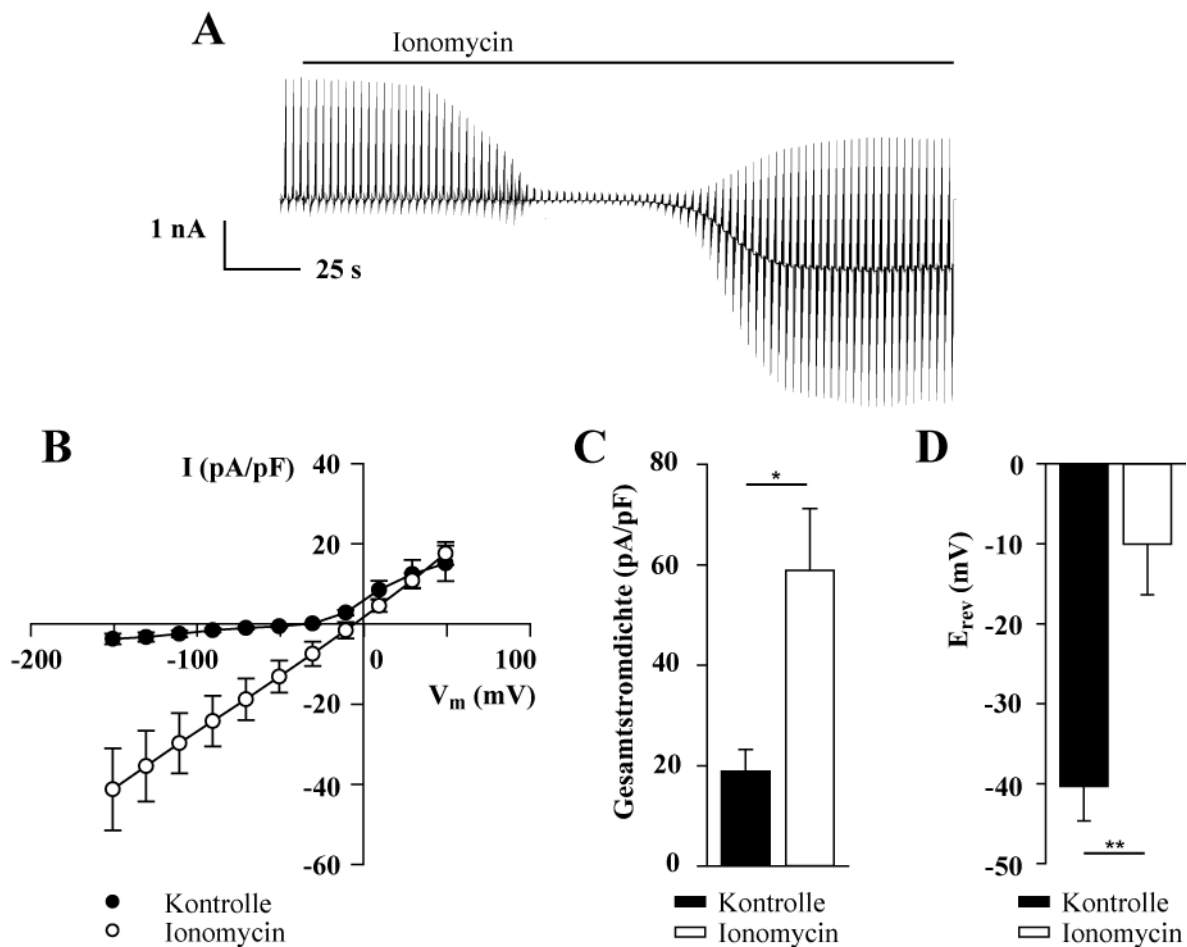


Abbildung 3.3: 1 µM Ionomycin induziert Stromanstieg und Membrandepolarisation in primären Linseneithelzellen unter K⁺-haltigen und asymmetrischen Cl⁻-Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären Linseneithelzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe darstellen (n=7; Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01).

Ein Anheben der intrazellulären Cl⁻-Konzentration resultierte in ähnlichen Stromantworten. Die anfängliche Stromdichte von $21,28 \pm 6,69$ pA/pF (n=6) sank nach Ionomycin-Zugabe zunächst bei 4 von 6 Zellen auf $4,31 \pm 1,18$ pA/pF (n=4), stieg dann jedoch bei allen Zellen auf $64,83 \pm 16,79$ pA/pF (n=6). Das Umkehrpotential stieg dabei von $-26,23 \pm 5,80$ mV auf $-13,96 \pm 5,91$ mV (n=6), womit es sich zu beiden Zeitpunkten der Auswertung nicht signifikant von den Umkehrpotentialen unter asymmetrischen Cl⁻-Bedingungen unterschied (p > 0,05).

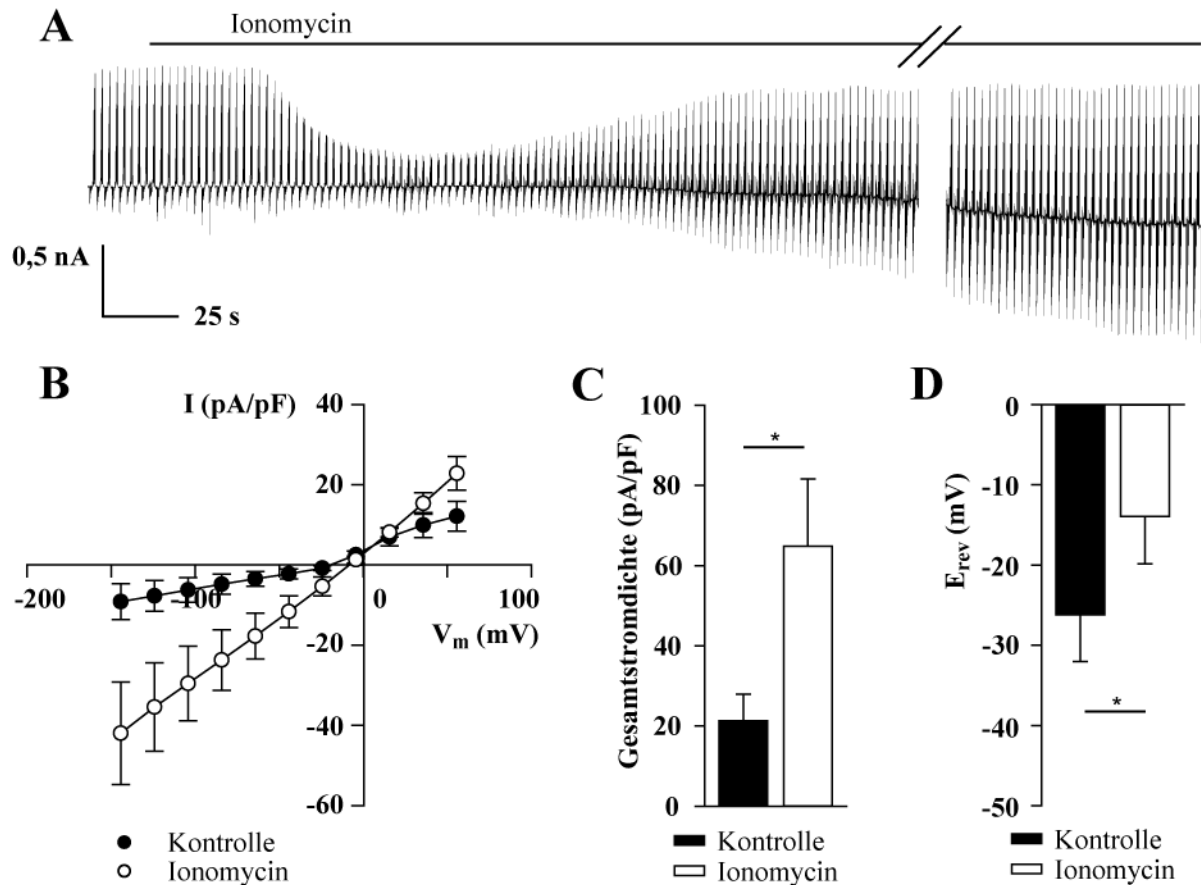


Abbildung 3.4: Ionomycin-induzierter (1 μM) Stromanstieg begleitet von Membrandepolarisation in primären Linsenepithelzellen in K^+ -haltigen Lösungen unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären Linsenepithelzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe darstellen (n=6; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05).

Auffällig war bei den primären Linsenepithelzellen eine starke Heterogenität verglichen mit den HLE B-3 Zellen. Bei 8 von 13 Zellen bewirkte Ionomycin eine anfängliche Stromreduktion mit leichter Erhöhung des Umkehrpotentials. Bei 4 Zellen rief es einen transienten auswärtsgerichteten Strom hervor. Eine Gemeinsamkeit aller primären Linsenepithelzellen war das Auftreten des Ionomycin-induzierten Stroms mit linearer Strom-Spannungsbeziehung. Jedoch wichen die Umkehrpotentiale dieses Stroms stark voneinander ab.

Zusammenfassend unterschieden sich die primären Linsenepithelzellen bezüglich ihrer K^+ -Leitfähigkeit grundlegend von der Zelllinie HLE B-3. Eine Gemeinsamkeit ist aber eine starke Ca^{2+} -aktivierte Leitfähigkeit, die mit einer Depolarisation der Zellmembran einhergeht.

3.1.3 Effekt von TGF β 2 auf K⁺-Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen

Der kataraktogene Faktor TGF β 2 führt zu einer veränderten Genexpression in Linsenepithelzellen. Ein Einfluss auf die funktionelle Expression von Ionenkanälen wurde durch den biophysikalischen Vergleich von HLE B-3 Zellen, die zuvor 48 Stunden in serumfreien Medium mit TGF β 2 behandelt wurden, und parallel identisch, aber ohne TGF β 2, kultivierten HLE B-3 Zellen untersucht. Es wurden Lösungen nach Fox *et al.* (1988) mit asymmetrischen Cl⁻-Konzentrationsverhältnissen verwendet (Kapitel 2.2.4). Die unbehandelten Zellen verhielten sich insofern identisch zu den unter Standardbedingungen kultivierten HLE B-3 Zellen aus Abbildung 3.1, dass Ionomycin einen Strom mit einer linearen Strom-Spannungsbeziehung und einem Umkehrpotential nahe 0 mV hervorrief.

11 von 26 TGF β 2-behandelten Zellen reagierten hingegen auf die Zugabe von Ionomycin zunächst mit einem Anstieg der auswärtsgerichteten Leitfähigkeit, die von einer Hyperpolarisation der Zellmembran begleitet wurde. Dieser „hyperpolarisierende Auswärtsstromspeak“ wird weiter als „Effekt 1“ oder „hyperpolarisierender Effekt“ bezeichnet. Zeitverzögert wurde ein Strom mit linearem Strom-Spannungsverhältnis induziert, der mit einer Depolarisation der Zellmembran einherging. Er wird weiter als „Effekt 2“ oder „depolarisierender Effekt“ bezeichnet.

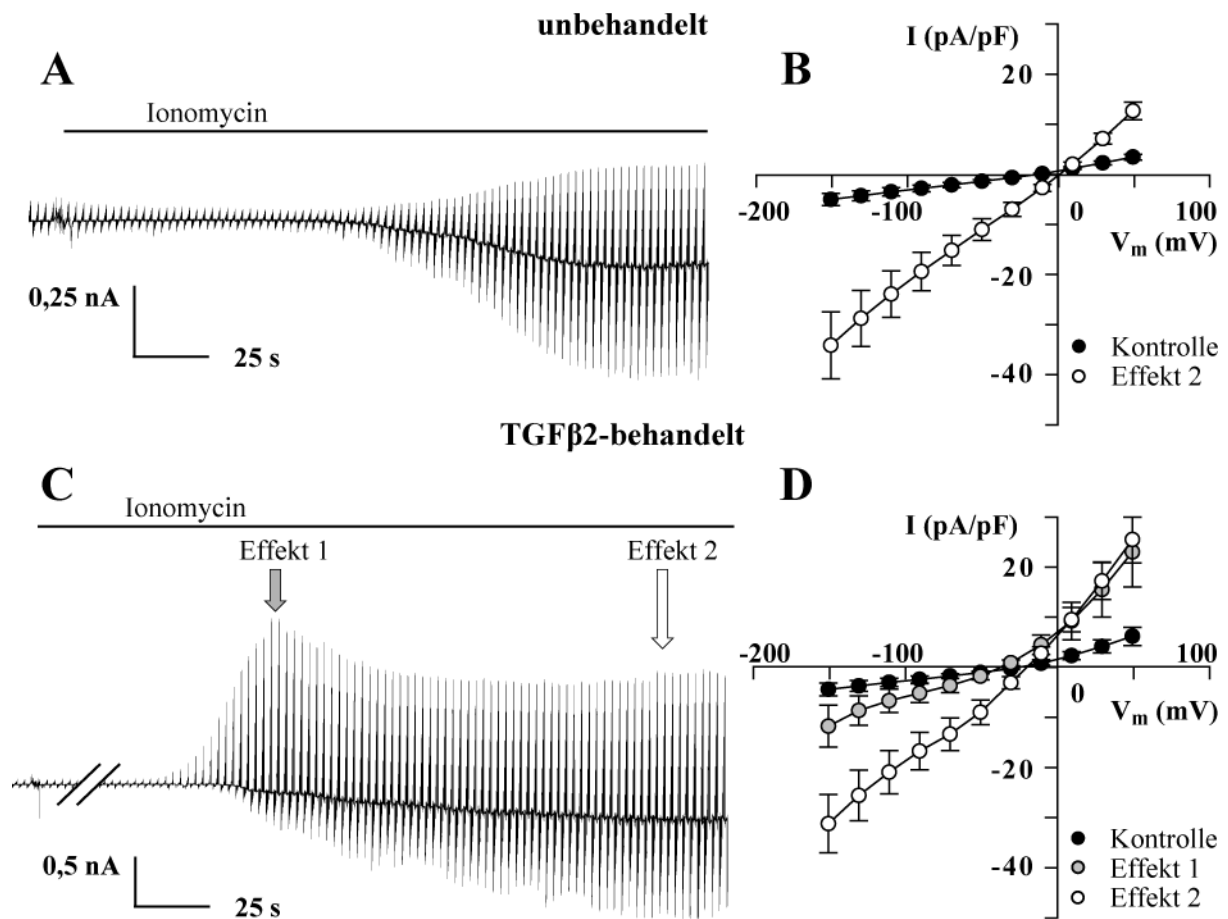


Abbildung 3.5: Ionomycin-induzierte (1 μM) Leitfähigkeit von unbehandelten und TGF β 2-behandelten HLE B-3 Zellen. A, C: Repräsentative Stromantworten von unbehandelten (A) und TGF β 2-behandelten HLE B-3 Zellen (C) auf Verlaufsspannungsprotokoll. B, D: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und im Steady State des Ionomycin-induzierten depolarisierenden Effekts (Effekt 2) in unbehandelten (B; n=11) und TGF β 2-behandelten HLE B-3 Zellen (D; n=6). In D zusätzlich Kennlinie eines Auswärtsstrompeaks nach Ionomycin-Zugabe (Effekt 1) (n=6-11; Mittelwerte \pm SEM).

Jener „Peak“ (Effekt 1) ging einher mit einer signifikanten Erhöhung der Auswärtsstromdichte um $13,05 \pm 4,58$ pA/pF (n=11), wohingegen die Auswärtsstromdichte der unstimulierten Zellen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt unverändert blieb. Mit Induzierung des auswärtsgerichteten Leitfähigkeitspeaks (Effekt 1) sank das Umkehrpotential von initial $-17,58 \pm 3,19$ mV auf $-29,15 \pm 3,06$ mV (n=11); das der unstimulierten Zellen änderte sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

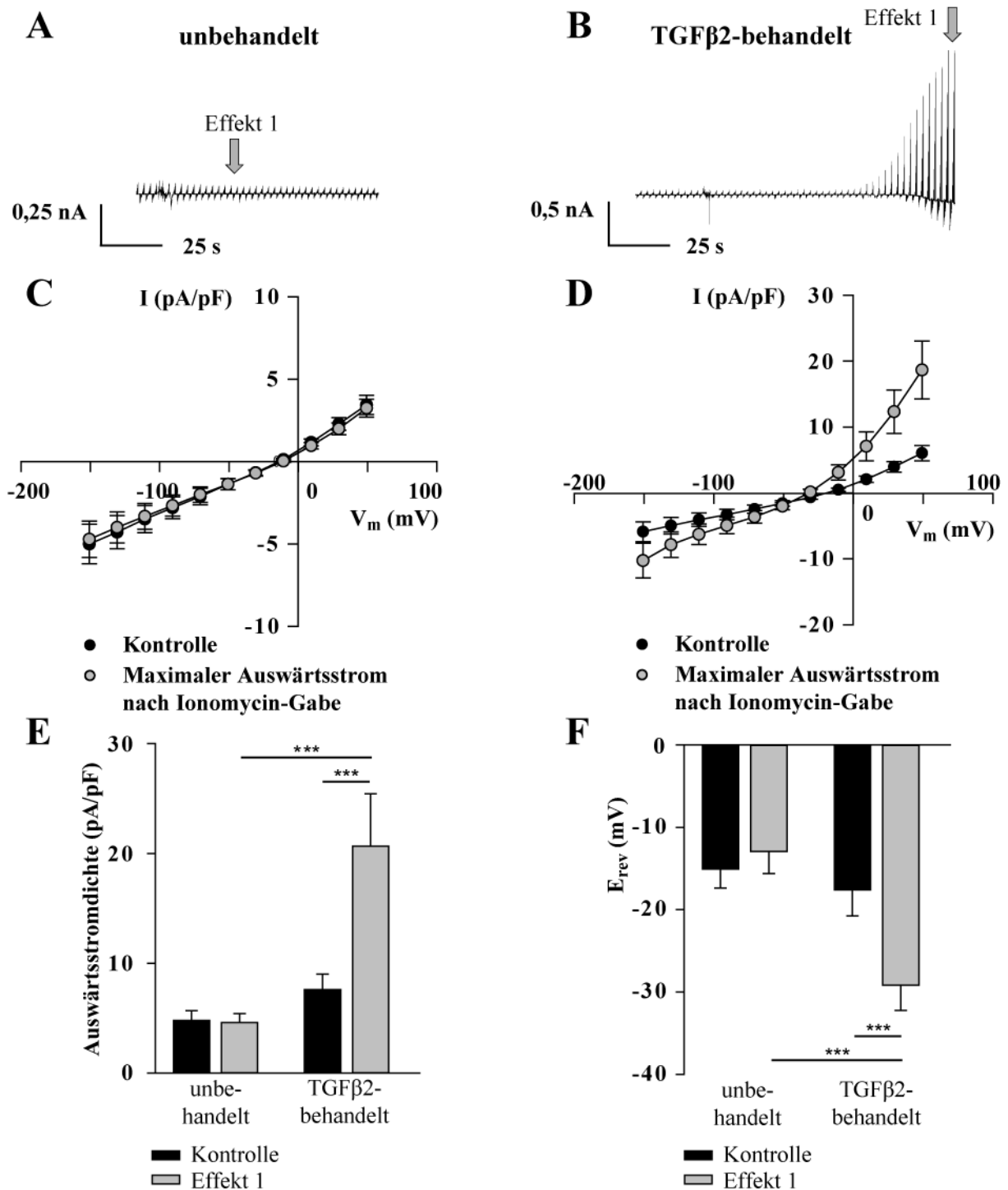


Abbildung 3.6: Ionomycin-bedingte (1 µM) Induzierung eines hyperpolarisierenden Auswärtsstroms in TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen. A, B: Vergrößerung der ersten Minute der Stromantworten der unbehandelten (A) und TGFβ2-behandelten Zelle (B) aus Abbildung 3.5. C, D: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe sowie während des maximalen Auswärtsstroms nach Ionomycin-Zugabe aber vor „Effekt 2“ von unbehandelten (C; n=11) und TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen (D; n=11). Sämtliche TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen, die einen Ionomycin-bedingten Auswärtspeak zeigten, wurden eingepflegt (D). E, F: Balkendiagramme, welche die Auswärtsstromdichten (E) und Umkehrpotentiale (F) der unbehandelten und TGFβ2-behandelten Zellen basierend auf den Kennlinien in B und D vergleichen (n=11; Mittelwerte ± SEM; *** p < 0,001).

Bei 5 von 11 TGFβ2-behandelten Zellen wurde beim Erreichen eines maximalen Auswärtsstroms (Effekt 1) 1 μM Paxillin zur Badlösung gegeben, um den Effekt eindeutig K⁺-Kanälen zuordnen und von Cl⁻-Kanälen abgrenzen zu können. Der Maxi-K-Kanalinhistor konnte den Auswärtsstrom inhibieren und diesen so als K⁺-Strom durch Maxi-K-Kanäle identifizieren. Die Auswärtsstromdichte sank nach Paxillin-Zugabe von $15,88 \pm 5,33$ pA/pF auf $7,22 \pm 2,15$ pA/pF (n=5), das Umkehrpotential stieg von $-24,88 \pm 4,34$ mV auf $-7,00 \pm 1,44$ mV (n=5).

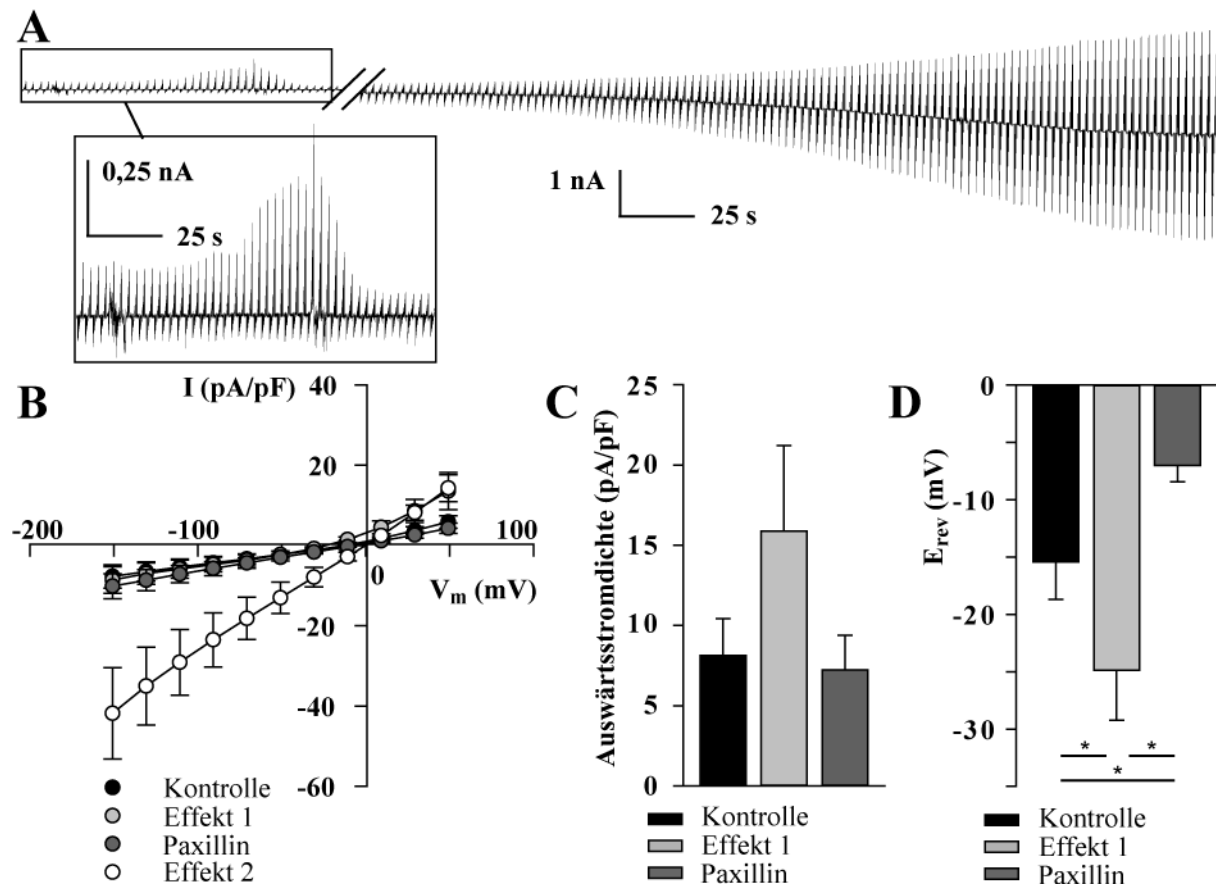


Abbildung 3.7: Sensitivität des auswärtsgerichteten Strompeaks gegenüber 1 μM Paxillin. A: Repräsentative Stromantwort einer TGFβ2-vorbehandelten HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. Ionomycin induziert einen auswärtsgerichteten Strom, welcher durch Paxillin-Zugabe inhibiert wird. B: Strom-Spannungskennlinien der Stromantworten vor Ionomycin-Zugabe, während des Maximums des auswärtsgerichteten Stroms nach Ionomycin, nach Stromreduktion durch Paxillin sowie im Steady State einer Leitfähigkeitserhöhung mit Depolarisation. C, D: Balkendiagramme, welche die Auswärtsstromdichten (C) und die Umkehrpotentiale (D) der mit TGFβ2 behandelten Zellen vor Ionomycin-Zugabe, während des Auswärtsstrompeaks und nach Paxillin-Gabe vergleichen (n=5; Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05).

Der zweite Effekt wurde nicht durch die Paxillin-Applikation unterbunden. Das Umkehrpotential erreichte während „Effekt 2“ $-0,80 \pm 1,41$ mV (n=4). Diese Werte waren vergleichbar mit denen der unbehandelten Zellen von $1,15 \pm 2,30$ mV (n=11). Eine Hemmung

der Maxi-K-Kanäle hob somit den signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Umkehrpotentialen der TGF β 2-behandelten Zellen, welcher $-25,93 \pm 3,09$ mV ($n=6$) betrug, und der unbehandelten Zellen im depolarisierenden Effekt (Effekt 2) auf.

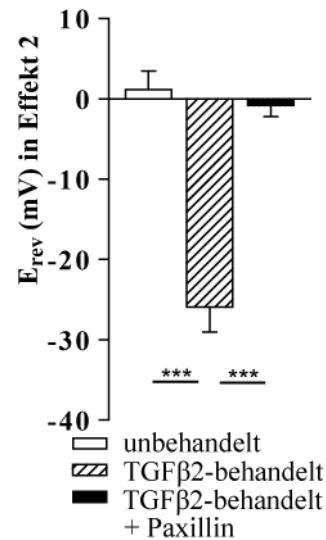


Abbildung 3.8: Einfluss der TGF β 2-Vorbehandlung und Paxillin-Zugabe auf Umkehrpotentiale des zweiten Effekts. Balkendiagramm, das die Umkehrpotentiale der unbehandelten ($n=11$), der TGF β 2-behandelten ($n=6$) und der TGF β 2- und Paxillin-behandelten Zellen ($n=4$) vergleicht ($n=4-11$; Mittelwerte \pm SEM; *** $p < 0,001$).

3.2 Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in humanen Linsenepithelzellen unter Ausschluss von K^+ -Strömen

Allen bisherigen Messungen war eine starke Erhöhung der Leitfähigkeit durch Ionomycin gemein, die mit einer Depolarisation der Linsenepithelzellen einherging und nicht die Charakteristik eines K^+ -Stroms besaß. Dieser Effekt wurde näher untersucht und charakterisiert. Die bereits beschriebenen Patch-Clamp-Experimente wurden unter K^+ -freien Bedingungen wiederholt, um die Ströme von Cl^- -Ionen oder monovalenten Kationen isoliert von dem Einfluss durch K^+ -Kanäle zu untersuchen. Ersetzt wurden die K^+ -Salze durch die äquimolaren Mengen des entsprechenden Cs^+ -Salzes intrazellulär und Tetraethylammoniumchlorids (TEACl) extrazellulär. Beide besitzen zudem eine breit wirksame inhibitorische Wirkung auf K^+ -Kanäle (Adelman & Senft, 1966; Armstrong, 1969; Clay, 1985), was den Ausschluss einer manipulativen Wirkung ebendieser auf untersuchte Umkehrpotentiale und Stromdichten zusätzlich unterstützte.

3.2.1 Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen unter Ausschluss von K^+ -Strömen

Unter diesen Bedingungen und einer asymmetrischen Verteilung von Cl^- in Bad- und Pipettenlösung (Kapitel 2.2.4) zeigten die HLE B-3 Zellen eine nahezu identische Reaktion wie unter den entsprechenden K^+ -haltigen Bedingungen. Mit einer Latenzzeit von durchschnittlich 2 Minuten bewirkte Ionomycin eine starke, gleichermaßen einwärts- und auswärtsgerichtete Leitfähigkeitserhöhung von insgesamt $6,45 \pm 0,62$ pA/pF auf $41,44 \pm 2,95$ pA/pF ($n=70$), die mit einer Depolarisation der Zellen einherging. Die entsprechenden Strom-Spannungskennlinien waren linear. Das Umkehrpotential stieg von $-12,80 \pm 0,62$ mV auf $-0,90 \pm 0,60$ mV ($n=70$). Damit entsprach es in etwa dem Umkehrpotential für monovalente Kationen in den entsprechenden Lösungen, nicht jedoch dem von Cl^- -Ionen.

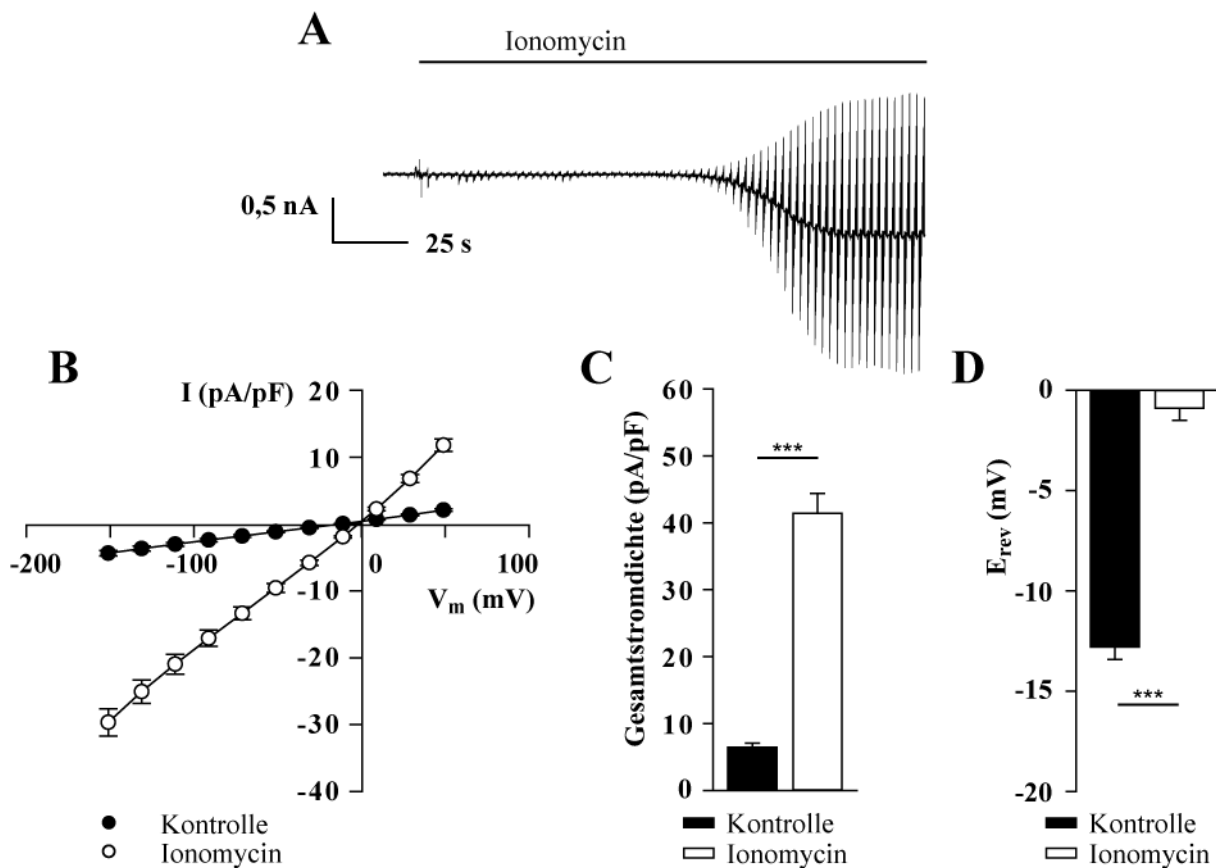


Abbildung 3.9: Effekt von 1 μ M Ionomycin auf die Leitfähigkeit von HLE B-3 Zellen in K^+ -freien Lösungen mit asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Stroms. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe vergleichen ($n=70$; Mittelwerte \pm SEM; *** $p < 0,001$).

Ein Anheben der Cl^- -Konzentration in der Pipettenlösung, welches in annähernd extra- zu intrazellulär symmetrischen Cl^- -Bedingungen resultierte, beeinflusste die Charakteristik der

Stromantwort nach Ionomycin-Zugabe nicht. Das Umkehrpotential stieg nicht signifikant ($p > 0,05$) von $-8,59 \pm 8,07$ mV auf $-4,55 \pm 1,73$ mV ($n=5$) und ähnelte damit dem Umkehrpotential des Ionomycin-induzierten Stroms unter asymmetrischen Cl^- -Verhältnissen. Die Gesamtstromdichte stieg von $3,96 \pm 1,02$ pA/pF auf $96,21 \pm 13,47$ pA/pF ($n=5$), womit es die Gesamtstromdichte unter asymmetrischen Cl^- -Verhältnissen signifikant überstieg ($p < 0,001$).

Verglichen mit dem äquivalenten Experiment unter K^+ -haltigen Bedingungen kam es durch Entfernen der K^+ -Ionen zu einem Verlust der Auswärtsrektifizierung des Kontrollstroms und mit $-8,59 \pm 8,07$ mV ($n=5$) zu einem signifikant erhöhtem Umkehrpotential ($p < 0,05$) von ebendiesem. Die Charakteristik bezüglich des linearen Strom-Spannungsverhältnisses und des Umkehrpotentials des Ionomycin-induziertem Stroms war jedoch vergleichbar.

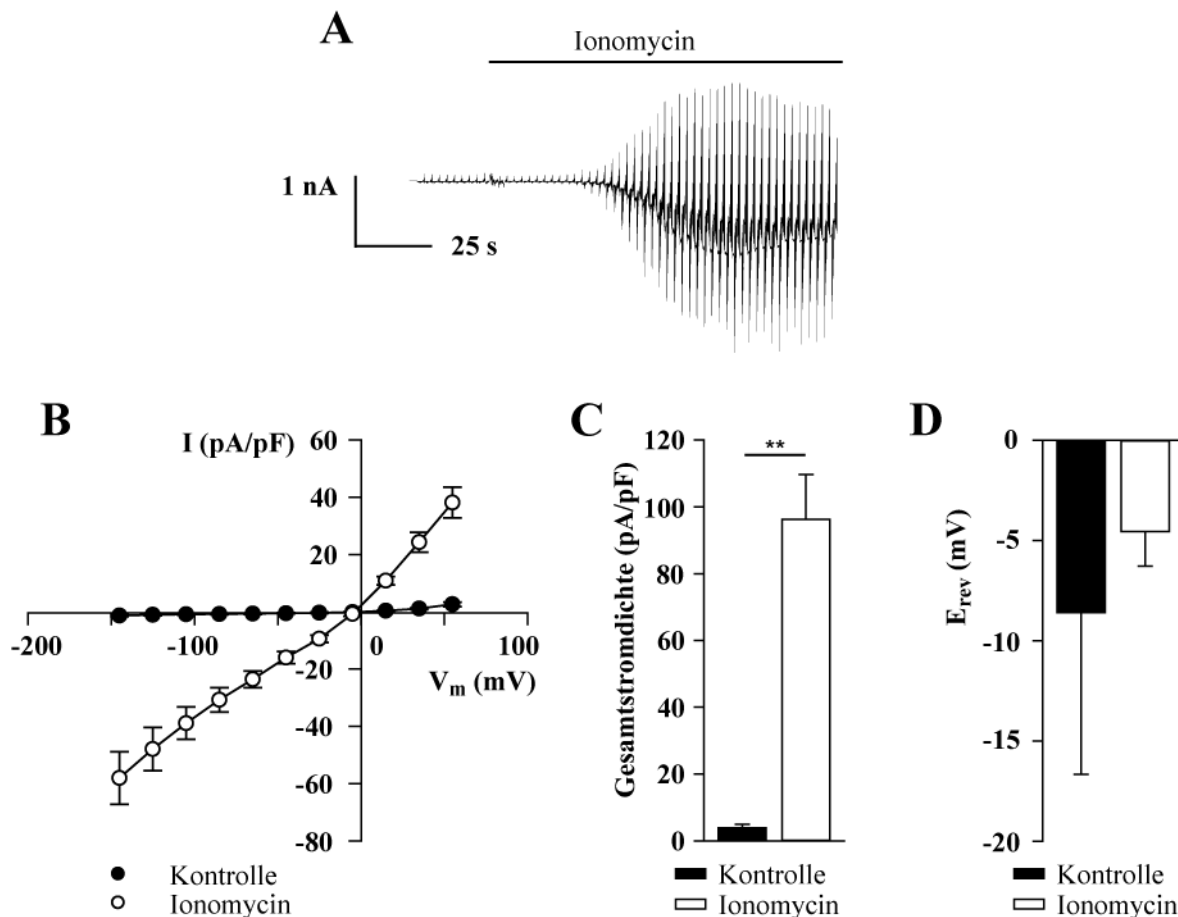


Abbildung 3.10: Ionomycin-induzierte (1 μM) Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen in K^+ -freien Lösungen mit symmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts.. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe vergleichen ($n=5$; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$).

3.2.2 Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in primären Linseneithelzellen unter K^+ -freien Bedingungen

Auch die Beobachtungen dieser Experimentreihe wurden durch Wiederholung der Versuche an primären Linseneithelzellen physiologisch verifiziert. Ohne den Einfluss von K^+ -Strömen waren die Reaktionen der primären Zellen sowohl vor als auch nach Ionomycin-Applikation unabhängig von den Cl^- -Bedingungen nahezu identisch mit denen der HLE B-3 Zellen. Der Kontrollstrom stieg nach der Applikation von Ionomycin stark an und resultierte in einem Strom mit linearer Strom-Spannungsbeziehung.

Bei einer intrazellulär geringeren Cl^- -Konzentration stieg die Gesamtstromdichte von $2,61 \pm 0,63$ pA/pF auf $63,12 \pm 5,57$ pA/pF ($n=4$), das Umkehrpotential von $-12,11 \pm 4,42$ mV auf $3,65 \pm 5,01$ mV ($n=4$).

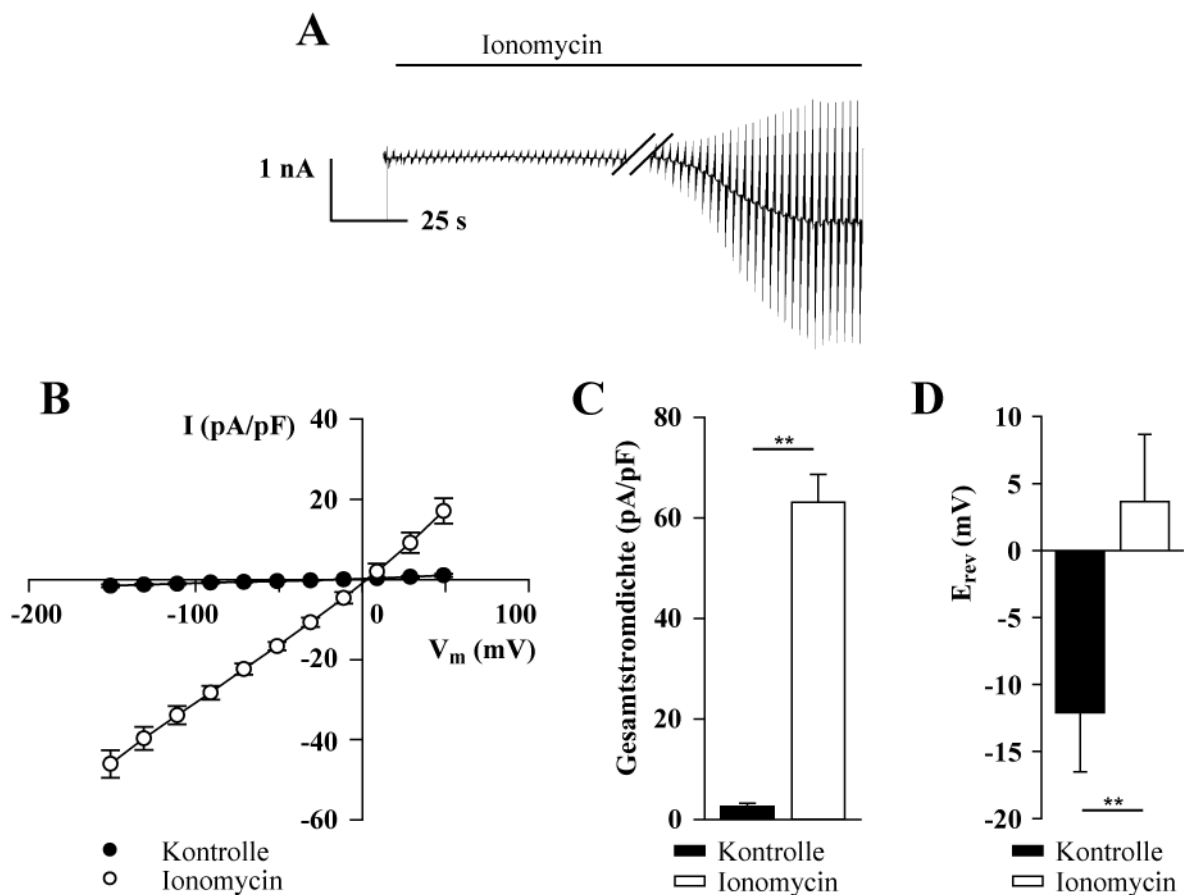


Abbildung 3.11: 1 μ M Ionomycin induziert Stromanstieg in primären Linseneithelzellen in K^+ -freien Lösungen unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären Linseneithelzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe darstellen ($n=4$; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$).

Unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen stieg die Gesamtstromdichte von anfänglichen $12,57 \pm 2,15 \text{ pA/pF}$ auf $134,98 \pm 34,81 \text{ pA/pF}$ ($n=5$). Das Umkehrpotential stieg von $-10,07 \pm 3,64 \text{ mV}$ auf $-4,74 \pm 2,94 \text{ mV}$ ($n=5$).

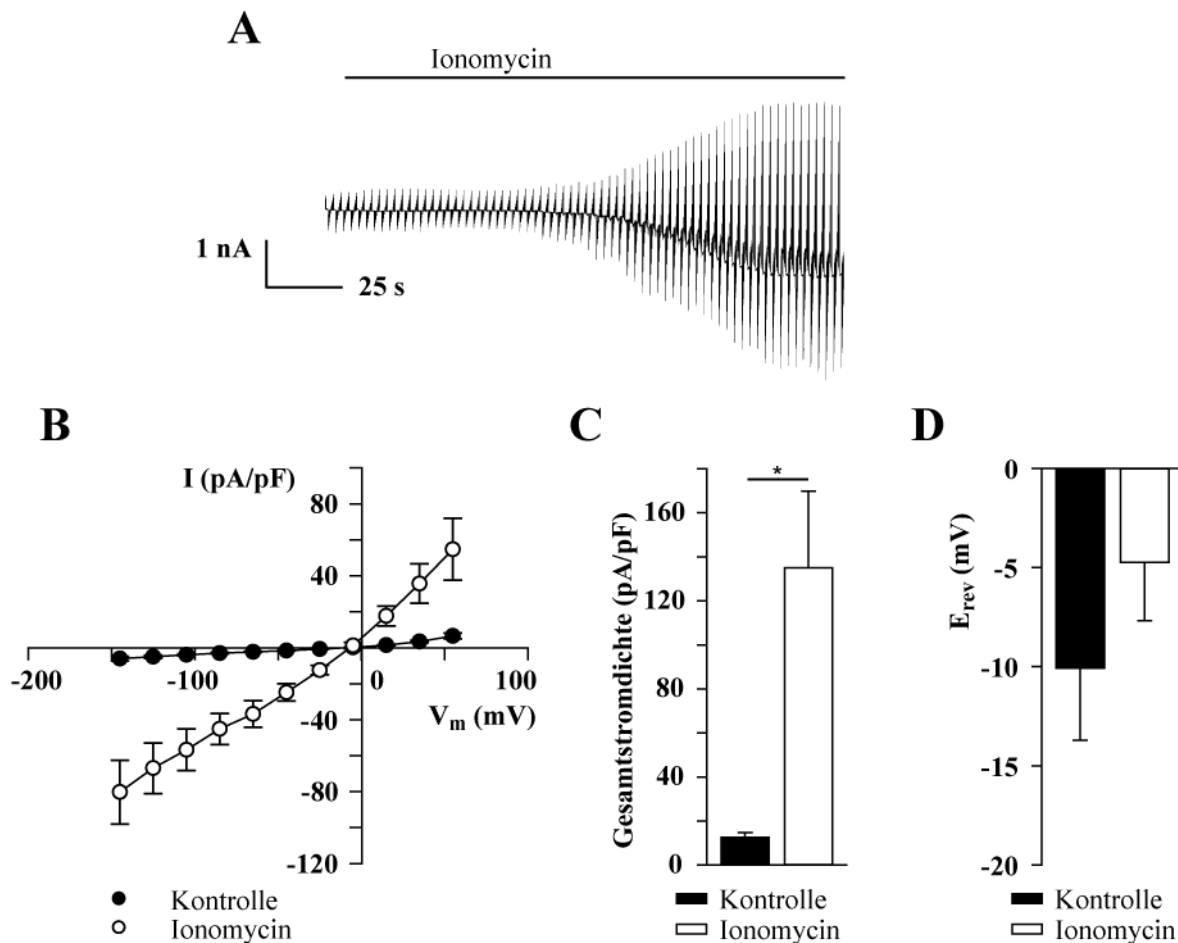


Abbildung 3.12: 1 μM Ionomycin induziert Stromanstieg in primären Linsenepithelzellen in K^+ -freien Lösungen unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären Linsenepithelzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe darstellen ($n=5$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

3.2.3 Ionomycin-induzierte Ströme in Lösungen mit asymmetrischen Konzentrationen monovalenter Kationen

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren die Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanals in primären Linsenepithelzellen und HLE B-3 Zellen. Aufgrund seines linearen Strom-Spannungsverhältnisses und der nur geringfügig veränderten Umkehrpotentiale unter variierenden K^+ - und Cl^- -Bedingungen wurde vermutet, dass dieser Strom von monovalenten Kationen getragen wurde, welche stets in symmetrischen Verhältnissen in den Lösungen vorlagen. Es wurden deshalb Versuche unter K^+ -freien Bedingungen mit asymmetrisch verteilten monovalenten Kationen durchgeführt, um diese Vermutung zu untermauern. Ersetzt

wurden sie in der Bad- oder in der Pipettenlösung durch NMDG^+ , das aufgrund seiner Größe die meisten Kationenkanäle nicht passiert.

Nach Ersetzen des extrazellulären Na^+ durch NMDG^+ induzierte Ionomycin einen stark auswärtsrektifizierenden Strom. Die Gesamtstromdichte stieg dabei von $3,70 \pm 1,15 \text{ pA/pF}$ auf $16,92 \pm 3,91 \text{ pA/pF}$ ($n=6$), wobei die Auswärtsstromdichte mit $13,15 \pm 3,21 \text{ pA/pF}$ ($n=6$) den Hauptanteil ausmachte. Das Umkehrpotential war bereits unter Kontrollbedingungen mit $-45,67 \pm 3,91 \text{ mV}$ ($n=6$) sehr niedrig und sank nach Ionomycin-Zugabe weiter auf $-50,12 \pm 2,72 \text{ mV}$ ($n=6$).

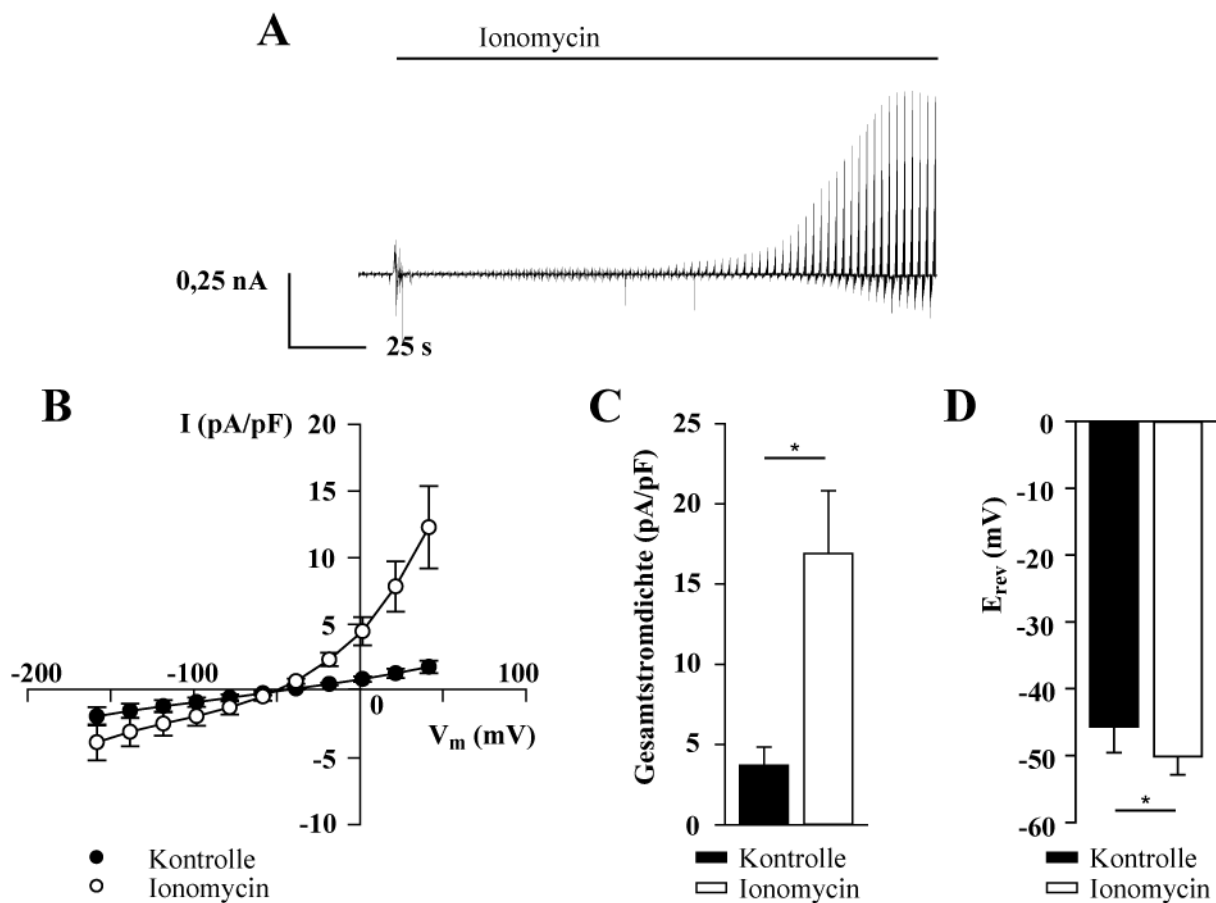


Abbildung 3.13: Ionomycin-induzierte (1 μM) auswärtsrektifizierende Ströme durch die Verringerung der extrazellulären Konzentration monovalenter Kationen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während des maximalen Ausschlags des Ionomycin-induzierten Stroms. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichte (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe vergleichen ($n=6$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

In Lösungen, aus denen Cs^+ und Na^+ gänzlich aus der Pipettenlösung entfernt worden waren, waren die Zellen instabil. Deshalb wurden 30 mM monovalente Kationen in der Badlösung belassen. Unter diesen Bedingungen führte Ionomycin in zwei voneinander abgrenzbaren Stufen zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Zunächst wurde ein Strom mit moderater

Einwärtsrektifizierung induziert. Das bedeutet, dass der Einwärtsstrom stärker anstieg als der Auswärtsstrom und fast zwei Drittel der Gesamtstromdichte von $15,50 \pm 3,10$ pA/pF ($n=10$) ausmachte. Auch das Umkehrpotential war mit $28,15 \pm 1,25$ mV ($n=10$) gegenüber dem des Kontrollstroms von $13,15 \pm 2,63$ mV ($n=10$) deutlich erhöht. Nach einer kurzen Plateau-Phase stieg die Leitfähigkeit weiter an. Es resultierte ein lediglich leicht einwärtsrektifizierender Strom mit einem Umkehrpotential von $17,29 \pm 1,95$ mV ($n=10$) und einer Gesamtstromdichte von $55,12 \pm 7,71$ pA/pF ($n=10$).

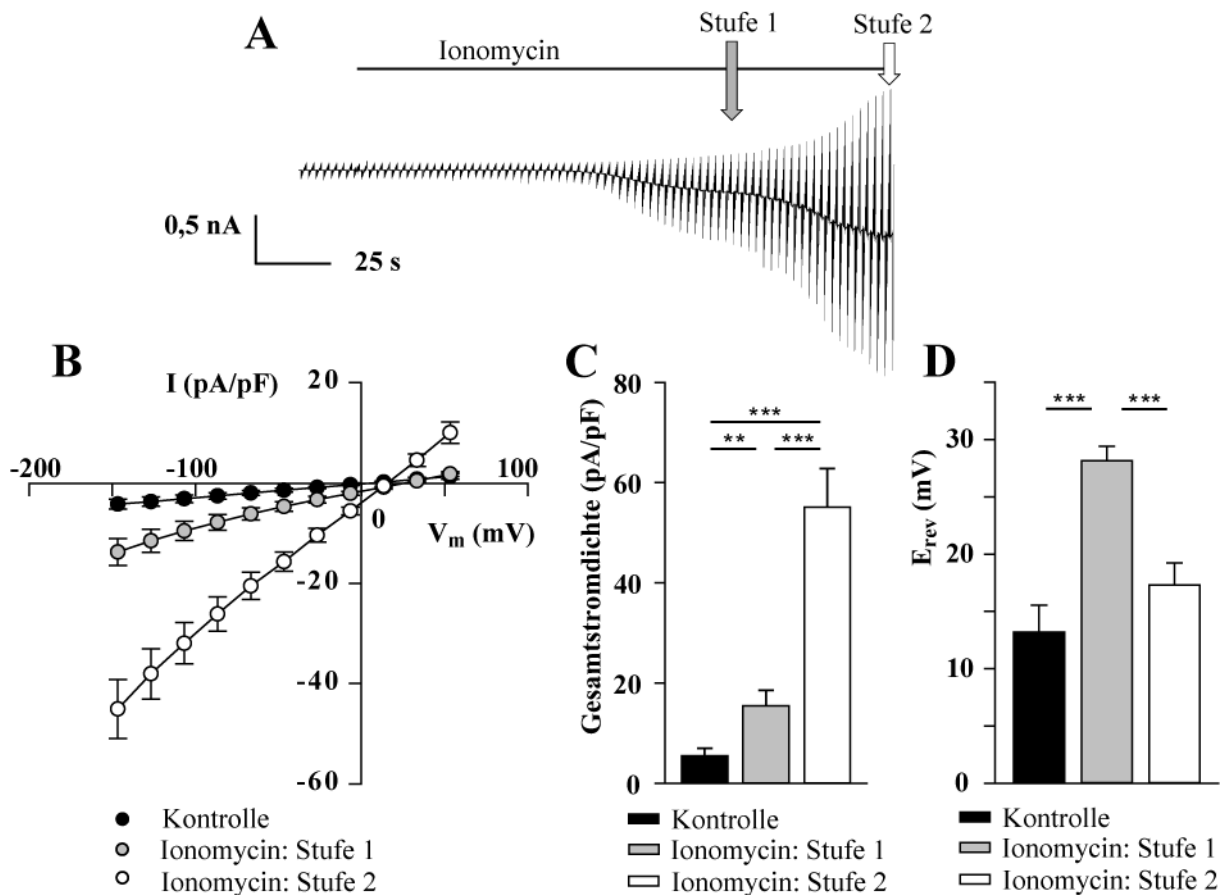


Abbildung 3.14: Ionomycin-induzierte (1 μ M) Ströme bei einer Verringerung der intrazellulären Konzentration monovalenter Kationen. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe und während Stufe 1 und Stufe 2 des Ionomycin-induzierten Stroms. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichte (C) und Umkehrpotentiale (D) der Kennlinien aus B ($n=10$; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Vergleich der Stromantworten unter unterschiedlichen Lösungsbedingungen

Unter intrazellulär niedrigen Cl^- -Bedingungen und intra- und extrazellulär symmetrischen Konzentrationen monovalenter Kationen in K^+ -freien Lösungen, welches in dieser Studie die Standardbedingungen waren, betrug ausgehend vom Haltepotential der prozentuale Anteil der Auswärtsstromdichte an der Gesamtstromdichte $50,73 \pm 0,45$ % ($n=70$), das Umkehrpotential

-0,90 ± 0,60 mV (n=70). Nach Anheben der intrazellulären Cl⁻-Konzentration änderte sich der Anteil dieser Auswärtsstromdichte mit 56,95 ± 5,44 % (n=5) kaum, ebenso wie das Umkehrpotential von -4,55 ± 1,73 mV (n=5). Ein Absenken der extrazellulären Konzentration monovalenter Kationen führte zu einer stark erhöhten prozentualen Auswärtsstromdichte von 77,20 ± 2,89 % (n=6) und einem stark verringerten Umkehrpotential von -50,12 ± 2,72 mV (n=6). Nach Absenken der intrazellulären Konzentration monovalenter Kationen war der prozentuale Anteil der Auswärtsstromdichte mit 40,63 ± 1,42 % (n=10) gegenüber dem unter Standardbedingungen verringert, das Umkehrpotential mit 28,15 ± 1,25 mV (n=10) dagegen deutlich erhöht. Erst durch eine Veränderung der Konzentration der monovalenten Kationen, nicht jedoch durch veränderte Cl⁻-Bedingungen, konnte also die Rektifikation und das Umkehrpotential der Ionomycin-induzierten Ströme beeinflusst werden. Dieses Ergebnis identifiziert einen Ca²⁺-abhängigen nicht-selektiven Kationenkanal als Mediator des untersuchten Stroms in humanen Linseneithelzellen.

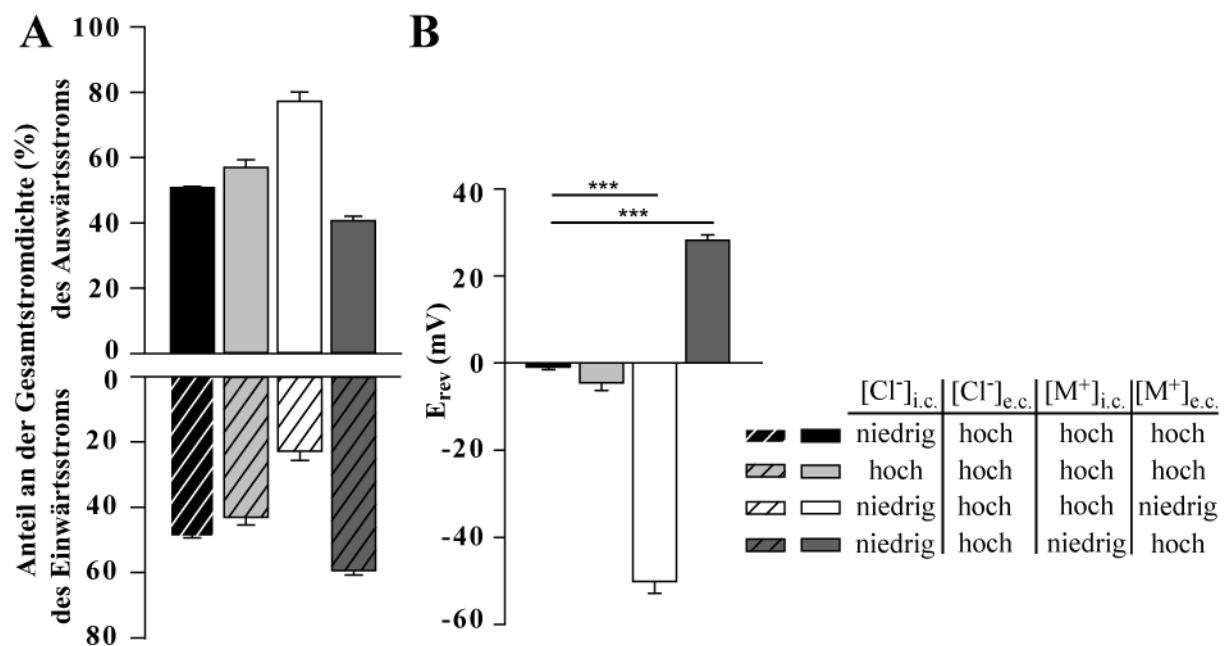


Abbildung 3.15: Vergleich der Ionomycin-induzierten Ströme unter verschiedenen Bedingungen in K⁺-freien Lösungen. A: Prozentuale Anteile der Einwärts- und Auswärtsstromdichten an den Gesamtstromdichten des Ionomycin-induzierten Stroms ausgehend vom Haltepotential unter verschiedenen Versuchsbedingungen (n=5-70; Mittelwerte ± SEM). B: Balkendiagramm, das die Umkehrpotentiale der Ionomycin-induzierten Ströme unter verschiedenen Versuchsbedingungen vergleicht. Signifikanzen in B sind bezugnehmend auf die Standardbedingungen (schwarzer Balken) dargestellt (n=5-70; Mittelwerte ± SEM; *** p < 0,001).

3.2.4 Genexpression verschiedener Ca²⁺-aktivierter nicht selektiver Kationenkanäle

In den Ganzzellableitungen konnten anhand der Umkehrpotentiale Kationen als Träger des Ionomycin-induzierten Stroms in primären Linseneithelzellen und HLE B-3 Zellen

identifiziert werden. Bislang sind nur wenige nicht-selektive Kanäle für monovalente Kationen bekannt, die durch Ca^{2+} aktiviert werden (Numata *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Um den Ca^{2+} -abhängigen nicht-selektiven Kationenkanal in den Linsenzellen zu identifizieren, wurde zunächst die mRNA-Expression der bekannten Kandidaten in primären Linsenepithelzellen und HLE B-3 Zellen untersucht. In keiner Probe wurde die mRNA von TRPC5 und PKD2L1 (Gen von TRPP2) nachgewiesen. Diese Kanäle konnten demnach ausgeschlossen werden. TRPM5-mRNA wurde in HLE B-3 Zellen, nicht jedoch in primären Linsenepithelzellen exprimiert. Sowohl in HLE B-3 Zellen als auch in primären Linsenepithelzellen fand sich mRNA von TRPC3, TRPM2, TRPM4, MCLON1 (Gen von TRPML1), Ano6 und der vermutlich interagierenden PKD1 und PKD2 (Gen von TRPP1), welche somit als Kandidaten in Frage kamen.

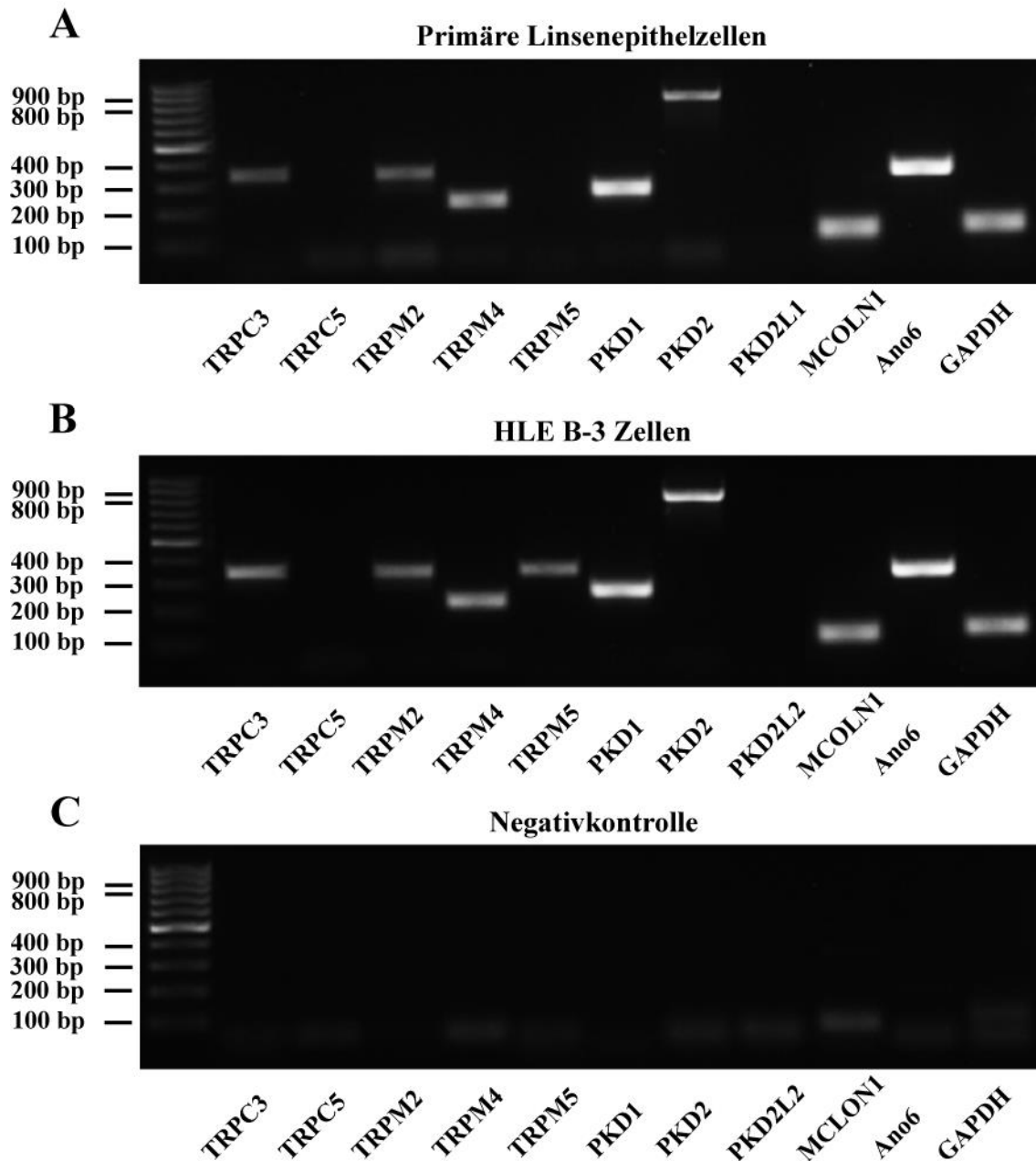


Abbildung 3.16: Genexpressionsprofil verschiedener Ca^{2+} -abhängiger Kationenkanäle in humanen Linseneithelzellen. A: Primäre Linseneithelzellen exprimieren TRPC3, TRPM2, TRPM4, PKD1, PKD2 (TRPP1), MCOLN1 (TRPML1) sowie Ano6. B: HLE B-3 Zellen exprimieren neben TRPC3, TRPM3, TRPM4, PKD1, PKD2 (TRPP1), MCOLN1 (TRPML1) und Ano6 zusätzlich TRPM5-mRNA. C: Die Negativkontrolle zeigt keine falsch positiven Ergebnisse.

3.2.5 Pharmakologische Charakterisierung der Ionomycin-induzierten Ströme

In den vorangegangenen Experimenten konnte der Ionomycin-aktivierte Kanal über die Umkehrpotentiale als nicht-selektiver Kationenkanal identifiziert und über die PCR die molekulare Expression einiger Vertreter solcher Kanäle gezeigt werden. Um mehr über die molekulare Identität des Ionomycin-induzierten Kationenstroms zu erfahren, wurde seine Hemmbarkeit durch verschiedene Kationenkanalinhibitoren getestet. Diese Blocker waren

2-APB, FFA, Rutheniumrot, DIDS, La^{3+} , Amilorid, 9-Phenanthrol, Spermin und Miconazol. Es wurden K^+ -freie Lösungen und asymmetrische Cl^- -Bedingungen verwendet, sodass K^+ -Ströme unterbunden wurden und über das Umkehrpotential auf die Art der fließenden Ionen geschlossen werden konnte.

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)

Ionomycin führte zur Aktivierung von Ionenkanälen, deren Strom durch die Zugabe von $50 \mu\text{M}$ 2-APB gehemmt wurde. Die Gesamtstromdichte wurde von $43,55 \pm 13,52 \text{ pA/pF}$ auf $8,05 \pm 5,78 \text{ pA/pF}$ ($n=5$) vermindert. Einwärts- und Auswärtsströme waren gleichermaßen von der Inhibierung betroffen. Das Umkehrpotential sank von $-1,33 \pm 1,29 \text{ mV}$ auf $-12,49 \pm 1,03 \text{ mV}$ ($n=5$), womit es annähernd den Wert des Umkehrpotentials des Kontrollstroms von $-13,67 \pm 1,57 \text{ mV}$ ($n=5$) erreichte.

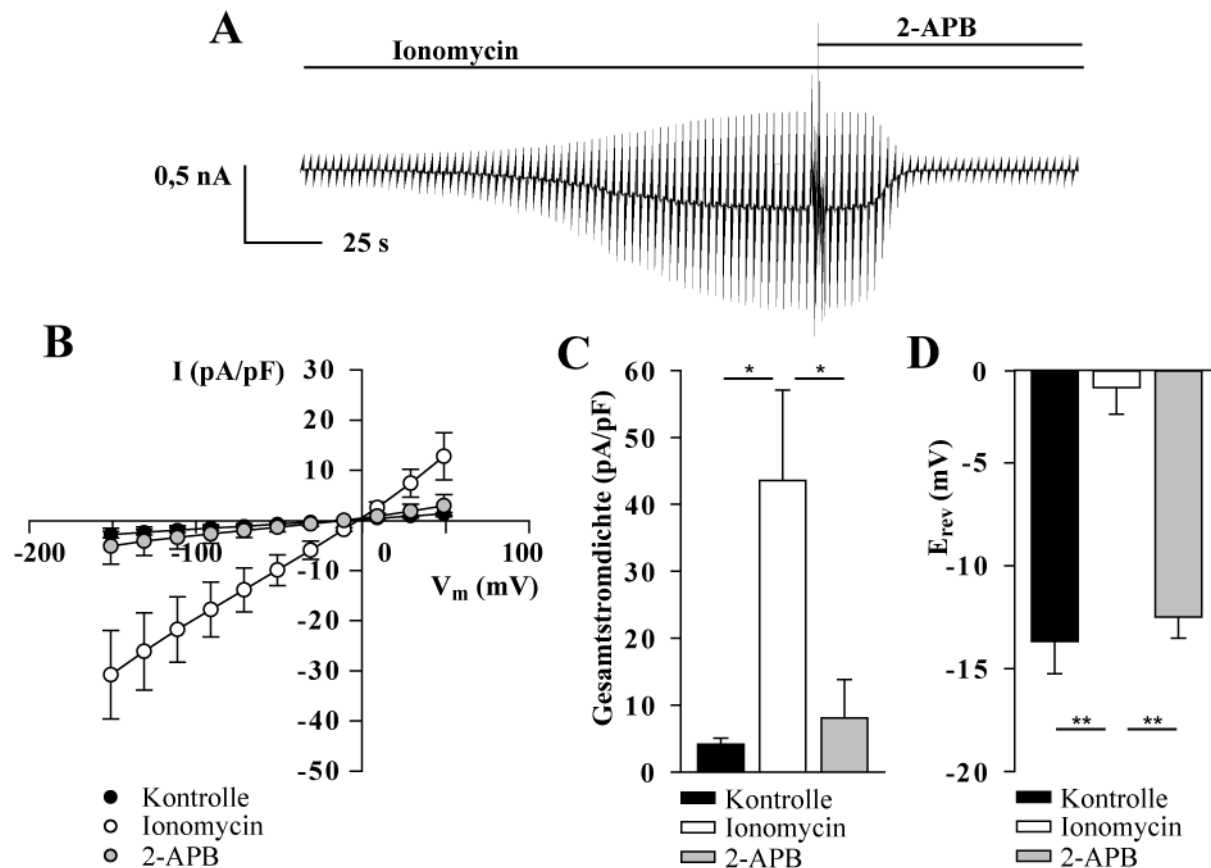


Abbildung 3.17: Blockade der Ionomycin-induzierten ($1 \mu\text{M}$) Ströme durch $50 \mu\text{M}$ 2-APB. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle stimuliert durch das Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor (Kontrolle) und nach Ionomycin-Zugabe (Ionomycin) sowie nach 2-APB-Applikation. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe sowie nach 2-APB-Applikation vergleichen. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet ($n=5$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Flufenaminsäure (FFA)

Die Zugabe von 100 μM FFA führte ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des Ionomycin-induzierten Stroms und seines Umkehrpotentials. Die Stromdichte sank von $45,95 \pm 7,20$ pA/pF auf $10,98 \pm 1,87$ pA/pF ($n=7$), das Umkehrpotential von $0,99 \pm 2,70$ mV auf $-8,41 \pm 2,92$ mV ($n=7$). Es ist demnach von einer Sensitivität gegenüber 100 μM FFA auszugehen. Bei 3 von 7 Zellen konnte nach Inhibierung des Ionomycin-induzierten Stroms ein erneuter Stromanstieg beobachtet werden, der jedoch nicht weiter untersucht wurde. Das Umkehrpotential dieses Stroms betrug $-4,08 \pm 4,42$ mV ($n=3$). FFA konnte somit einen Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanal inhibieren, jedoch einen anderen funktionell exprimierten Kanal der HLE B-3 Zellen aktivieren (siehe Abbildung 3.24).

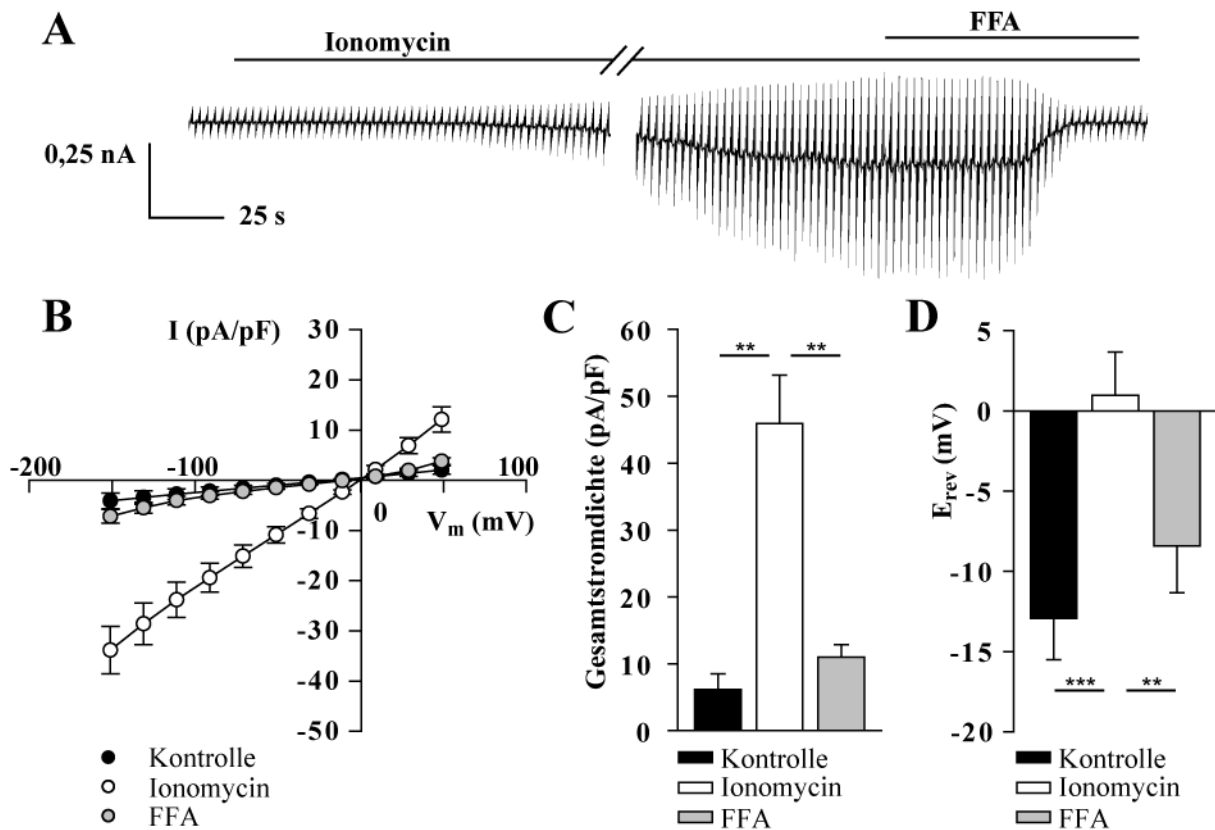


Abbildung 3.18: 100 μM FFA inhibiert Ionomycin-induzierten (1 μM) Strom. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskurven vor und nach Ionomycin- sowie nach FFA-Zugabe. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) vor (Kontrolle) und nach Ionomycin-Zugabe (Ionomycin) sowie nach FFA-Applikation vergleichen. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet (Mittelwert \pm SEM; $n=7$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Lanthanum (La³⁺)

In Form des Cl⁻-Salzes LaCl₃ appliziert inhibierten 100 µM La³⁺ in 4 von 11 Zellen einen Teil des Ionomycin-induzierten Stroms. In den übrigen 7 Zellen stieg der Strom nach Zugabe von 100 µM La³⁺ weiter an. Mindestens 90 Sekunden nach La³⁺-Zugabe wurden 100 µM FFA in die Badlösung gegeben, welche den Strom deutlich reduzierten. Insgesamt unterschieden sich die Gesamtstromdichten mit $37,68 \pm 6,31$ pA/pF (n=11) vor La³⁺-Zugabe und $34,24 \pm 4,90$ pA/pF (n=11) nach La³⁺-Zugabe kaum voneinander. Das Umkehrpotential sank ebenfalls nicht signifikant von $-0,23 \pm 0,52$ mV auf $-3,00 \pm 0,99$ mV (n=11) ($p > 0,05$).

Im Gegensatz dazu hemmten 500 µM La³⁺ die Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit. Die Stromdichte sank von $46,81 \pm 10,62$ pA/pF auf $3,05 \pm 0,61$ pA/pF (n=5). Damit lag die Stromdichte nach Zugabe von 500 µM La³⁺ sogar unter der Kontrollstromdichte von $8,54 \pm 1,61$ pA/pF (n=5). Das Ergebnis spiegelte sich auch in den Umkehrpotentialen wieder, die nach Ionomycin-Zugabe von $12,53 \pm 0,83$ mV auf $-2,14 \pm 1,52$ mV (n=5) anstiegen und durch La³⁺ wieder auf $-14,37 \pm 4,14$ mV (n=5) fielen.

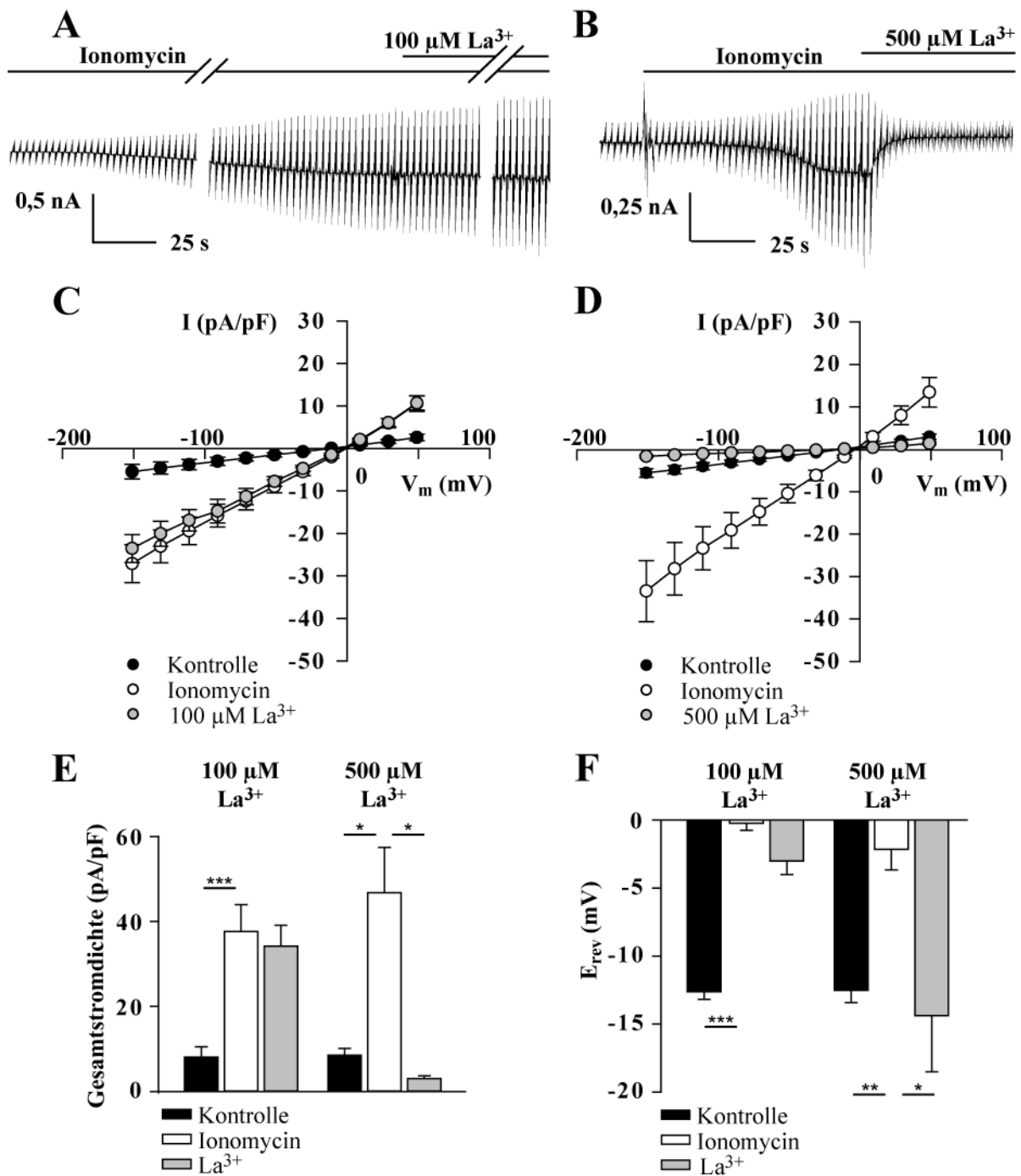


Abbildung 3.19: Blockade der Ionomycin-induzierten (1 μM) Leitfähigkeit durch 100 μM und 500 $\mu\text{M La}^{3+}$. A, B: Repräsentative Stromreaktionen von HLE B-3 Zellen stimuliert durch das Verlaufsspannungsprotokoll. Der Ionomycin-induzierte Strom zeigt kaum Reaktion auf 100 $\mu\text{M La}^{3+}$ (A; n=11), aber eine starke Reduktion durch 500 $\mu\text{M La}^{3+}$ (B; n=5). C, D: Strom-Spannungskennlinien vor Ionomycin-Zugabe, während des Steady State des Ionomycin-induzierten Effekts und nach Zugabe von 100 μM (C; n=11) bzw. 500 $\mu\text{M La}^{3+}$ (D; n=5). C, D: Balkendiagramme, die die Änderungen des Gesamtstroms (C) und des Umkehrpotentials (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe sowie nach La^{3+} -Applikation darstellen. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet (n=5-11; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Rutheniumrot

Wurden 20 μM Rutheniumrot zur Badlösung gegeben, sank zwar das Umkehrpotential signifikant von $-3,52 \pm 1,80 \text{ mV}$ auf $-6,22 \pm 2,47 \text{ mV}$ ($n=5$), jedoch wurde die Gesamtstromdichte nicht reduziert, sondern sogar leicht von $29,69 \pm 6,16 \text{ pA/pF}$ auf $33,62 \pm 6,67 \text{ pA/pF}$ ($n=5$) erhöht.

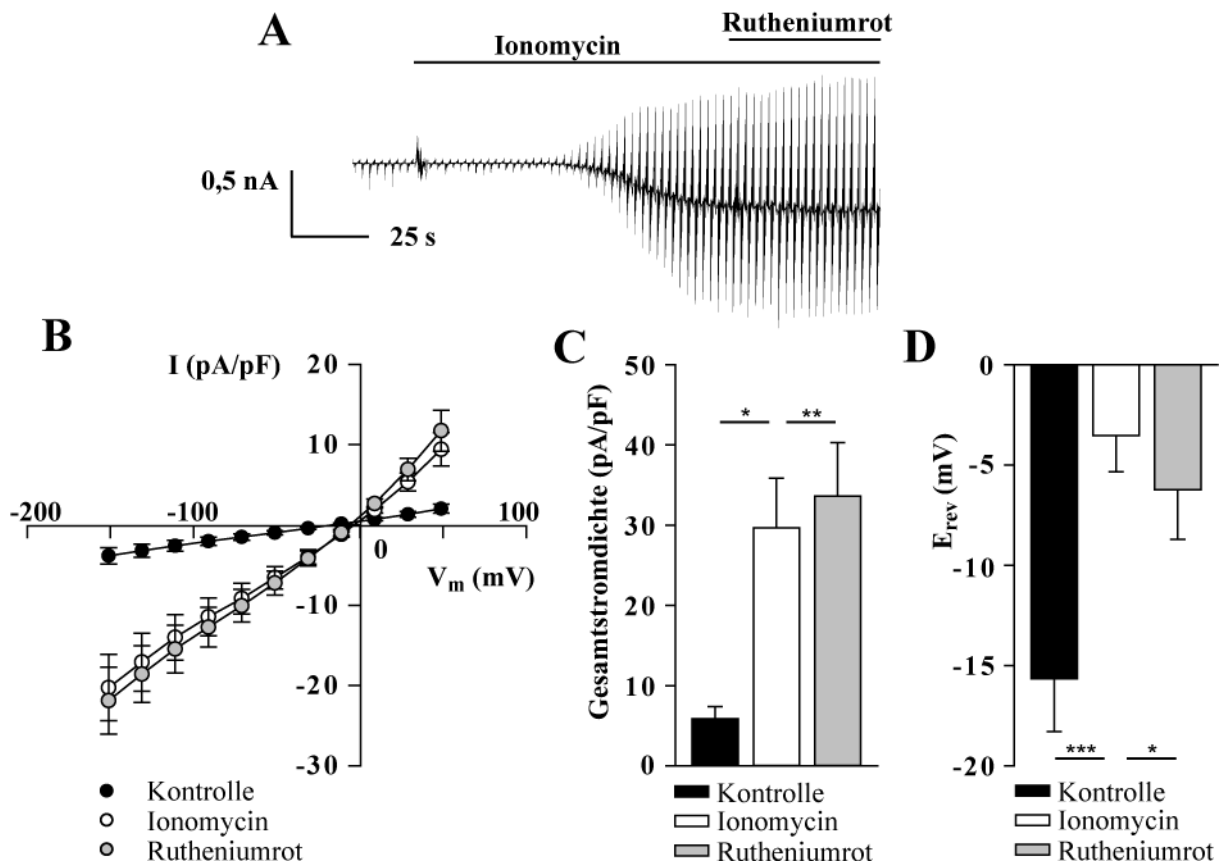


Abbildung 3.20: Ausbleibender Effekt von 20 μM Rutheniumrot auf Ionomycin-induzierte (1 μM) Leitfähigkeit. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf das Verlaufsspannungsprotokoll. 20 μM Rutheniumrot führen zu keiner sichtbaren Änderung der Stromantwort. B: Strom-Spannungskennlinien der Stromantworten vor und nach Ionomycin- und nach Rutheniumrot-Applikation. C, D: Balkendiagramme der Gesamtströme (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe sowie nach Rutheniumrot-Applikation. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet ($n=5$; Mittelwerte \pm SEM; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

DIDS

Auch die Zugabe von 100 μM DIDS zur Badlösung konnte den durch Ionomycin hervorgerufenen Strom nicht vermindern. Die Stromdichte stieg von $23,89 \pm 4,97 \text{ pA/pF}$ auf $58,12 \pm 8,05 \text{ pA/pF}$ ($n=6$). Der Anstieg der Stromdichte ging einher mit einer Verminderung des Umkehrpotentials von $-0,11 \pm 2,81 \text{ mV}$ auf $-4,19 \pm 3,48 \text{ mV}$ ($n=6$).

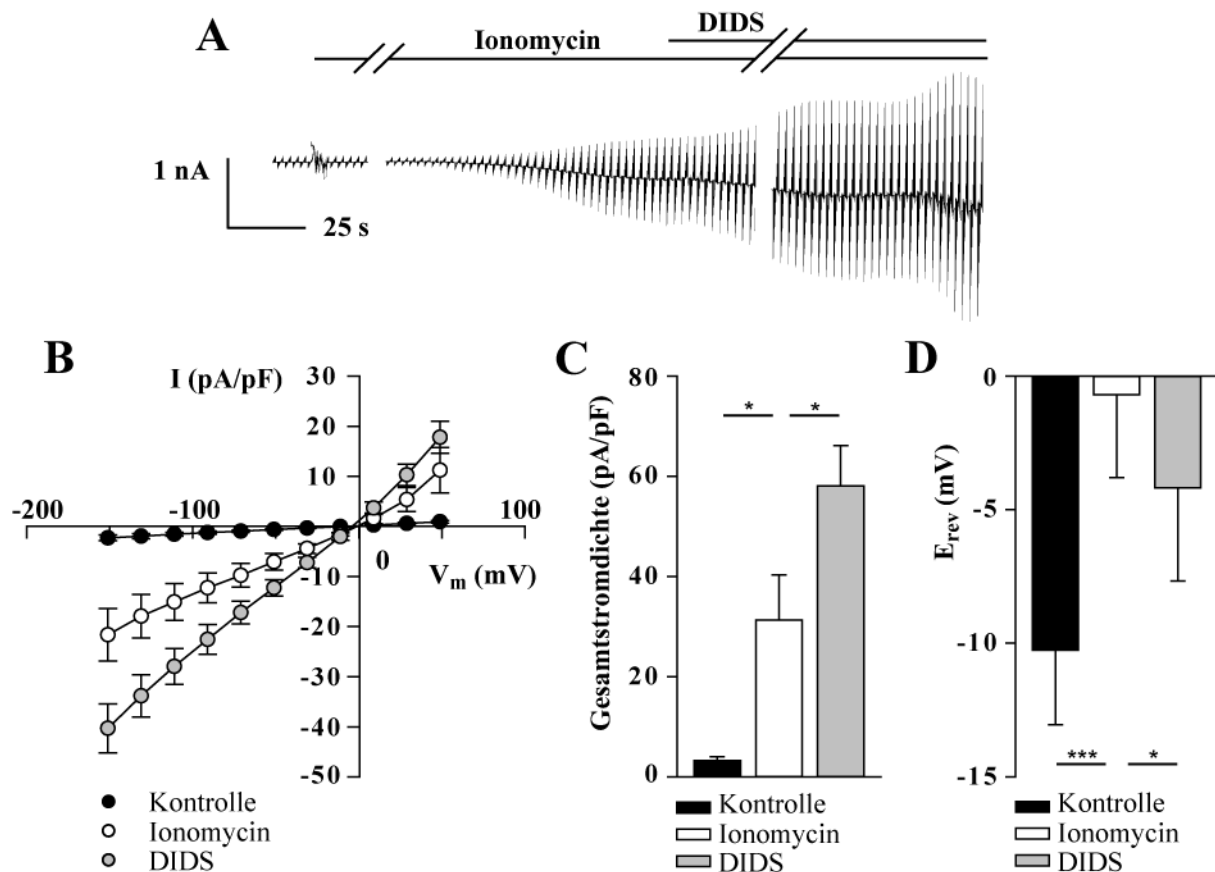


Abbildung 3.21: DIDS-bedingter (100 μ M) Stromanstieg nach Vorstimulation mit 1 μ M Ionomycin.

A: Beispielhafte Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf die elektrische Stimulation mit dem Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskurven zum Zeitpunkt der Kontrolle, des Steady States im Ionomycin-Effekt und nach DIDS-Applikation. C, D: Vergleich der Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe sowie nach Rutheniumrot-Applikation. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet (n=6; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, *** p < 0,001).

Amilorid

Die Zugabe von 500 μ M Amilorid inhibierte den größten Teil der durch Ionomycin hervorgerufenen Leitfähigkeit, wobei der Einwärtsstrom stärker inhibiert wurde als der Auswärtsstrom. Die Stromdichte sank von $50,20 \pm 14,23$ pA/pF auf $10,99 \pm 0,99$ pA/pF (n=7). Die Amilorid-bedingte Stromreduzierung besaß kaum Einfluss auf das Umkehrpotential, das sich von $-1,14 \pm 2,02$ mV auf $-3,51 \pm 1,36$ mV (n=7) nicht signifikant verringerte.

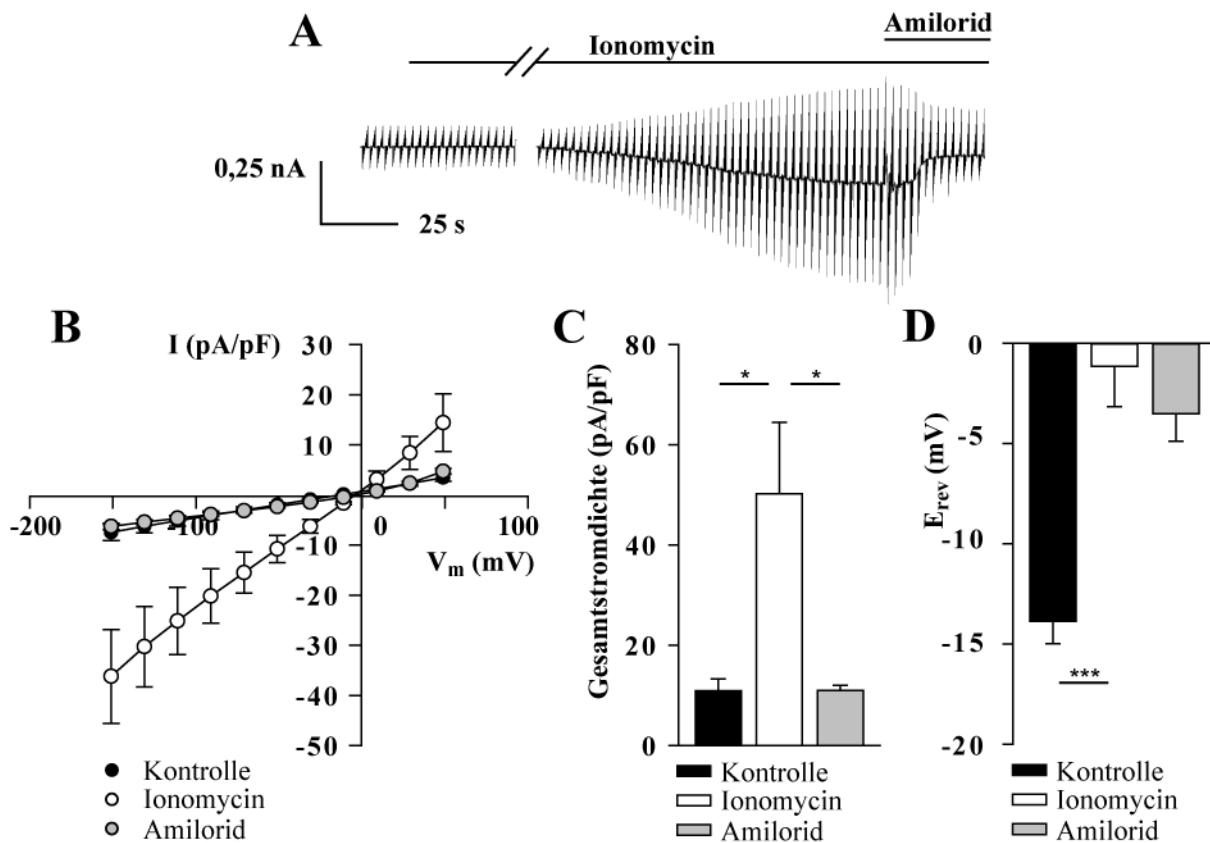


Abbildung 3.22: Rückgang des Ionomycin-induzierten (1 μ M) Stroms durch 500 μ M Amilorid A: Repräsentative Stromreaktion einer HLE B-3 Zelle auf das Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach Ionomycin- sowie nach Amilorid-Applikation. C, D: Balkendiagramme, die die Änderung der Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) basierend auf vor und nach Ionomycin- sowie nach Amilorid-Applikation vergleichen. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet ($n=7$; Mittelwert \pm SEM; $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

9-Phenanthrol

9-Phenanthrol wird in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um die Effekte verschiedener TRP-Kanäle voneinander abzugrenzen. TRPM4, aber nicht TRPC3, wird durch 30 μ M 9-Phenanthrol gehemmt, TRPM5 ist sogar insensitiv gegenüber 100 μ M 9-Phenanthrol (Grand *et al.*, 2008; Gonzales *et al.*, 2010). In beiden Konzentrationen eingesetzt konnte 9-Phenanthrol die Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit inhibieren. 30 μ M 9-Phenanthrol verringerten die Stromdichte von $39,90 \pm 9,96$ pA/pF auf $5,31 \pm 1,78$ pA/pF ($n=5$) und das Umkehrpotential von $-5,20 \pm 1,95$ mV auf $-13,52 \pm 1,69$ mV ($n=5$), womit sie annähernd den Kontrollwerten von jeweils $5,49 \pm 0,45$ pA/pF und $-13,66 \pm 0,67$ mV ($n=5$) entsprachen. 30 μ M 9-Phenanthrol bewirkten somit eine Reduzierung der Leitfähigkeit um $83,88 \pm 5,06$ % ($n=5$). Die Reduzierung durch 100 μ M 9-Phenanthrol war mit $82,64 \pm 3,35$ % ($n=5$) vergleichbar stark.

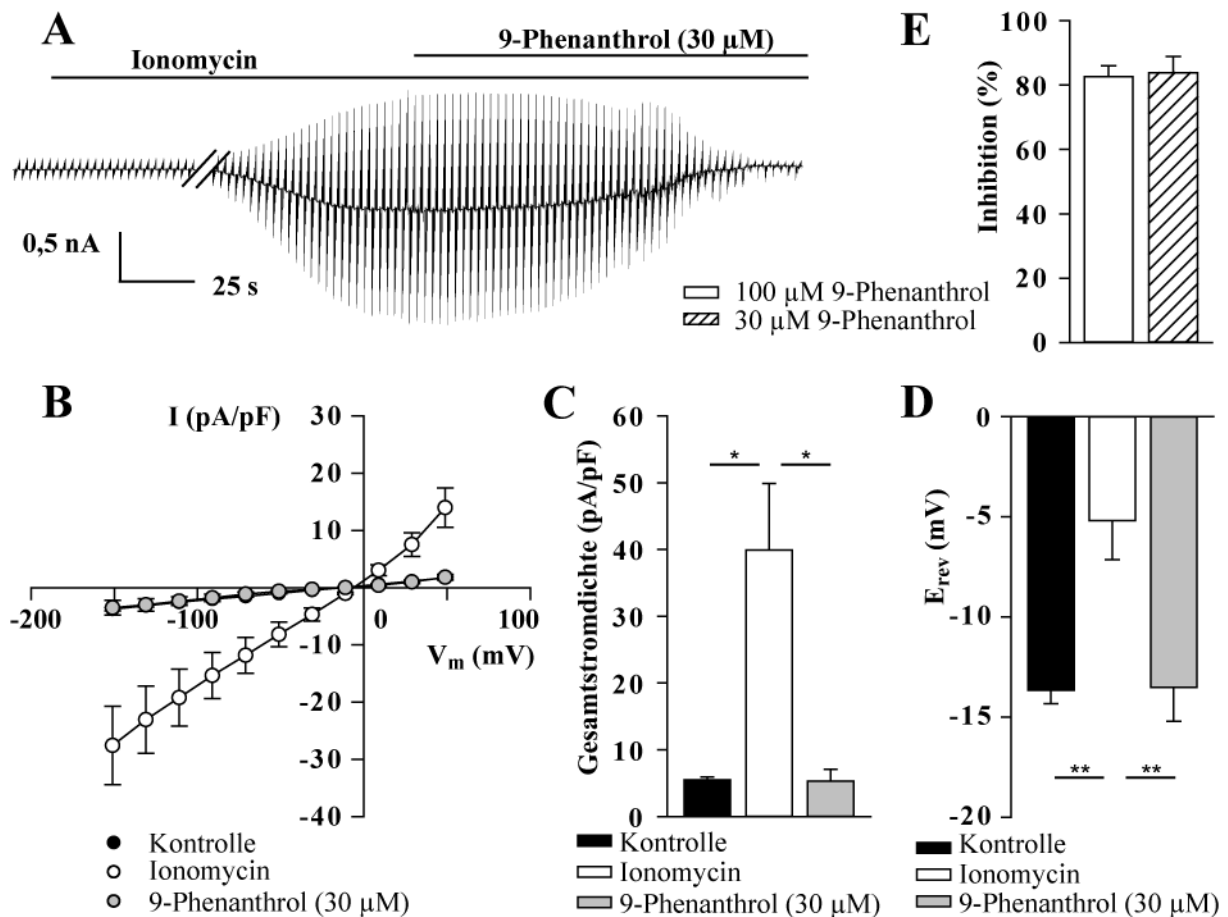


Abbildung 3.23: Reduzierung des Ionomycin-induzierten (1 μM) Stroms durch 30 und 100 μM 9-Phenanthrol. A: Repräsentative Stromantwort einer HLE B-3 Zelle auf das Verlaufsspannungsprotokoll. Die Zugabe von 30 μM 9-Phenanthrol inhibiert den durch Ionomycin hervorgerufenen Strom. B: Strom-Spannungskurven zu Beginn der Aufnahme, im Steady State nach Ionomycin-Applikation und nach Einsetzen des inhibierenden Effektes durch 30 μM 9-Phenanthrol. C, D: Balkendiagramme der Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin- sowie nach Applikation von 30 μM 9-Phenanthrol. E: Balkendiagramm, das die Intensität der blockierenden Effekte durch 30 μM und 100 μM 9-Phenanthrol vergleicht. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet (n=5; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01).

Spermin

Intrazellulär appliziert inhibiert Spermin eine Reihe von Ionenkanälen, zu denen auch TRPM4 und TRPM5 zählen. Trotz der Zugabe von 100 μM Spermin zur Pipettenlösung stiegen nach extrazellulärer Ionomycin-Applikation die Stromdichte von $3,12 \pm 0,68$ pA/pF auf $51,74 \pm 13,94$ pA/pF (n=5) sowie das Umkehrpotential von $-13,06 \pm 0,47$ mV auf $-0,98 \pm 2,25$ mV (n=5) von HLE B-3 Zellen. Dies demonstriert die Unempfindlichkeit des zugrundeliegenden Ionenkanals gegenüber Spermin.

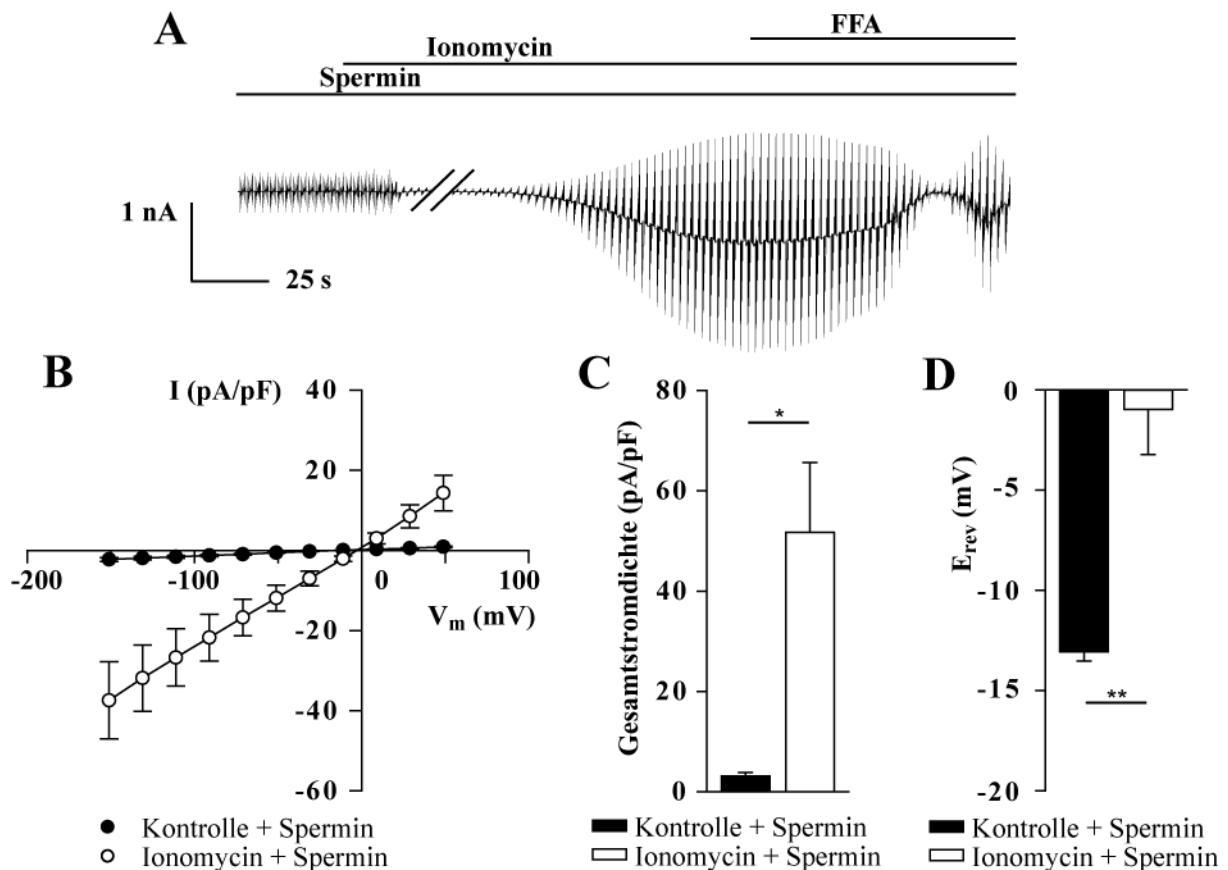


Abbildung 3.24: Ausbleibende inhibitorische Wirkung von intrazellulärem Spermin (100 μ M) auf Ionomycin-aktivierten (1 μ M) Kanal. A: Strom einer HLE B-3 Zelle als beispielhafte Reaktion auf das Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach Ionomycin-Applikation und nach FFA-Zugabe (100 μ M). FFA wurde hinzugegeben, um auszuschließen, dass die Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit auf einem Zellabsturz basiert. C, D: Vergleich der Gesamtstromdichte (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Applikation (n=5; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01).

Miconazol

Da für Miconazol bislang bezüglich der TRP-Kanäle lediglich eine inhibitorische Wirkung auf TRPM2 und TRPV4 gezeigt wurde, wurde dieser Modulator zur weiteren Charakterisierung des Ionomycin-induzierten Stroms genutzt. Obwohl die angestrebte Konzentration von 10 μ M aufgrund von Löslichkeitsproblemen in der Badlösung vermutlich nicht erreicht werden konnte, lag die Stromdichte nach Inhibierung von $20,56 \pm 2,65$ pA/pF auf $4,77 \pm 1,60$ pA/pF (n=5) sogar unter der Kontrollstromdichte von $5,01 \pm 2,01$ pA/pF (n=5). Das Umkehrpotential hingegen wurde signifikant von $-1,98 \pm 0,49$ mV auf $-8,68 \pm 0,66$ mV (n=5) verringert. Es lag damit aber noch deutlich unter dem Umkehrpotential der Kontrollströme von $-13,86 \pm 1,11$ mV (n=5).

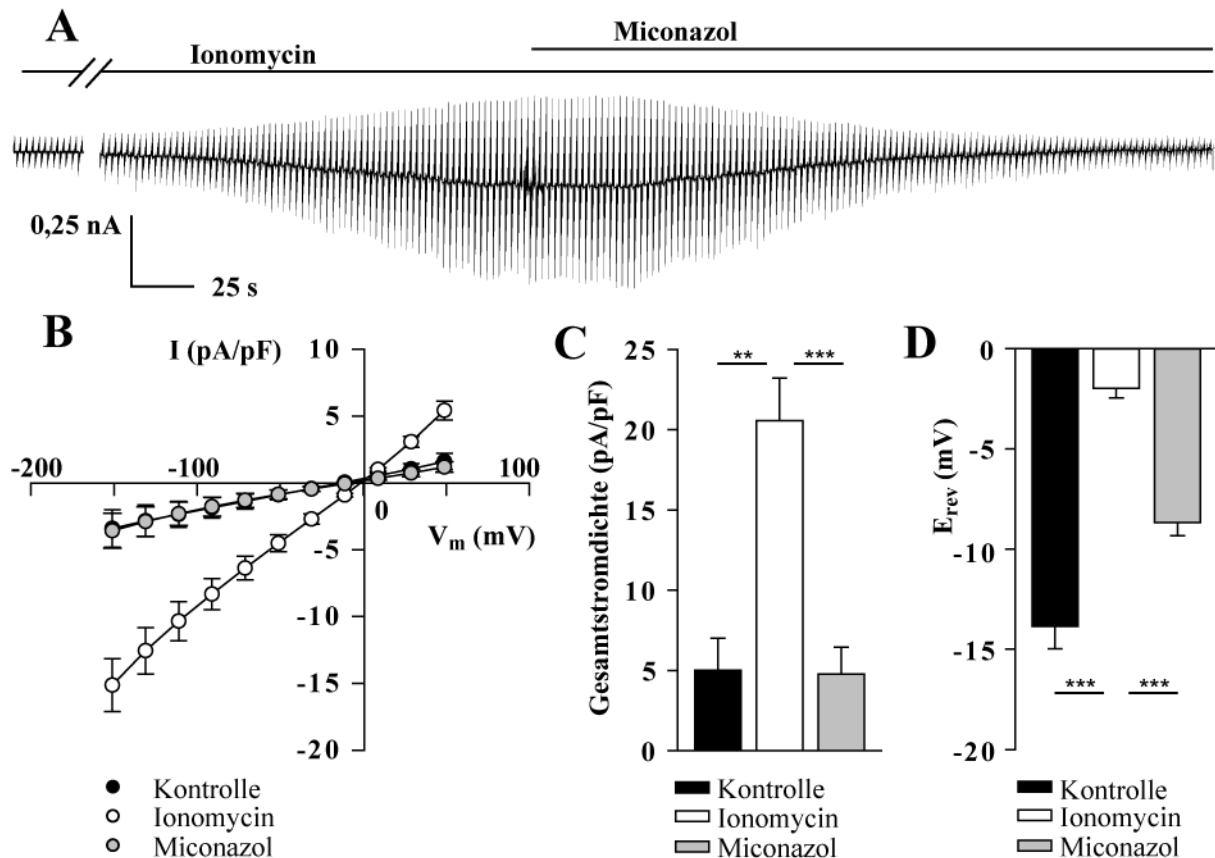


Abbildung 3.25: Reduzierung des Ionomycin-bedingten Stroms in HLE B-3 Zellen durch 10 μ M Miconazol. A: Beispielhafte Stromantwort einer Zelle auf das Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien der initialen Stromantwort, während des Steady State nach Ionomycin-Zugabe und bei maximaler Blockade durch Miconazol. C, D: Balkendiagramme, welche die Änderungen der Gesamtstromdichten (C) und Umkehrpotentiale (D) vor und nach Ionomycin-Zugabe sowie nach Miconazol-Applikation wiedergeben. Signifikanz der Abweichungen gegenüber Ionomycin (weißer Balken) wurde bewertet (n=5; Mittelwerte \pm SEM; ** p < 0,01, *** p < 0,001).

3.2.6 H₂O₂-induzierte Leitfähigkeit in humanen Linseneithelzellen unter K⁺-freien Bedingungen

Die pharmakologische Untersuchung deutete darauf hin, dass es sich bei dem untersuchten Ionenkanal um TRPM2 oder PKD1/TRPP1 handelte. Zur weiteren Spezifizierung wurde der Effekt von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Form von H₂O₂ auf die Leitfähigkeit der in der Ganzzell-Konfiguration befindlichen Linseneithelzellen untersucht. H₂O₂ aktiviert TRPM2, nicht jedoch PKD1/TRPP1 (Wehage *et al.*, 2002; Montalbetti *et al.*, 2008). Unter denselben Lösungsbedingungen, die für die pharmakologische Untersuchung genutzt wurden, wurde der Badlösung in einem zeitlichen Abstand von fünf Minuten zweimal 10 mM H₂O₂ zugeführt. 10 bis 25 Minuten nach der ersten Applikation stieg die Leitfähigkeit sowohl der primären Linseneithelzellen als auch der HLE B-3 Zellen an. Diese Leitfähigkeit, die ein lineares Verhältnis von Strom zu Spannung aufwies, wurde vollständig durch Zugabe von 100 μ M FFA inhibiert.

In den primären Linseneithelzellen stieg die Stromdichte nach H_2O_2 -Applikation von initial $1,98 \pm 0,09$ pA/pF auf $17,63 \pm 15,73$ pA/pF ($n=3$) und das Umkehrpotential von $-18,27 \pm 1,05$ mV auf $-1,21 \pm 0,65$ mV ($n=3$) an. Die Zugabe von FFA reduzierte die Stromdichte auf $2,04 \pm 0,23$ pA/pF ($n=3$) und das Umkehrpotential auf $-21,23 \pm 2,50$ mV ($n=3$).

Auch in den HLE B-3 Zellen stiegen die Stromdichte und das Umkehrpotential H_2O_2 -bedingt von $3,51 \pm 0,45$ pA/pF auf $18,49 \pm 3,72$ pA/pF ($n=5$) beziehungsweise von $-15,84 \pm 2,60$ mV auf $-0,07 \pm 0,75$ mV ($n=5$). FFA reduzierte beides auf $2,48 \pm 0,27$ pA/pF ($n=5$) beziehungsweise $-15,18 \pm 3,55$ mV ($n=5$).

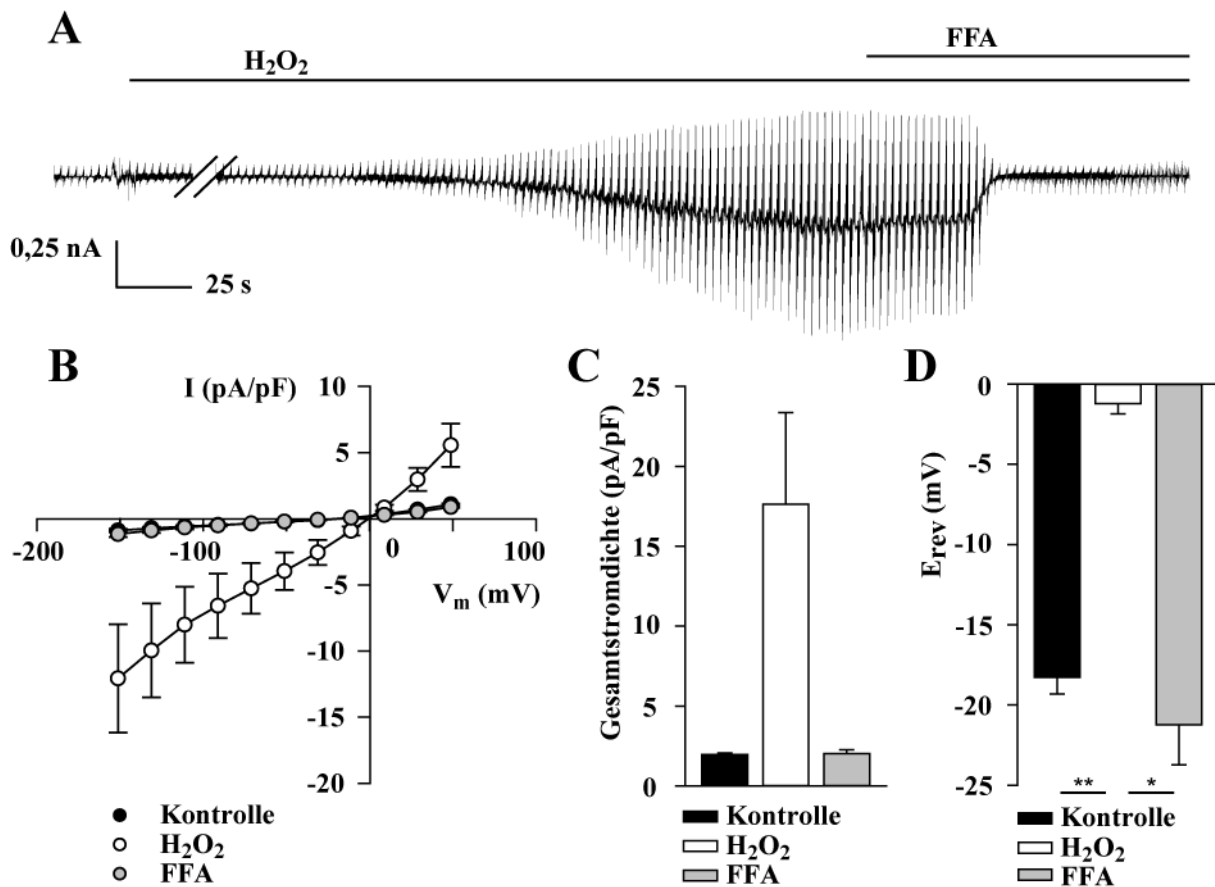


Abbildung 3.26: H_2O_2 -aktivierte Ionenströme in primären Linseneithelzellen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären Linseneithelzelle auf Verlaufsspannungsprotokoll. Zweimalige Applikation von 10 mM H_2O_2 induzieren mit einer Latenzzeit von mehreren Minuten eine Ionenleitfähigkeit, welche durch Zugabe von 100 μM FFA inhibiert wird. B: Strom-Spannungskurven vor und nach H_2O_2 -bedingtem Effekt und nach FFA-Zugabe. C, D: Balkendiagramme der Gesamtstromdichten (C) oder Umkehrpotentiale (D) in B. Signifikanz der Abweichungen gegenüber H_2O_2 (weißer Balken) wurde bewertet ($n=3$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

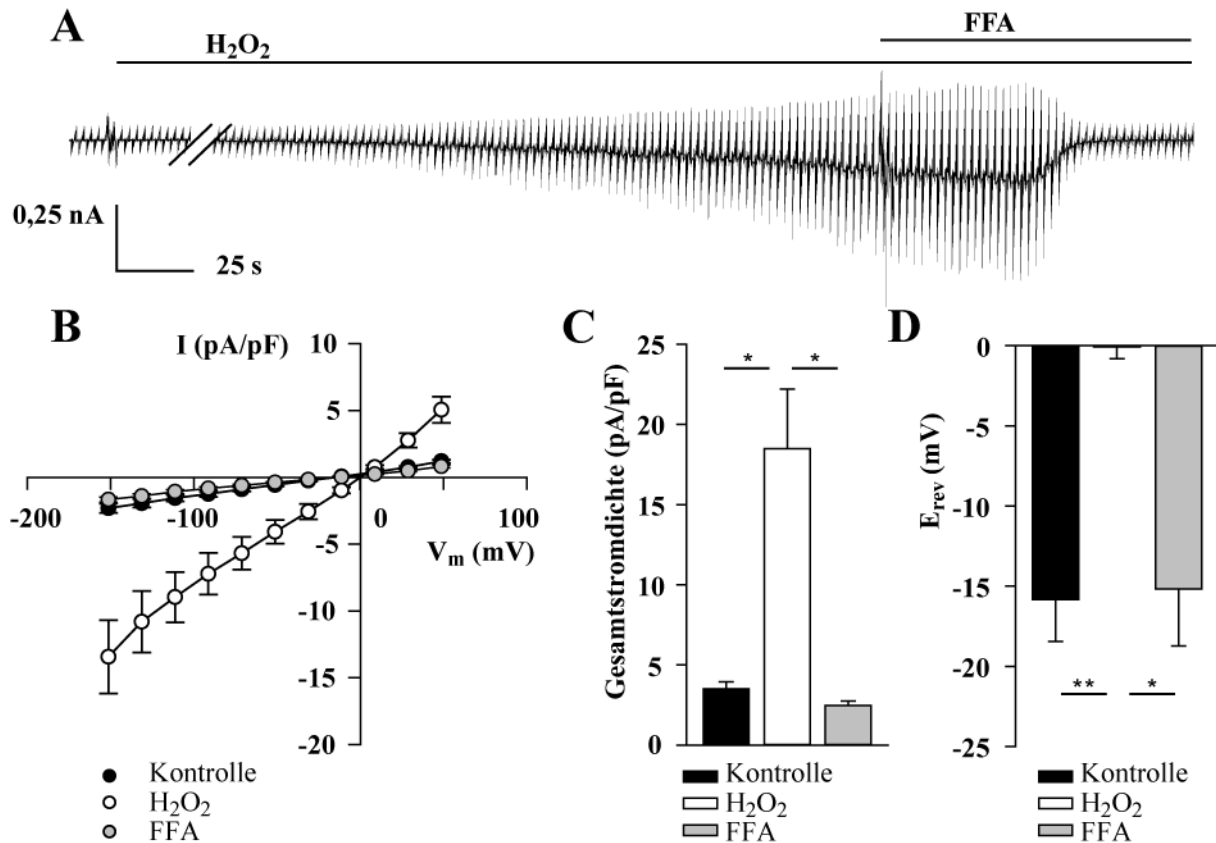


Abbildung 3.27: H₂O₂-aktivierte Ionenströme in HLE B-3 Zellen. A: Beispielhafte Stromreaktion einer HLE B-3 Zelle auf Verlaufsspannungsprotokoll. Stromanstieg als Reaktion auf zweimalige Zugabe von 10 mM H₂O₂ und anschließende Blockade durch FFA. B: Strom-Spannungskennlinien zu Beginn, nach H₂O₂-induziertem Effekt und nach Blockade durch FFA. C, D: Balkendiagramme, welche die Gesamtstromdichten (C) oder Umkehrpotentiale (D) in B wiedergeben. Signifikanz der Abweichungen gegenüber H₂O₂ (weißer Balken) wurde bewertet (n=5; Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01).

3.2.7 Proteinexpression und Lokalisation von TRPM2 in Linseneithelzellen

Die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften ließen darauf schließen, dass es sich bei dem analysierten Ionenkanal um TRPM2 handelte. Um zu überprüfen, ob TRPM2 auch auf Proteinebene in Linseneithelzellen exprimiert wird, wurden eine Western Blot-Analyse sowie immunzytochemische Färbungen der Zellen durchgeführt.

Als Positivkontrolle und zur Testung der Spezifität des anti-TRPM2-Antikörpers wurde das Lysat einer murinen Milz verwendet. Es wurde eine Bande auf Höhe von etwa 170 kDa detektiert, was die charakteristische Größe der langen TRPM2-Isoform (TRPM2-L) ist und die Eignung des verwendeten Antikörpers zeigt. HLE B-3 Zellen und primäre Linseneithelzellen wiesen ebenfalls eine Bande auf Höhe von 170 kDa auf und exprimieren dementsprechend die ungekürzte TRPM2-Isoform. Es wurden weitere Proteinbanden im Bereich von 90 bis 250 kDa detektiert. Die stärkste Bande besaß eine Größe von etwa 95 kDa, was der Größe der kurzen Isoform TRPM2-S entspricht.

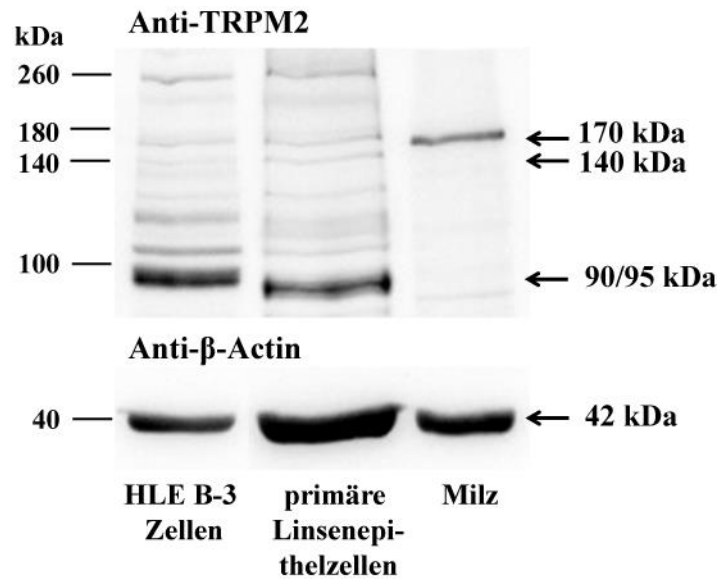


Abbildung 3.28: Western Blot-Analyse der TRPM2-Expression in Linsenepithelzellen. Lysate von HLE B-3 Zellen und primären Linsenepithelzellen zeigen verschiedene Glykosylierungsprodukte und Isoformen von TRPM2. Das Lysat einer murinen Milz diente als Positivkontrolle. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Nach der immunzytochemischen Färbung von HLE B-3 Zellen wurde in diesen ein TRPM2-spezifisches Signal detektiert. TRPM2 war in der Zellmembran sowie in intrazellulären Kompartimenten zu finden. Die HLE B-3 Zellen wurden zusätzlich mit dem Zellmembranmarker Pan-Cadherin angefärbt. Dieser ergab vor allem in der Membranregion zwischen benachbarten Zellen ein starkes Signal. Es überlagerte sich mitunter mit dem TRPM2-spezifischen Signal. Eine Negativkontrolle (Abbildung 3.30) zeigte, dass keine unspezifische Bindung der Antikörper stattfand. Es fand weder eine Bindung der sekundären Antikörper in Abwesenheit der primären Antikörper, noch eine Bindung der sekundären Antikörper untereinander statt. Es wurden demnach verschiedene TRPM2-Isoformen in Linsenepithelzellen exprimiert, die in der Zellmembran sowie in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert waren.

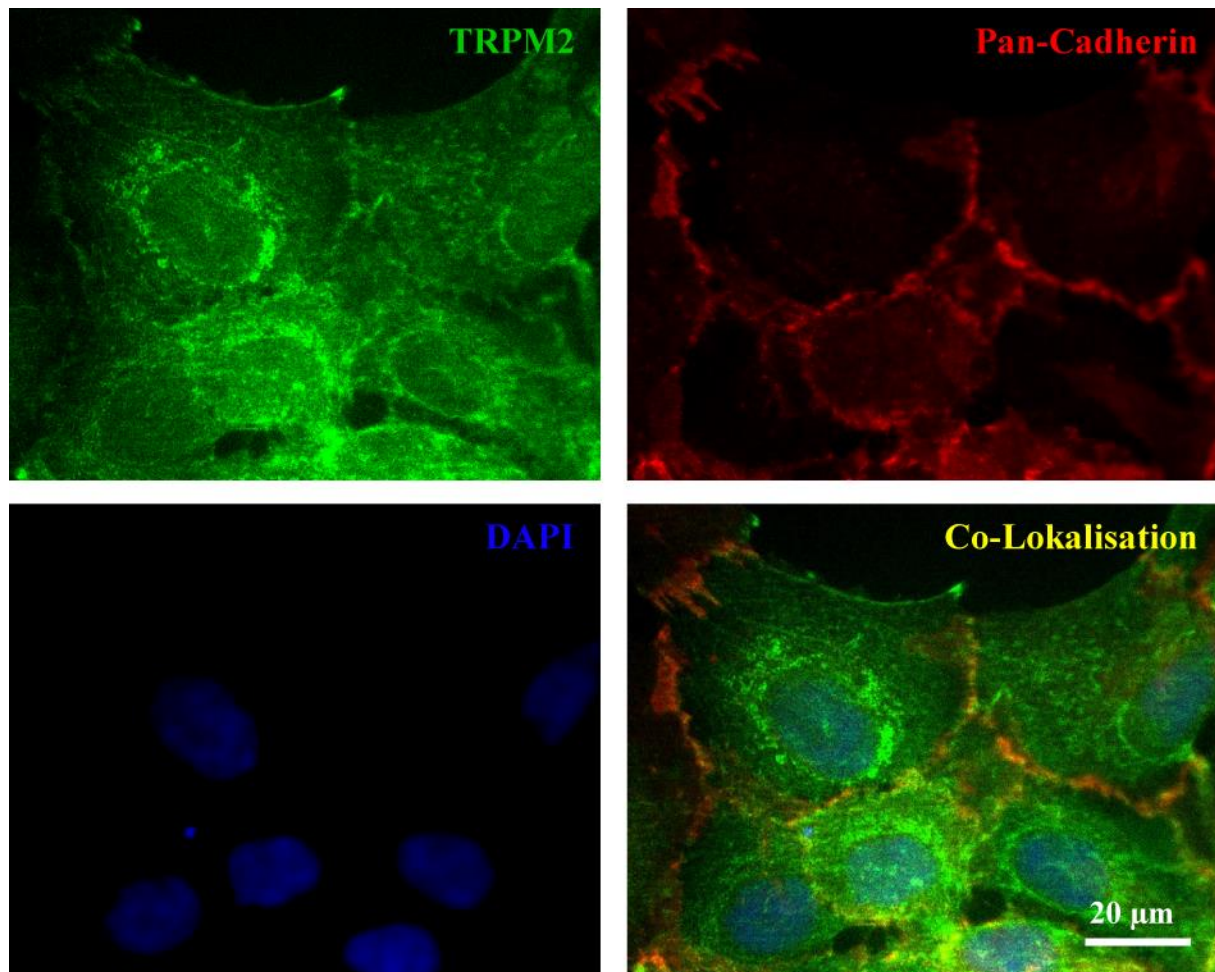


Abbildung 3.29: Lokalisation von TRPM2 in HLE B-3 Zellen mittels immunzytochemischer Untersuchung. Expression von TRPM2 (grüne Färbung) und Pan-Cadherin (rote Färbung). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaue Färbung) gefärbt.

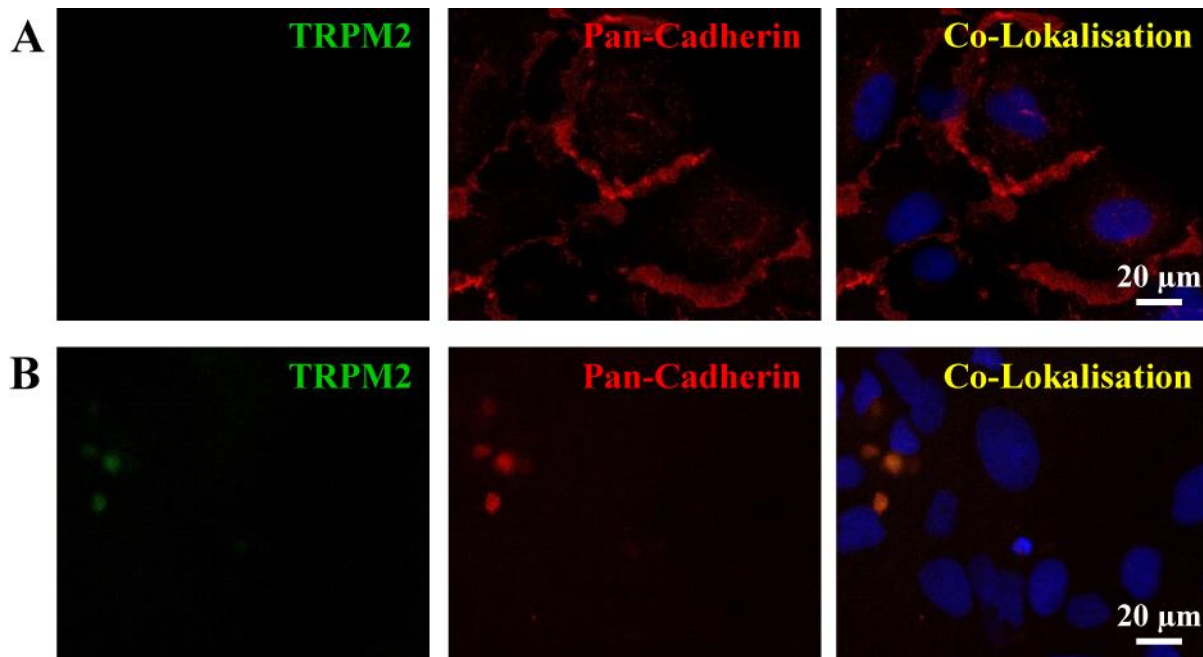


Abbildung 3.30: Kontrolle der spezifischen Bindung des sekundären Antikörpers. Färbung von HLE B-3 Zellen mit den sekundären Antikörpern aus Abbildung 3.29. A: Nach vorheriger Inkubation mit anti-Pan-Cadherin (rote Färbung), aber ohne anti-TRPM2. B: Ohne vorherige Inkubation mit einem primären Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaue Färbung) gefärbt.

3.2.8 Einfluss von TGF β 2 auf TRPM2 in HLE B-3 Zellen

Nachdem bereits eine Veränderung der Ionomycin-bedingten K⁺-Leitfähigkeit von HLE B-3 Zellen aufgrund einer Vorbehandlung mit TGF β 2 gezeigt wurde, wurde nun analog auf einen möglichen Effekt auf das elektrophysiologische Verhalten ohne Beeinflussung durch K⁺-Ströme geprüft. Unbehandelte sowie 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF β 2 vorbehandelte HLE B-3 Zellen wurden in K⁺-freien Lösungen mit intra- zu extrazellulär asymmetrischen Cl⁻-Konzentrationen elektrophysiologisch untersucht.

Auch unter diesen Bedingungen konnte Ionomycin in unbehandelten sowie TGF β 2-behandelten Zellen eine Erhöhung der Leitfähigkeit sowie eine Membrandepolarisation hervorrufen. In den unbehandelten Zellen wies diese eine Gesamtstromdichte von $41,01 \pm 6,55$ pA/pF (n=10) und ein Umkehrpotential von $-4,05 \pm 3,80$ mV (n=10) auf. Zusätzlich wurde bei 4 von 10 Zellen ein transienter Stromanstieg beobachtet, der die durchschnittliche Gesamtstromdichte auf $45,70 \pm 6,31$ pA/pF (n=10) erhöhte. Da dieser mit einer leichten Erniedrigung des Umkehrpotentials einherging, wird die zusätzliche Aktivierung eines Cl⁻-Kanals vermutet. Für den Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten HLE B-3 Zellen wurde jedoch der nicht transiente Strom genutzt.

In Zellen, die zuvor TGF β 2 ausgesetzt waren, besaß der Ionomycin-induzierte Strom eine Gesamtstromdichte von $62,63 \pm 10,42$ pA/pF (n=9) und war somit deutlich, jedoch nicht

signifikant ($p = 0,052$) gegenüber dem der unbehandelten Zellen erhöht. Auch das Umkehrpotential war mit $-0,95 \pm 1,01$ mV ($n=9$) etwas positiver als das der unbehandelten Zellen.

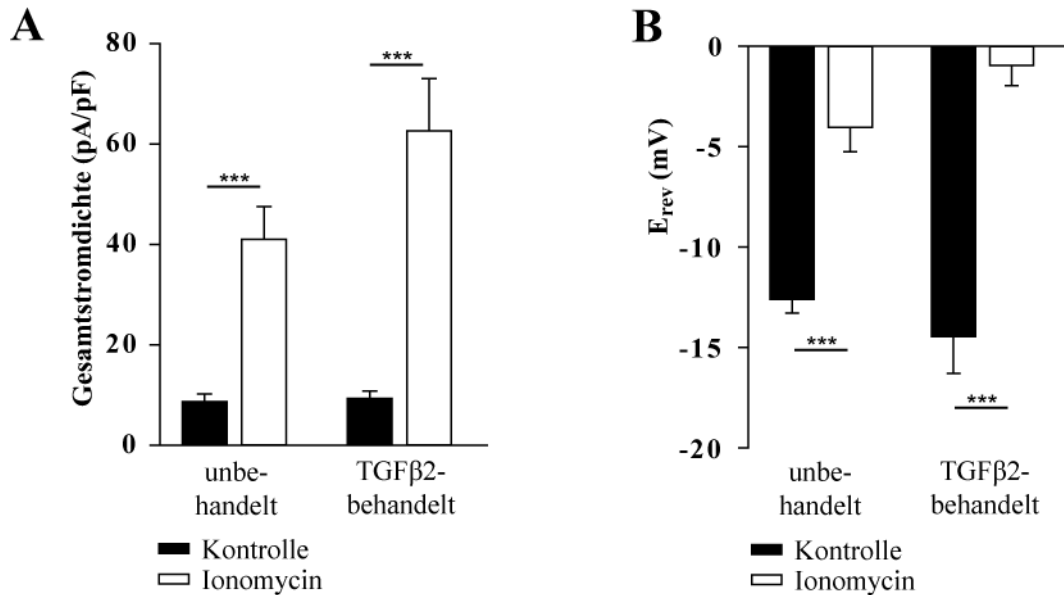


Abbildung 3.31: Effekt von TGFβ2 auf die Gesamtstromdichte der HLE B-3 Zellen. Balkendiagramm, welches die Gesamtstromdichten (A) und Umkehrpotentiale (B) des Kontrollstroms und des Ionomycin-induzierten Stroms von unbehandelten ($n=10$) und TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen ($n=9$) unter K^+ -freien Bedingungen vergleicht ($n=9-10$; Mittelwerte \pm SEM; *** $p < 0,001$).

Zuletzt wurde untersucht, ob die Vorbehandlung mit TGFβ2 die mRNA-Expression von TRPM2 in HLE B-3 Zellen beeinflusst. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse durch eine gleichzeitige Beeinflussung des Kalibrators GAPDH auszuschließen, wurde auch die Genexpression von TRPC3 quantifiziert.

Die Expression der TRPC3-mRNA war in TGFβ2-vorbehandelten Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen kaum verändert. Der normalisierte $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Wert betrug 1,06. Die mRNA von TRPM2 hingegen war in TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen 4,18-fach hochreguliert gegenüber den unbehandelten Zellen.

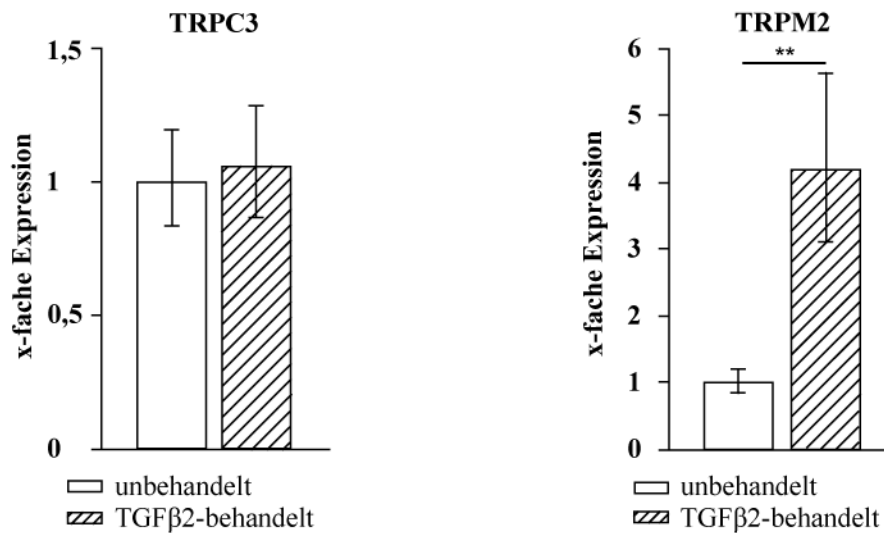


Abbildung 3.32: Hochregulierung der mRNA von TRPM2, jedoch nicht von TRPC3 in HLE B-3 Zellen nach Exposition gegenüber TGFβ2. Ermittelt wurde die Hochregulierung mittels qPCR und der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode (n=4, Mittelwerte ± SEM; ** p < 0,01).

3.3 Untersuchung eines CaCCs in RPE-Zellen

3.3.1 Effekt von ATP auf freies zytosolisches Ca^{2+} und Ca^{2+} -abhängige Leitfähigkeiten

Der zweite Teil der Arbeit galt der Untersuchung der Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanäle des retinalen Pigmentepithels. Fokussiert wurde auf Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle (CaCC). Um Cl^- -Ströme von K^+ -Strömen gleicher Charakteristik zu isolieren, wurden alle Versuche unter K^+ -freien Bedingungen durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösungen mit physiologischen extrazellulär hohen und intrazellulär niedrigen Cl^- -Konzentrationen nach Fox *et al.* (1988) verwendet (Kapitel 2.2.4). In ARPE-19 Zellen wurde die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch extrazellulär appliziertes ATP als physiologischen Stimulus getestet. Die in der Ganzzellkonfiguration befindlichen ARPE-19 Zellen wurden mit ATP stimuliert und die Stromantworten auf das Verlaufsspannungsprotokoll, in explizit benannten Einzelfällen auch mit dem E9R50-Protokoll, gemessen. Die Cl^- -Bedingungen der Bad- und Pipettenlösung wurden variiert, um über die Umkehrpotentiale auf die Art der fließenden Ionen schließen zu können.

Zunächst wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen ATP auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen in der Ganzzellkonfiguration untersucht, um die minimal benötigte Konzentration für folgende Experimente zu ermitteln. Es wurden 10, 100, 500 und 1000 μM ATP verwendet und die Amplituden der maximalen Auswärtsstromdichten verglichen. Diese betrug vor Zugabe von ATP $2,02 \pm 0,18$ pA/pF (n=28), nach Applikation von 10 μM ATP $2,05 \pm 0,56$ pA/pF (n=5). 100 μM ATP bewirkten eine geringfügig höhere

Auswärtsstromdichte von $2,71 \pm 0,45$ pA/pF ($n=7$). 500 μ M ATP führten zu einer deutlich höheren Auswärtsstromdichte von $5,64 \pm 0,97$ pA/pF ($n=9$), die sich durch Verdoppelung der ATP-Konzentration auf 1 mM mit $6,08 \pm 0,94$ pA/pF ($n=7$) nur wenig steigern ließ. Es wurden deshalb 500 μ M ATP für die weiteren Versuche verwendet, da es die geringste Konzentration war, die effektiv wirkte.

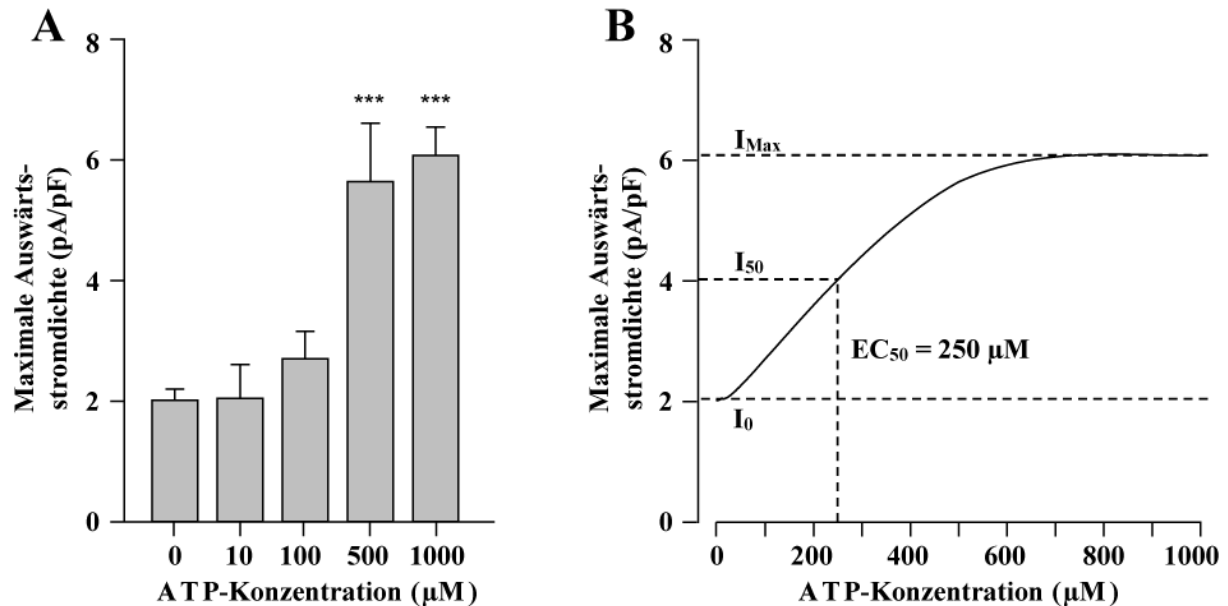


Abbildung 3.33: Effekt verschiedener Konzentrationen ATP auf die maximale Auswärtsstromdichte von ARPE-19 Zellen unter asymmetrischen Cl⁻-Bedingungen. A: Maximale Auswärtsstromdichte vor ($n=28$) und nach Zugabe von 10 μ M ($n=5$), 100 μ M ($n=7$), 500 μ M ($n=9$) und 1 mM ATP ($n=7$). Signifikanzen sind bezugnehmend auf die Standardbedingungen (schwarzer Balken) dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; *** $p < 0,001$). B: Konzentrations-Wirkungs-Kurve gewonnen aus den Daten aus A. EC_{50} = mittlere effektive Konzentration; I_0 = Stromdichte der Kontrollzellen; I_{Max} = Stromdichte bei maximalem Effekt.

Anschließend wurde der Effekt von ATP auf das freie zytosolische Ca^{2+} in ARPE-19 Zellen untersucht. Die Zugabe von 500 μ M ATP zur Badlösung führte zu einer schnellen Erhöhung von freiem zytosolischem Ca^{2+} , gemessen als Anstieg des Quotienten der Fura-2-Fluoreszenz bei den Extinktionswellenlängen 340 nm und 380 nm. Die Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{2+} war transient. Innerhalb von 5 Minuten nach ATP-Zugabe sank die Konzentration an freiem intrazellulären Ca^{2+} annähernd auf seine Ausgangswerte.

Im Anschluss wurde die ATP-induzierte Stromantwort unter Anwendung eines Verlaufsspannungsprotokolls näher charakterisiert. In der Ganzzellkonfiguration befindliche ARPE-19 Zellen reagierten auf die Zugabe von 500 μ M ATP mit einem transienten Anstieg der Leitfähigkeit, der mit dem von Ca^{2+} vergleichbar war. Die Stromantwort setzte sich aus zwei Phasen zusammen. Zunächst kam es zu einem schnellen Anstieg einer leicht einwärtsrektifizierenden Leitfähigkeit, welche mit einer Depolarisation der Zellen einherging.

Die Amplitude der Einwärtsstromdichte stieg hierbei von $-2,11 \pm 0,19$ pA/pF (n=43) auf $-2,55 \pm 0,20$ pA/pF (n=43), die der Auswärtsstromdichte von $2,14 \pm 0,18$ pA/pF (n=43) auf $4,06 \pm 0,46$ pA/pF (n=43). Diese erste Phase kann als Anstieg einer Kationenleitfähigkeit interpretiert werden und wird weiter so bezeichnet. Zeitgleich wurde ein Auswärtsstrom induziert, der sein Maximum meist zeitversetzt zu dem des Kationenstroms erreichte. Die Amplitude der Einwärtsstromdichte sank währenddessen auf $-1,92 \pm 0,18$ pA/pF (n=43), die der Auswärtsstromdichte stieg weiter auf $6,12 \pm 0,53$ pA/pF (n=43). Diese zweite Phase kann am wahrscheinlichsten als Anstieg der Anionenleitfähigkeit gedeutet werden und wird weiter so bezeichnet. Dieser Strom war durch eine langsame Aktivierungskinetik sowie eine deutliche Auswärtsrektifizierung charakterisiert. Das Umkehrpotential, das vor ATP-Zugabe $-13,19 \pm 0,60$ mV (n=43) betrug, stieg während der ersten Phase (Kationenleitfähigkeit) der Stromreaktion auf $-6,36 \pm 0,91$ mV (n=43). Während der zweiten Phase (Anionenleitfähigkeit) sank es auf $-10,52 \pm 0,62$ mV (n=43).

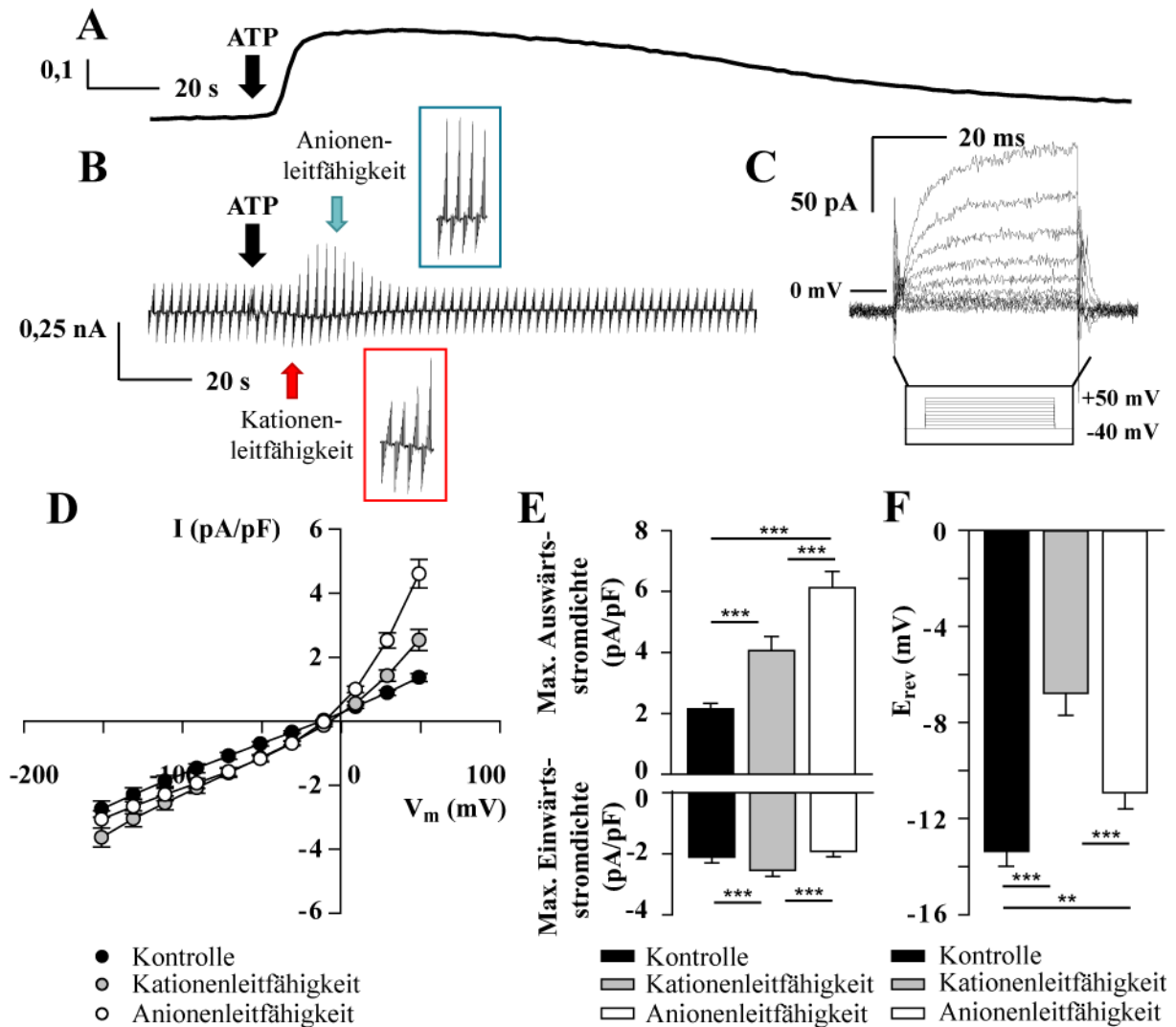


Abbildung 3.34: Effekt von 500 μM ATP auf freies zytosolisches Ca^{2+} und die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Kurve der Veränderung des freien zytosolischen Ca^{2+} durch ATP-Applikation. Dargestellt ist der Quotient der Fluoreszenzen bei den Exzitationswellenlängen 340 und 380 nm ($n=20$; Mittelwerte). B: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. C: Repräsentative Stromantwort einer Zelle auf ein E9R50-Spannungsprotokoll 20 s nach ATP-Applikation. D: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe während der Kationen- und Anionenleitfähigkeit. E, F: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (E) sowie die Umkehrpotentiale (F) vor und nach ATP-Zugabe vergleichen ($n=43$; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ein Anheben der intrazellulären Cl^- -Konzentration veränderte die zweiphasige Charakteristik der Stromantwort auf das Verlaufsspannungsprotokoll nach ATP-Zugabe nicht. Zeitverzögert zu einer Leitfähigkeit mit maximaler Einwärtsstromdichte wurde eine stark auswärtsrektifizierende Leitfähigkeit mit maximaler Auswärtsstromdichte induziert. Die Amplitude der Einwärtsstromdichte stieg von $-1,83 \pm 0,30$ pA/pF ($n=5$) auf $-1,85 \pm 0,33$ pA/pF ($n=5$), sank dann auf $-1,01 \pm 0,30$ pA/pF ($n=5$). Die Auswärtsstromdichte stieg zunächst von $1,54 \pm 0,26$ pA/pF ($n=5$) auf $3,94 \pm 0,60$ pA/pF ($n=5$) und schließlich auf $7,62 \pm$

1,45 pA/pF (n=5) während der zweiten Phase. Das Umkehrpotential stieg von $-8,54 \pm 1,00$ mV (n=5) vor ATP-Zugabe auf $-0,80 \pm 0,68$ mV (n=5) während der ersten Phase (Kationenleitfähigkeit) der Stromantwort nach ATP-Applikation. Während der zweiten Phase (Anionenleitfähigkeit) der Stromantwort blieb das Umkehrpotential mit $-0,72 \pm 0,51$ mV (n=5) nahezu unverändert.

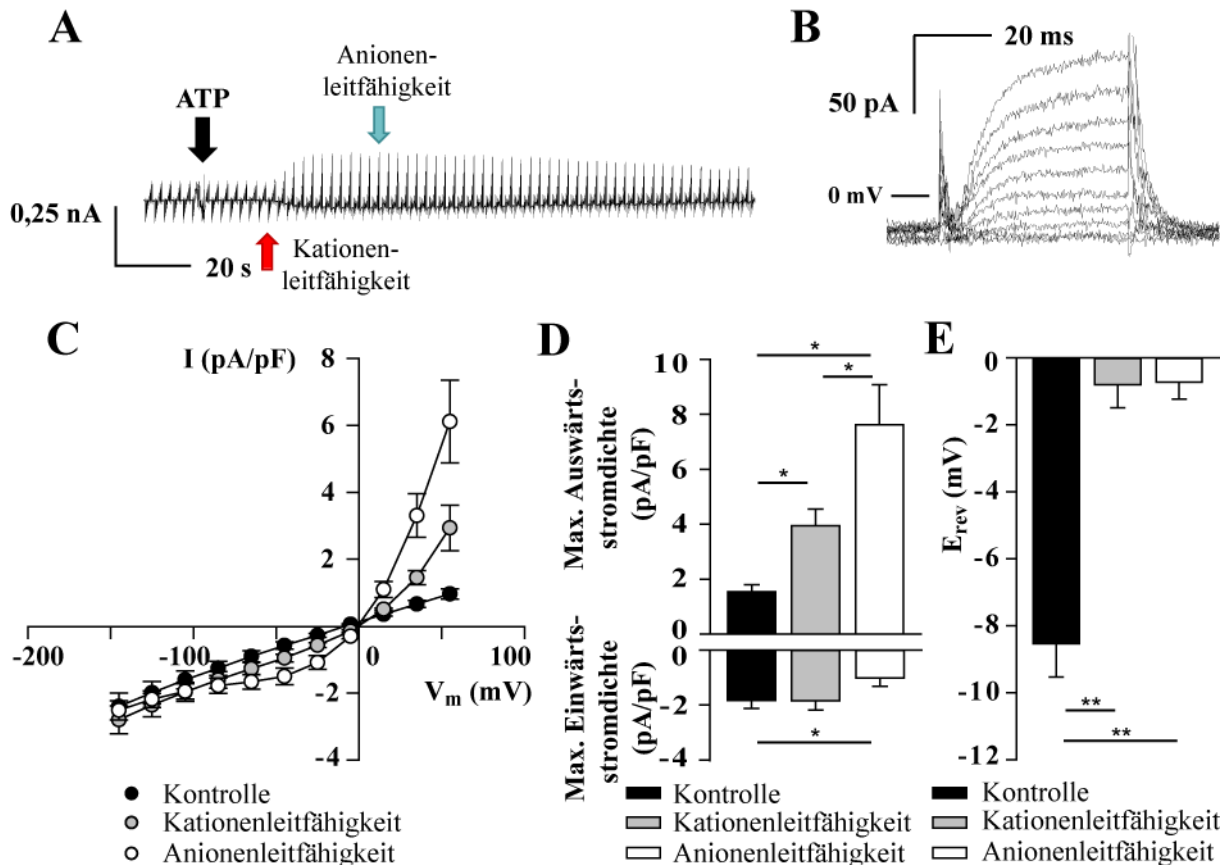


Abbildung 3.35: Effekt von 500 μ M ATP auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen hoher Konzentration. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Repräsentative Stromantwort einer Zelle auf ein E9R50-Spannungsprotokoll 20 s nach ATP-Applikation. C: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe während der Kationen- und Anionenleitfähigkeit. D, E: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (D) sowie die Umkehrpotentiale (E) vor und nach ATP-Zugabe vergleichen (n=5; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Wurde die Cl^- -Konzentration sowohl intra- als auch extrazellulär auf 30 mM abgesenkt, führte die Applikation von ATP zur Aktivierung eines leicht einwärtsrektifizierenden Stroms. Ein auswärtsrektifizierender Strom wurde nicht aktiviert. Das Umkehrpotential veränderte sich bei einem Anstieg von $-8,78 \pm 0,44$ mV auf $-3,96 \pm 2,70$ mV (n=7) nicht signifikant ($p > 0,05$).

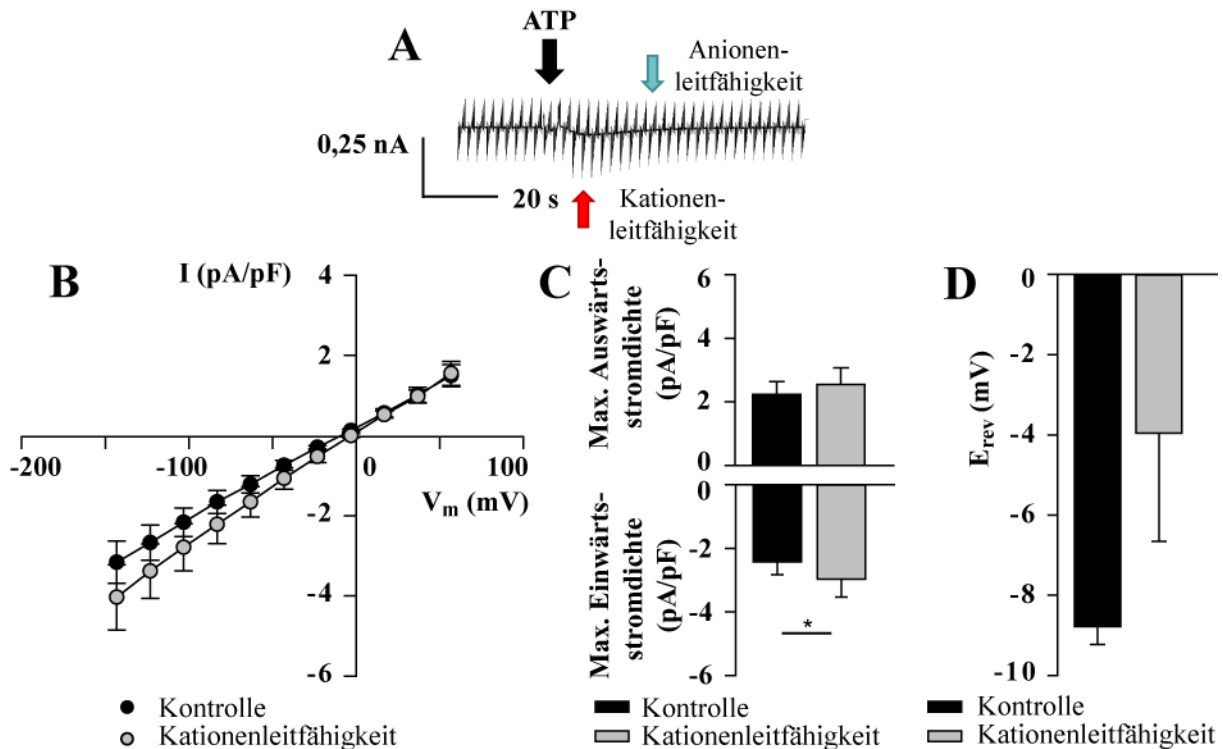


Abbildung 3.36: Effekt von 500 μM ATP auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen unter symmetrischen Cl^- -Bedingungen (30 mM). A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach ATP-Zugabe vergleichen ($n=7$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

3.3.2 Reaktion der ATP-induzierten Leitfähigkeiten auf Cl^- -Kanalinhibitoren

Die Verschiebung der Umkehrpotentiale nach Veränderung der Cl^- -Bedingungen sowie das Ausbleiben eines auswärtsrektifizierenden Stroms nach Absenken der extrazellulären Cl^- -Konzentration lassen darauf schließen, dass 500 μM ATP einen CaCC aktivieren. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde die Wirkung der Cl^- -Kanalinhibitoren NFA, DIDS, $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ und $\text{T16A}_{\text{inh}}\text{-A01}$ untersucht. Falsch positive Ergebnisse wurden ausgeschlossen, indem die Transienz und Wiederholbarkeit des ATP-Effektes genutzt und dieselben Zellen zweimal mit ATP stimuliert wurden. Zuerst wurde ATP in Abwesenheit eines Blockers appliziert. Nachdem der Effekt abgeklungen war, wurde ATP erneut in Ab- oder Anwesenheit eines Blockers appliziert. Die Effekte der ersten und zweiten ATP-Zugabe wurden miteinander verglichen. Da die Anionenleitfähigkeit von Interesse war, wurden neben den Umkehrpotentialen lediglich die Auswärtsstromdichten analysiert. Es wurden stets asymmetrische Cl^- -Bedingungen, K^+ -freie Lösungen (Kapitel 2.2.4) und das Standardverlaufsprotokoll verwendet.

Eine zweite Zugabe von ATP in Abwesenheit eines Blockers führte wie auch die erste Applikation zur Induzierung einer Anionenleitfähigkeit. Deren Auswärtsstromdichte betrug

mit $4,74 \pm 1,37$ pA/pF ($n=7$) 71 % der Auswärtsstromdichte nach erstmaliger ATP-Applikation von $6,72 \pm 1,46$ pA/pF ($n=7$). Die Umkehrpotentiale der Anionenleitfähigkeiten unterschieden sich nach beiden Applikationen nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

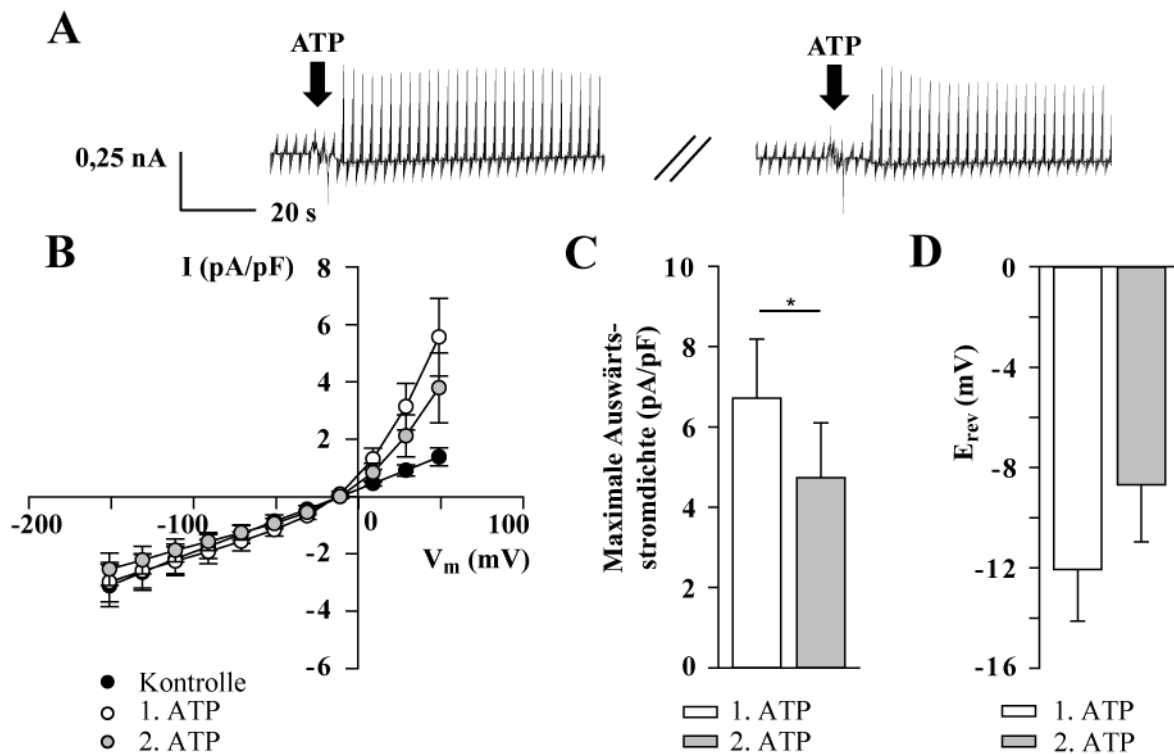


Abbildung 3.37: Effekt einer zweimaligen Applikation von 500 μ M ATP auf die Anionenleitfähigkeit von ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor erster ATP-Zugabe und nach erster und zweiter ATP-Zugabe. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen ($n=7$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

In Anwesenheit des nicht-spezifischen Cl⁻-Kanalinhibitors Nifluminsäure (NFA) induzierte ATP eine einwärtsrektifizierende Leitfähigkeit, die mit einer Depolarisation der Zellmembran einherging. Die Auswärtsstromdichte betrug nach erstmaliger ATP-Zugabe $5,99 \pm 1,32$ pA/pF ($n=4$), in Anwesenheit von NFA $3,64 \pm 0,60$ pA/pF ($n=4$). Die Anwesenheit von NFA bewirkte eine positive Verschiebung des Umkehrpotentials von $-9,83 \pm 1,69$ mV ($n=4$) zu $24,95 \pm 3,40$ mV ($n=4$).

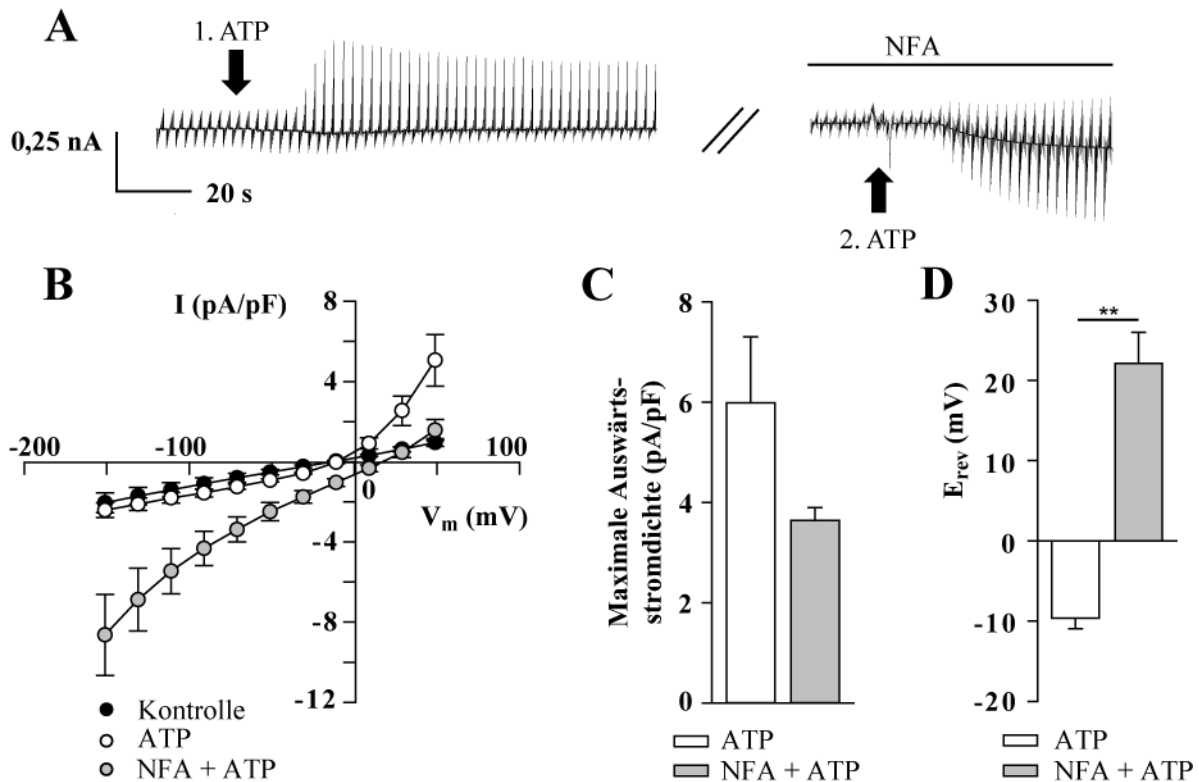


Abbildung 3.38: Effekt von 100 µM NFA auf die ATP-induzierte (500 µM) Anionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach Zugabe von ATP in Anwesenheit von NFA. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Auswärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen (n=4; Mittelwerte ± SEM; ** p < 0,01).

Erfolgte die zweite Zugabe von ATP in Anwesenheit von 100 µM extrazellulärem DIDS, das extrazellulär appliziert den Einstrom von Cl⁻-Ionen durch Cl⁻-Kanäle inhibiert, wurde ein leicht einwärtsrektifizierender Strom induziert. Die Aktivierung einer auswärtsrektifizierenden Leitfähigkeit blieb aus. Die Auswärtsstromdichte nach Zugabe von ATP und DIDS war mit $2,95 \pm 0,70$ pA/pF (n=8) deutlich gegenüber der Auswärtsstromdichte nach erstmaliger ATP-Applikation von $9,46 \pm 1,74$ pA/pF (n=8) reduziert. Die Anwesenheit von DIDS erhöhte das Umkehrpotential nicht signifikant (p = 0,051) von $-9,87 \pm 3,01$ mV (n=8) auf $-5,91 \pm 2,39$ mV (n=8).

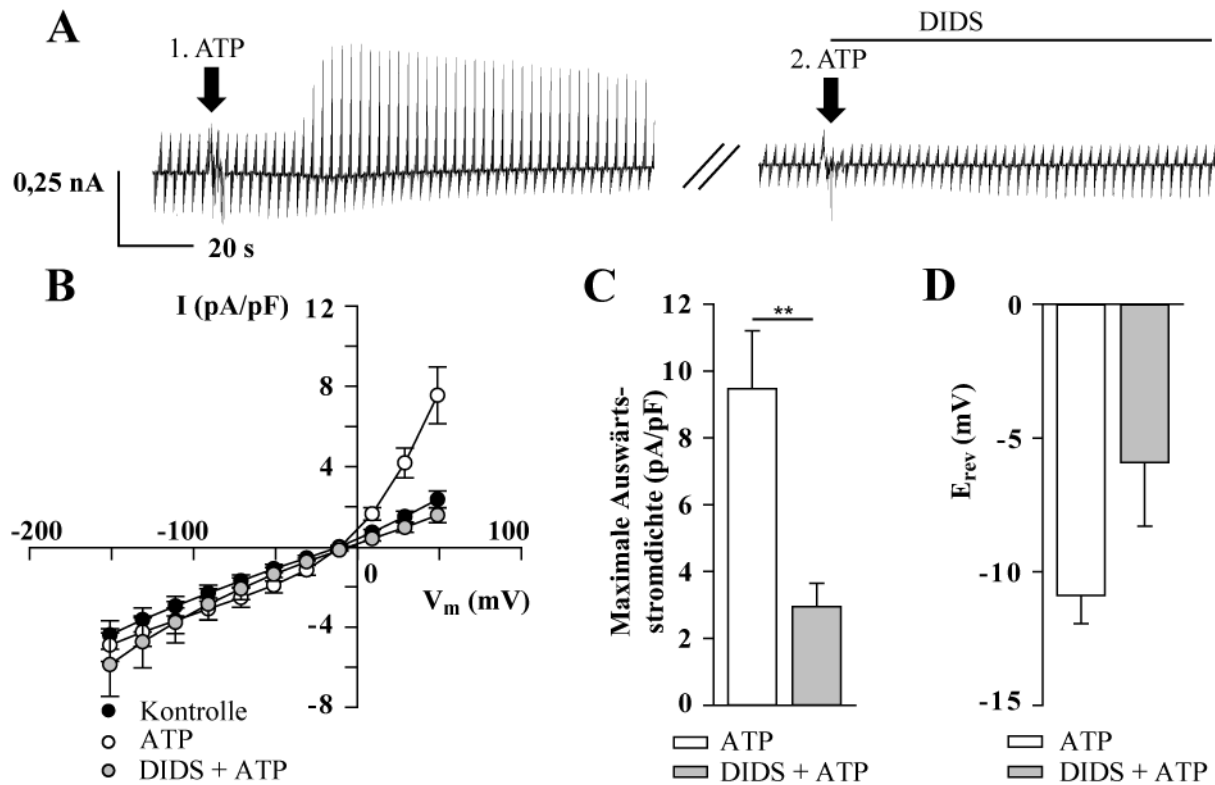


Abbildung 3.39: Effekt von 100 μ M DIDS auf die ATP-induzierte (500 μ M) Anionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach Zugabe von ATP in Anwesenheit von DIDS. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Auswärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen (n=8; Mittelwerte \pm SEM; ** p < 0,01).

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit CaCC_{inh}-A01 erzielt. CaCC_{inh}-A01 ist ein selektiver Inhibitor von CaCCs. Aufgrund abweichender IC₅₀-Werte wird es entweder in Konzentrationen von 10 μ M oder 30 μ M eingesetzt. In beiden Konzentrationen führte es zu einer starken Reduktion des ATP-induzierten Auswärtsstroms in den ARPE-19 Zellen. Das Umkehrpotential war in Anwesenheit des Inhibitors signifikant gegenüber dem nach alleiniger ATP-Zugabe erhöht. 10 μ M bewirkten eine Verschiebung von $-11,93 \pm 1,64$ mV auf $-4,05 \pm 0,86$ mV (n=8), 30 μ M sogar von $-9,35 \pm 2,01$ mV auf $4,74 \pm 3,46$ mV (n=6).

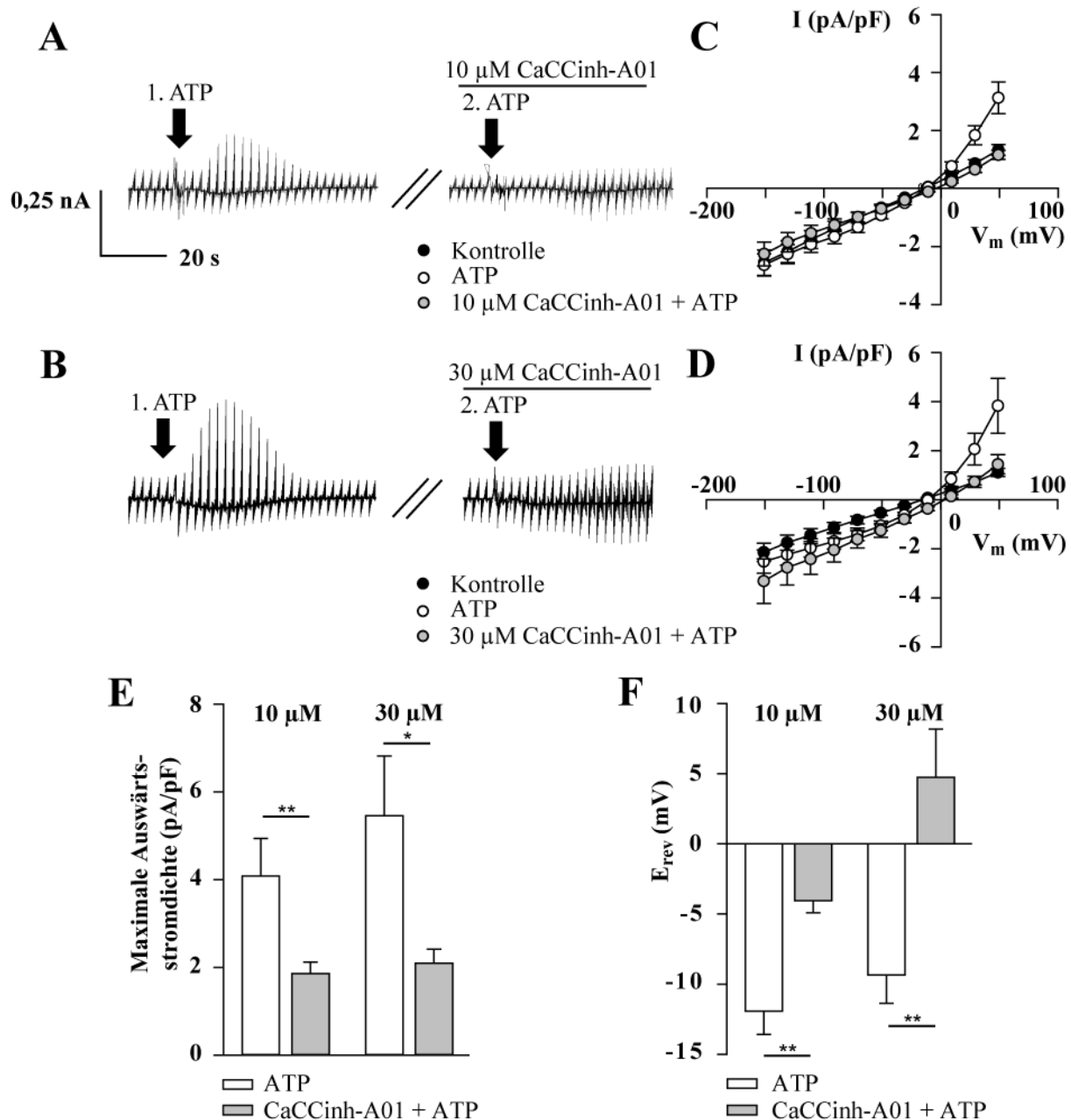


Abbildung 3.40: Effekt von 10 μM und 30 μM CaCC_{inh}-A01 auf die ATP-induzierte (500 μM) Anionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen. A, B: Repräsentative Stromantworten von ARPE-19 Zellen auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. C, D: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach Zugabe von ATP in Anwesenheit von 10 μM (C; n=8; Mittelwerte ± SEM) und 30 μM CaCCinh-A01 (D; n=6; Mittelwerte ± SEM). E, F: Balkendiagramme, welche die maximalen Auswärtsstromdichten (E) sowie die Umkehrpotentiale (F) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen (n=6-8; Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01).

10 μM des Anol1-spezifischen Inhibitors T16A_{inh}-A01 reduzierten die ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit nicht, sondern verstärkten sie leicht, jedoch signifikant. Die Auswärtsstromdichte war in Anwesenheit des Blockers mit $6,94 \pm 1,18$ pA/pF (n=7) signifikant (p < 0,05) gegenüber der Auswärtsstromdichte von $5,27 \pm 0,96$ pA/pF (n=7) nach

erstmaliger, alleiniger ATP-Applikation erhöht. Das Umkehrpotential stieg nicht signifikant ($p > 0,05$) von $-10,48 \pm 1,75$ mV auf $-12,78 \pm 1,75$ mV ($n=7$).

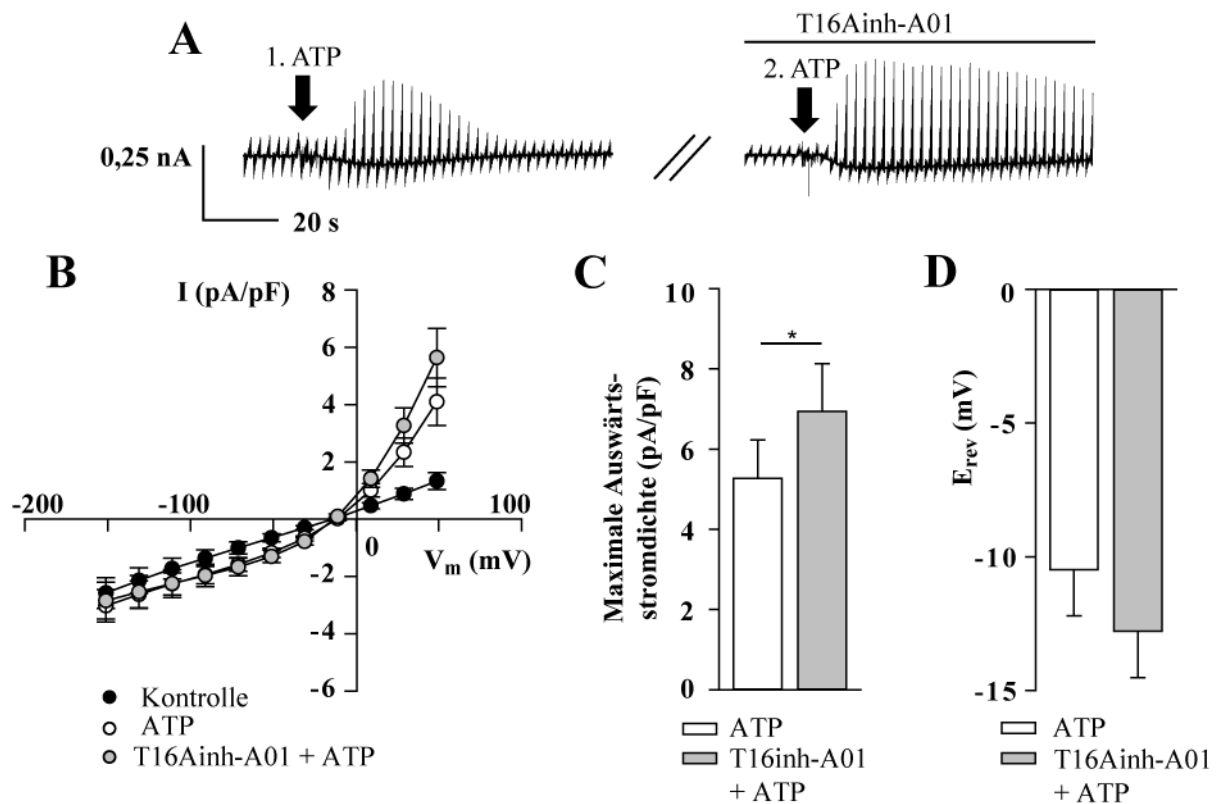


Abbildung 3.41: Effekt von $10 \mu\text{M}$ T16A_{inh}-A01 auf die ATP-induzierte ($500 \mu\text{M}$) Anionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach Zugabe von ATP in Anwesenheit von T16A_{inh}-A01. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Auswärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen ($n=7$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

3.3.3 Genexpression von Ano2 im RPE

Die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des auswärtsrektifizierenden Stroms indizieren die funktionelle Expression eines CaCC, der Ano2 ähnelt. In RT-PCR-Versuchen wurde getestet, ob Ano2 im RPE der Maus, Ratte, Primaten und in ARPE-19 Zellen exprimiert wird. Als Positivkontrolle diente die cDNA muriner Retina, in welcher die Ano2-Expression bereits nachgewiesen wurde (Stöhr *et al.*, 2009). Im RPE aller untersuchten Spezies wurde mRNA von Ano2 detektiert. ARPE-19 Zellen wurden zusätzlich auf die Expression eines weiteren CaCC, Ano1, untersucht. Es wurde keine Ano1-mRNA detektiert.

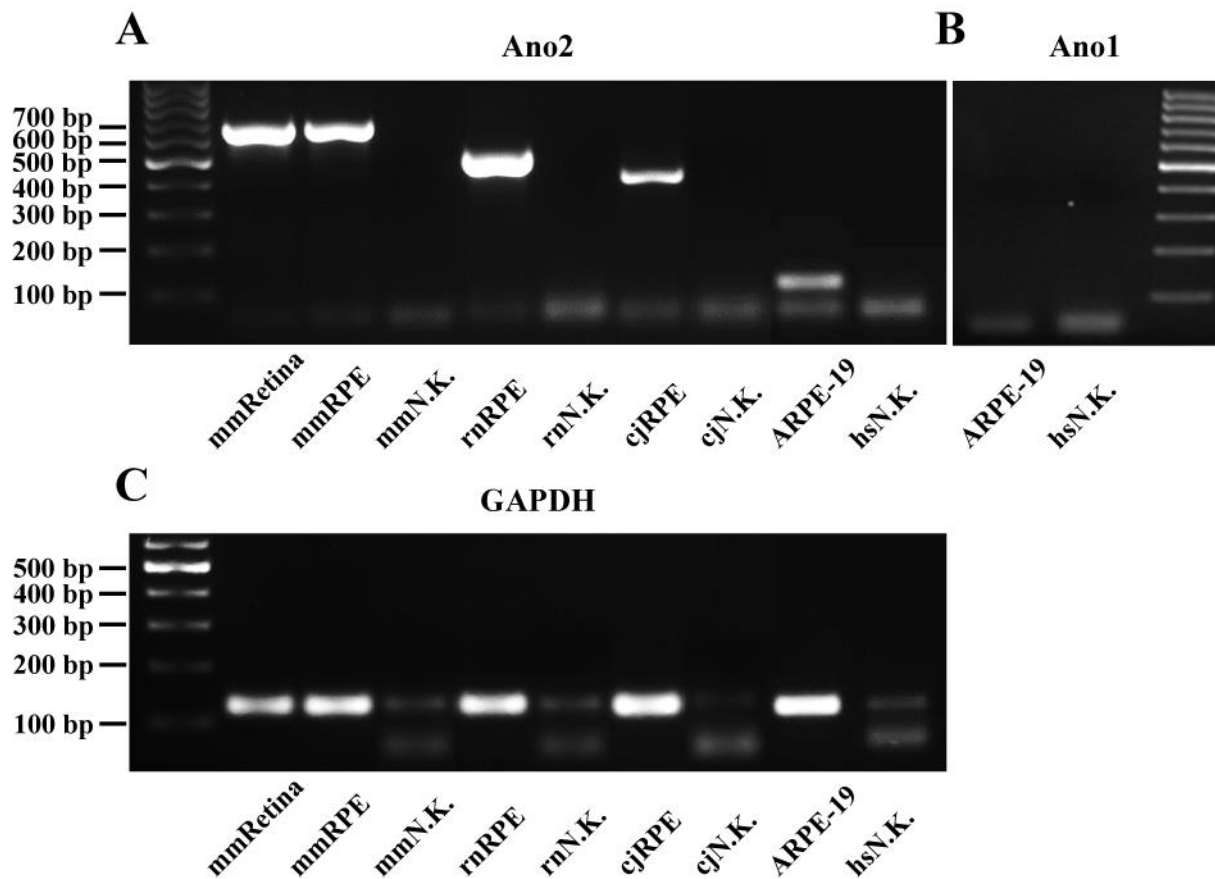


Abbildung 3.42: Genexpression von Ano2 im RPE verschiedener Spezies. A: Ano2-mRNA wird exprimiert in Mausretina und im RPE der Maus (*Mus musculus*, mm), Ratte (*Rattus norvegicus*, rn), Primaten (*Callithrix jacchus*, cj) und ARPE-19 Zellen. Die Negativkontrollen zeigen keine falsch positiven Ergebnisse. D: Ano1-mRNA wird nicht in ARPE-19 Zellen exprimiert. C: Expression von GAPDH-mRNA in Mausretina und im RPE der Maus (*Mus musculus*, mm), Ratte (*Rattus norvegicus*, rn), Primaten (*Callithrix jacchus*, cj) und ARPE-19 Zellen als Ladekontrolle. Die Negativkontrollen zeigen keine falsch positiven Ergebnisse.

3.3.4 Herunterregulierung von Ano2 in ARPE-19 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Ano2-Expression in RPE-Zellen in direkter Verbindung mit der ATP-induzierten Anionenleitfähigkeit steht, wurden ARPE-19 Zellen mit Ano2-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten ARPE-19 Zellen, die mit einer *scrambled*-siRNA mit einer nonsense-Sequenz transfiziert wurden. Die erfolgreiche Herunterregulierung der mRNA- und Proteinexpression von Ano2 wurde zunächst mittels qPCR und Western Blot überprüft. Wegen starker Primer-Dimerbildung des Ano2-Primers, der bei SYBR Green-PCR-Versuchen genutzt wurde, wurde die qPCR mit TaqMan-Primern als alternative Methode durchgeführt. Bei dieser Technik kommt es nicht zu Verfälschungen durch Primer-Dimere. Die qPCR-Experimente zeigten, dass die Expression der Ano2-mRNA in Zellen, die mit Ano2-siRNA transfiziert worden waren, 47 % geringer war als die Expression in mit *scrambled*-siRNA transfizierten Kontrollzellen. Die Quantifizierung von Proteinbanden im

Western Blot, die mit einem Ano2-spezifischen Antikörper angefärbt wurden, ergab ebenfalls, dass mit Ano2-siRNA transfizierte Zellen nur $60,01 \pm 7,20\%$ ($n=5$) der Ano2-Proteinmenge der Kontrollzellen exprimierten.

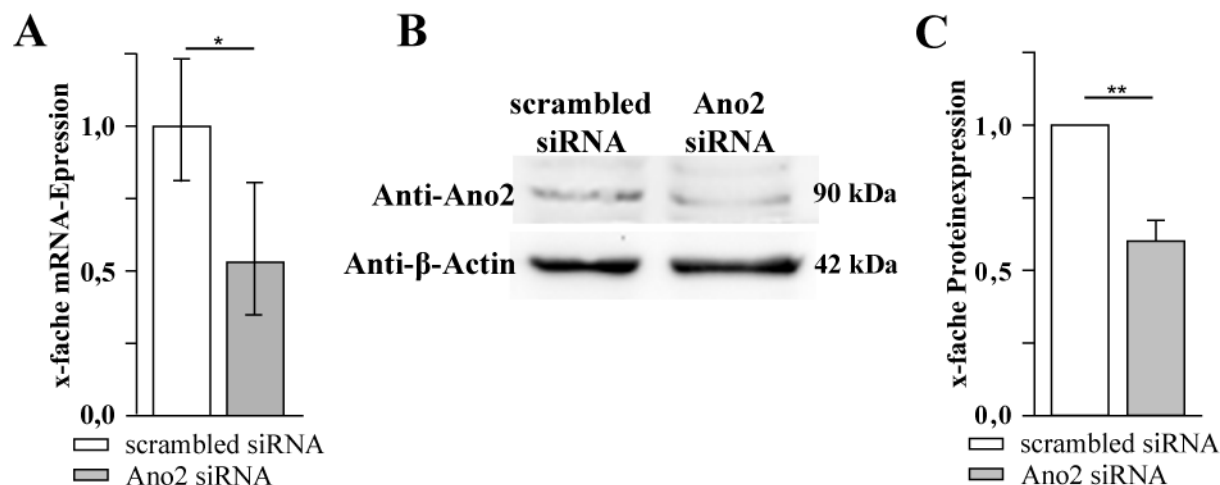


Abbildung 3.43: Herunterregulierung von Ano2 in ARPE-19 Zellen durch Transfektion mit Ano2-siRNA. A: Balkendiagramm, das die Ano2-mRNA-Expression in Kontrollzellen (scrambled siRNA) und mit Ano2-siRNA transfizierten ARPE-19 Zellen vergleicht. Ermittelt wurde die Herunterregulierung mittels qPCR ($n=4$, Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$). B: Repräsentativer Western Blot, welcher die Ano2- und β -Actin-Banden zeigt. C: Ano2-Proteinexpression normalisiert zu Kontrollzellen (scrambled siRNA). Das Verhältnis der integralen Dichte der Ano2-Banden zu den β -Actin-Banden diente als Grundlage für die Normalisierung ($n=6$; ** $p < 0,01$).

In Ganzzell-Patch-Clamp-Versuchen wurde der Effekt der Transfektion mit Ano2-siRNA auf die ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit untersucht. Die maximale Auswärtsstromdichte in den mit Ano2-siRNA transfizierten ARPE-19 Zellen betrug $4,75 \pm 0,46$ pA/pF ($n=6$). Sie war deutlich gegenüber der entsprechenden maximalen Auswärtsstromdichte von $10,43 \pm 1,89$ pA/pF ($n=5$) in den mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen verringert. Ebenfalls verringert war die maximale Einwärtsstromdichte mit $-1,47 \pm 0,07$ pA/pF ($n=6$) in den Ano2-siRNA-transfizierten Zellen. Sie betrug $-3,36 \pm 0,51$ pA/pF ($n=5$) in den Kontrollzellen. Um einen falsch positiven Effekt durch eine allgemeine erhöhte Leitfähigkeit der Zellen nach Transfektion mit scrambled-siRNA auszuschließen, wurde das Experiment auch mit ARPE-19 Zellen durchgeführt, die mit einer Ano4-spezifischen siRNA transfiziert worden waren. In diesen Zellen induzierte ATP eine Anionenleitfähigkeit mit einer maximalen Auswärtsstromdichte von $9,27 \pm 1,34$ pA/pF ($n=6$) und einer maximalen Einwärtsstromdichte von $-2,37 \pm 1,34$ pA/pF ($n=6$).

Um möglichst von Leck- und Kationenströmen freie Cl^- -Kanalströme zu untersuchen, wurden die ATP-induzierten Auswärtsstromdichten abzüglich der Einwärtsstromdichten analysiert. In den mit Ano2-siRNA transfizierten Zellen betrug diese „bereinigte“

Auswärtsstromdichte $46,46 \pm 6,65 \%$ ($n=6$) der „bereinigten“ Auswärtsstromdichte der Kontrollzellen ($100,00 \pm 22,31 \%$; $n=5$), in den Ano4-siRNA-transfizierten Zellen $97,55 \pm 18,97 \%$ ($n=6$).

Die Umkehrpotentiale der Anionenleitfähigkeit unterschieden sich mit $-13,66 \pm 2,13$ mV ($n=5$) nach Transfektion mit scrambled-siRNA, $-8,98 \pm 1,68$ mV ($n=6$) nach Transfektion mit Ano2-siRNA und $-12,10 \pm 1,27$ mV ($n=6$) nach Transfektion mit Ano4-siRNA nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

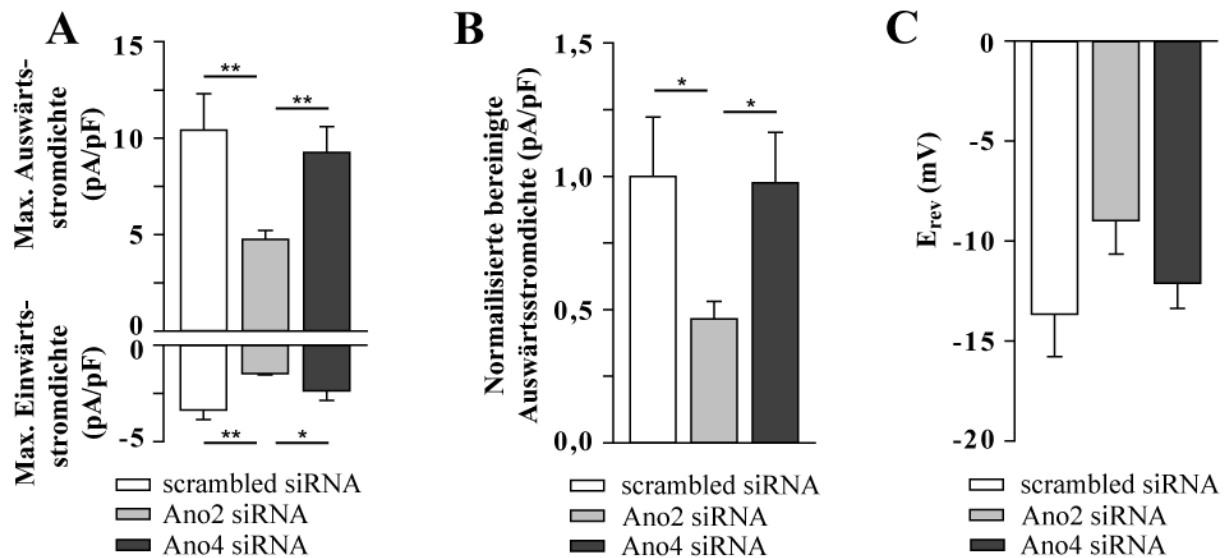


Abbildung 3.44: ATP-induzierte (500 μ M) Anionenleitfähigkeit der ARPE-19 Zellen nach Transfektion mit Kontroll-, Ano2- oder Ano4-siRNA. A-C: Balkendiagramme, welche die Anionenleitfähigkeit von ARPE-19 Zellen nach Transfektion mit scrambled- ($n=5$), Ano2- ($n=6$) und Ano4-siRNA ($n=6$) nach ATP-Zugabe vergleichen. Stimuliert wurden die Zellen mit dem Verlaufsspannungsprotokoll ($n=5-6$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). A: Maximale Auswärts und Einwärtsstromdichten. B: Auswärtsstromdichten normalisiert zum entsprechenden Mittelwert der Kontrollzellen. Die Berechnungen basieren auf den Auswärtsstromdichten abzüglich der entsprechenden Einwärtsstromdichten. C: Umkehrpotentiale.

3.3.5 ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit von ARPE-19 Zellen in Perforated-Patch-Versuchen

Die verwendete Pipettenlösung enthielt EGTA, wodurch sie Ca^{2+} -gepuffert war. Es wurde deshalb die Induzierung von Cl^- -Strömen durch Zugabe von ATP in Perforated-Patch-Clamp-Versuchen untersucht, um die Beweislage für die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ströme zu verstärken. Im Perforated-Patch-Modus wird das freie zytosolische Ca^{2+} nicht beeinflusst und Anstiege nach Aktivierung von ATP-Rezeptoren werden nicht abgepuffert. Somit wird die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Ionenkanäle unter physiologischem Ca^{2+} -Haushalt untersucht. Als Ionophor wurde Nystatin zur Pipettenlösung gegeben.

Die Zugabe von 500 μM ATP führte auch im Perforated-Patch-Modus zu einer zweiphasigen Stromantwort, welche mit den Messungen im klassischen Ganzzellmodus vergleichbar war. Es wurde zunächst ein Einwärtsstrom und zeitverzögert ein auswärtsrektifizierender Strom induziert. Beide Komponenten waren vollständig transient.

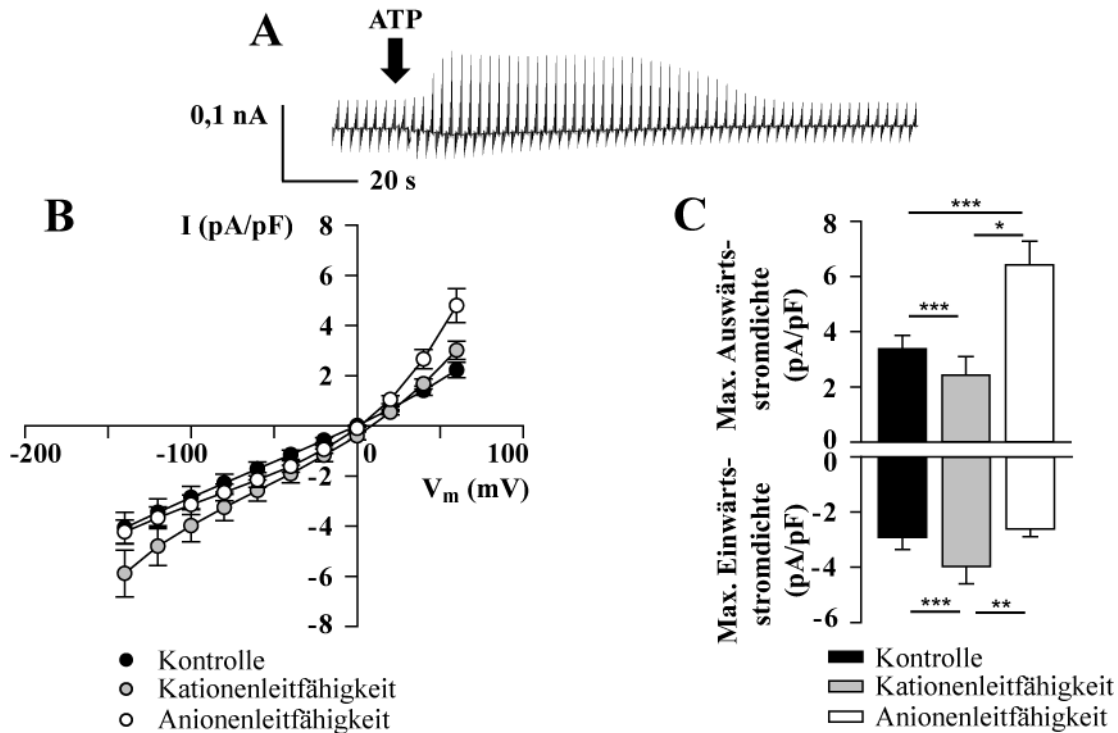


Abbildung 3.45: Effekt von 500 μM ATP auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen im Perforated-Patch-Clamp-Modus. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe während der Kationen- und Anionenleitfähigkeit. C: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten vor und nach ATP-Zugabe vergleichen ($n=12$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die Sensitivität der Anionenleitfähigkeit auf 30 μM CaCC_{inh}-A01 wurde getestet. Dabei wurde die bereits beschriebene zweifache ATP-Applikation in Folge angewandt. Wurde ATP beide Male hintereinander in Abwesenheit eines Blockers appliziert, unterschieden sich die maximalen Auswärtsstromdichten der Anionenleitfähigkeit mit $6,49 \pm 1,47$ pA/pF ($n=4$) nach erster ATP-Zugabe und $5,57 \pm 0,79$ pA/pF ($n=4$) nach zweiter ATP-Zugabe nur leicht voneinander. In Anwesenheit von CaCC_{inh}-A01 bei der zweiten ATP-Applikation betrug die maximale Auswärtsstromdichte $3,58 \pm 0,50$ pA/pF ($n=6$) und war damit deutlich, jedoch nicht signifikant gegenüber der maximalen Auswärtsstromdichte von $6,44 \pm 1,41$ pA/pF ($n=6$) bei erster ATP-Zugabe verringert. Da sich die Kontrollstromdichten unmittelbar vor der ATP-Applikation in den verschiedenen Experimenten deutlich voneinander unterschieden, wurde anhand der „bereinigten“ Auswärtsstromdichten ermittelt, wie sich die Anionenleitfähigkeit

der zweiten ATP-Applikation prozentual zur ersten veränderte. In Abwesenheit des Inhibitors war diese um $11,99 \pm 28,59 \%$ ($n=4$) erhöht, in Anwesenheit von $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ hingegen um $74,57 \pm 16,13 \%$ ($n=6$) verringert, sodass von einer inhibierenden Wirkung durch $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ ausgegangen werden kann.

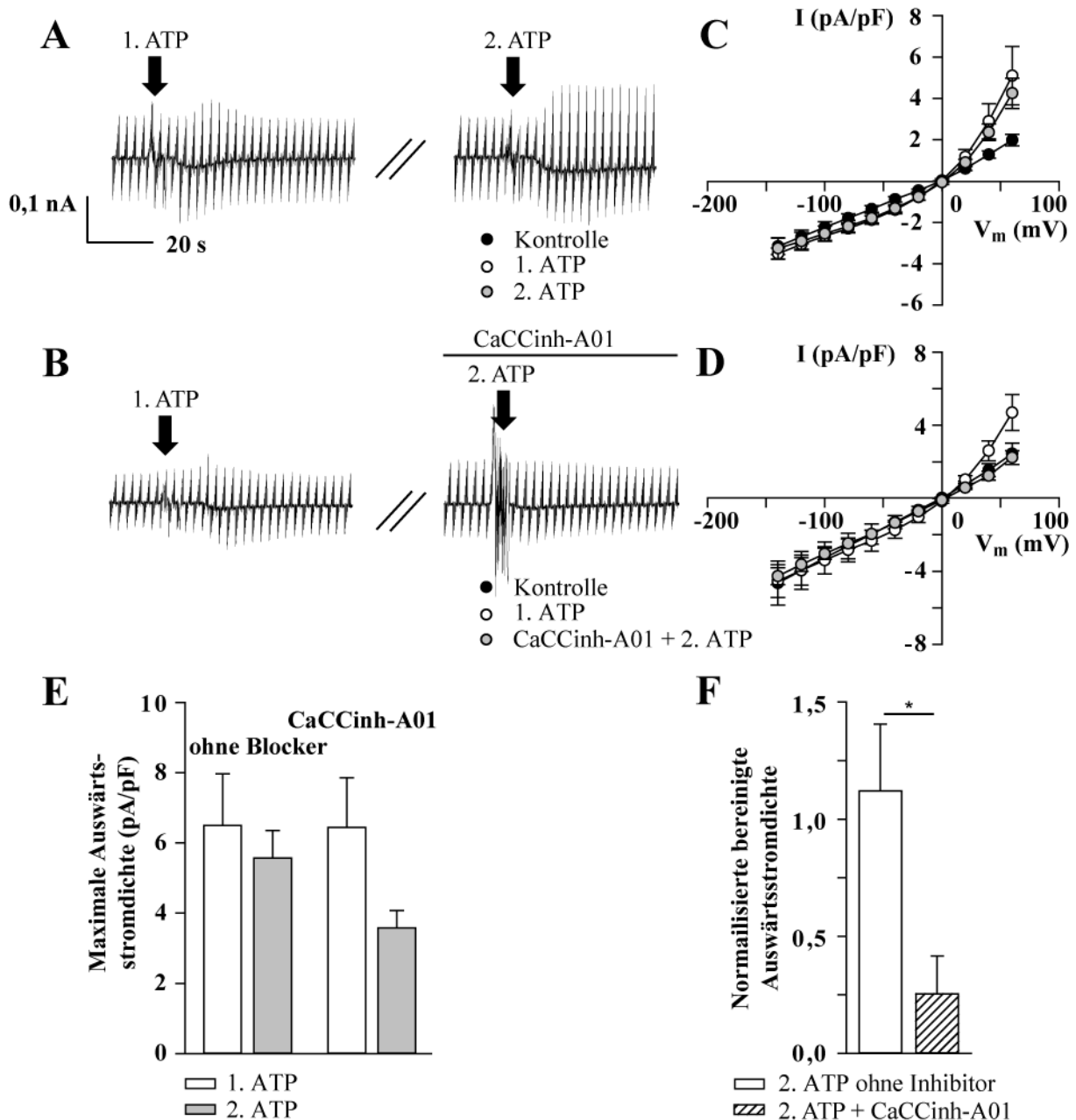


Abbildung 3.46: Effekt von $30 \mu\text{M}$ $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ auf die ATP-induzierte ($500 \mu\text{M}$) Anionenleitfähigkeit von ARPE-19 Zellen im Perforated-Patch-Clamp-Modus. A, B: Repräsentative Stromantworten von ARPE-19 Zellen auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. C, D: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach einer zweiten Zugabe von ATP in Abwesenheit (C; $n=4$; Mittelwerte \pm SEM) und Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ (D; $n=6$; Mittelwerte \pm SEM). E: Balkendiagramm, welches die maximalen Auswärtsstromdichten nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleicht ($n=4-6$; Mittelwerte \pm SEM). F: Balkendiagramm, welches das Verhältnis der Auswärtsstromdichten der zweiten zur ersten ATP-Applikation vergleicht. Die Berechnungen basieren

auf den maximalen Auswärtsstromdichten abzüglich der entsprechenden maximalen Einwärtsstromdichten. (n=4-6; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

3.3.6 ATP-induzierte Anionenleitfähigkeit in primären RPE-Zellen der Maus

ARPE-19 Zellen sind immortalisierte Zellen und entsprechen nicht in jeder Hinsicht dem nativen Gewebe. Deshalb wurde an primär kultivierten murinen RPE-Zellen die funktionelle Expression einer ATP-induzierten Anionenleitfähigkeit überprüft. Es wurde im konventionellen Ganzzellmodus, in K^+ -freien Lösungen und, wenn nicht explizit anders erwähnt, unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen gearbeitet.

Unter diesen Bedingungen reagierten die primären RPE-Zellen ähnlich wie die ARPE-19 Zellen auf die Zugabe von 500 μM ATP. Es wurde eine transiente zweiphasige Stromantwort bestehend aus einer einwärts- und einer auswärtsrektifizierenden Komponente aktiviert. Die beiden Phasen der Stromreaktion überlagerten sich in vielen Zellen stärker als in ARPE-19 Zellen. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den maximalen Auswärts- und Einwärtsstromdichten wider. Zudem besaßen einige Zellen eine große Membrankapazität, die nicht vollständig kompensiert werden konnte und zu starken Kapazitätsartefakten führte. Das Umkehrpotential der einwärtsrektifizierenden Leitfähigkeit war mit $-2,45 \pm 2,20$ mV (n=18) im Vergleich zu dem der Kontroll- und der auswärtsrektifizierenden Leitfähigkeit von jeweils $-15,15 \pm 4,99$ mV (n=18) und $-10,24 \pm 2,06$ mV (n=18) positiv verschoben. Wie bei den äquivalenten Versuchen an ARPE-19 Zellen wird sie als Kationenleitfähigkeit bezeichnet, die Phase der auswärtsrektifizierenden Leitfähigkeit als Anionenleitfähigkeit.

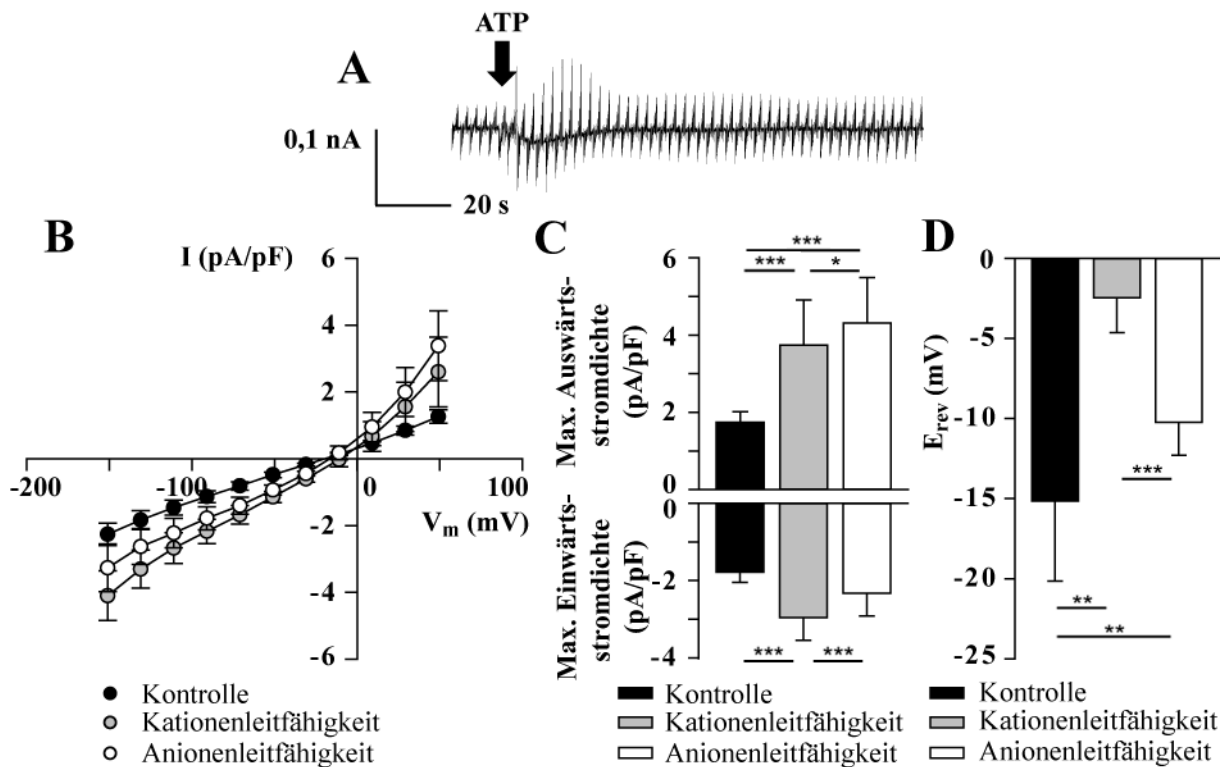


Abbildung 3.47: Effekt von 500 μM ATP auf die Leitfähigkeit von primären Maus-RPE-Zellen in der Ganzzellkonfiguration unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. A: Repräsentative Stromantwort einer primären RPE-Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe während der Kationen- und Anionenleitfähigkeit. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach ATP-Zugabe vergleichen ($n=18$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ein Anheben der intrazellulären Cl^- -Konzentration führte zu einer vergleichbaren zweiphasigen ATP-bedingten Stromantwort. Die Kapazitätsartefakte waren geringer als unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen und die Kationen- und Anionenleitfähigkeit besser differenzierbar. Das Umkehrpotential der Anionenleitfähigkeit war mit $-0,52 \pm 0,58$ mV ($n=5$) positiver als unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen. Es unterschied sich hingegen kaum vom Umkehrpotential der Kationenleitfähigkeit, das $1,17 \pm 1,04$ mV ($n=5$) betrug.

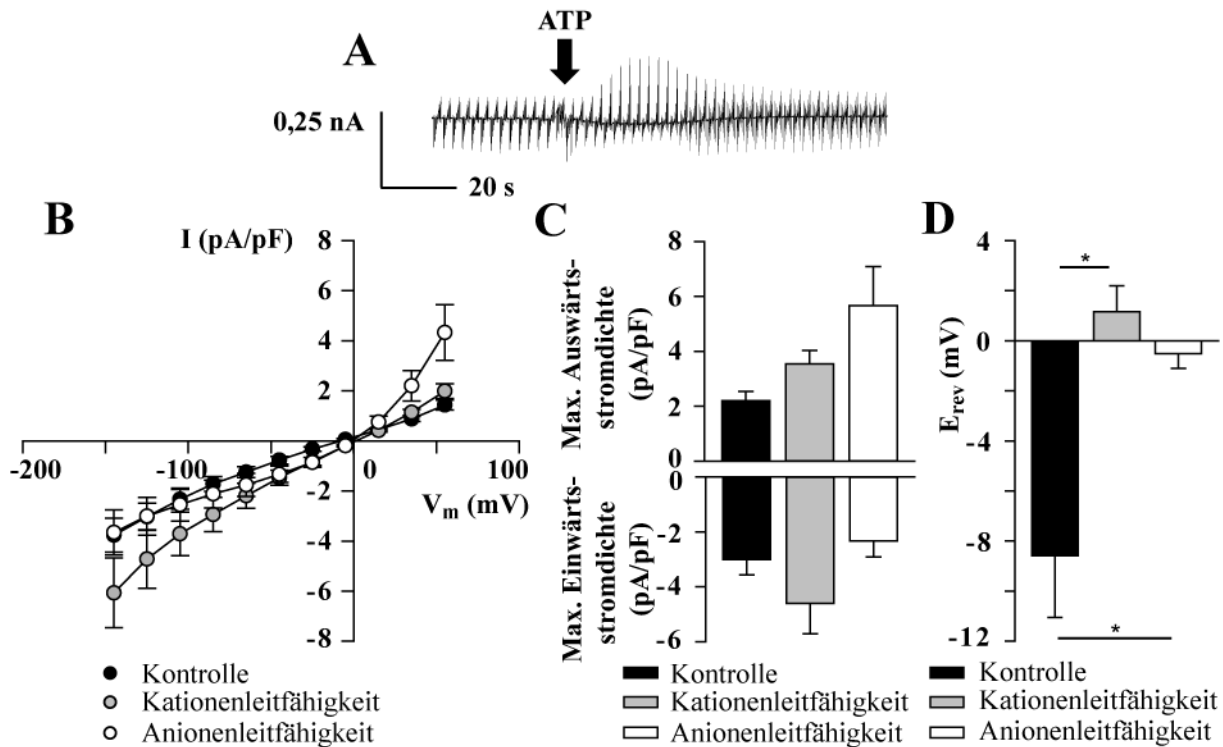


Abbildung 3.48: Effekt von 500 µM ATP auf die Leitfähigkeit von primären Maus-RPE-Zellen unter symmetrischen Cl⁻-Bedingungen hoher Konzentration. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. B: Strom-Spannungskennlinien vor und nach ATP-Zugabe während der Kationen- und Anionenleitfähigkeit. C, D: Balkendiagramme, welche die maximalen Aus- und Einwärtsstromdichten (C) sowie die Umkehrpotentiale (D) vor und nach ATP-Zugabe vergleichen (n=5; Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05).

Um die Sensitivität der Anionenleitfähigkeit auf 30 µM CaCC_{inh}-A01 zu prüfen, wurde die Methode der doppelten ATP-Applikation in Ab- beziehungsweise Anwesenheit des Blockers angewandt. Bei Kontrollversuchen ohne Zusatz von CaCC_{inh}-A01 wurde sowohl nach erster als auch nach zweiter ATP-Applikation eine nahezu identische maximale Auswärtsstromdichte von jeweils $2,56 \pm 0,60$ pA/pF (n=5) und $2,57 \pm 0,40$ pA/pF (n=5) erreicht. Das Umkehrpotential war nach der zweiten Applikation mit $-2,79 \pm 1,55$ mV (n=5) nicht signifikant positiv gegenüber dem Umkehrpotential von $-7,85 \pm 2,73$ mV (n=5) nach erster Applikation (p > 0,05) verschoben.

Wurde zwischen den beiden ATP-Zugaben CaCC_{inh}-A01 appliziert, konnte durch die zweite ATP-Zugabe eine Anionenleitfähigkeit mit einer signifikant geringeren maximalen Auswärtsstromdichte von $2,04 \pm 0,33$ pA/pF (n=4) induziert werden als durch die erste ATP-Zugabe ($4,67 \pm 0,81$ pA/pF; n=4). Das Umkehrpotential erreichte mit $9,85 \pm 1,94$ mV (n=4) deutlich positivere Werte in Anwesenheit von CaCC_{inh}-A01 als das nach erster ATP-Zugabe von $-3,90 \pm 2,57$ mV (n=4).

Die großen Unterschiede der maximalen Auswärtsstromdichten in den beiden Experimenten sind auf stark abweichende Kapazitäten und kapazitative Artefakte zurückzuführen. Aufgrund dieser ist auch keine Analyse der „bereinigten“ Auswärtsstromdichten möglich. Stattdessen wurden die prozentualen Anstiege der maximalen Auswärtsstromdichten der Anionenleitfähigkeit in Bezug auf die Kontrolleitfähigkeiten ermittelt und zur besseren Übersicht der Effekte dargestellt. In dieser Darstellung wird ersichtlich, dass eine zweite Zugabe von ATP in Abwesenheit eines Inhibitors zu einem ebenso starken Anstieg des Auswärtsstroms führt wie die erste Applikation. In Anwesenheit von $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ ist dieser Anstieg hingegen stark reduziert, was einen Ca^{2+} -induzierten Cl^- -Kanal im nativen RPE identifiziert.

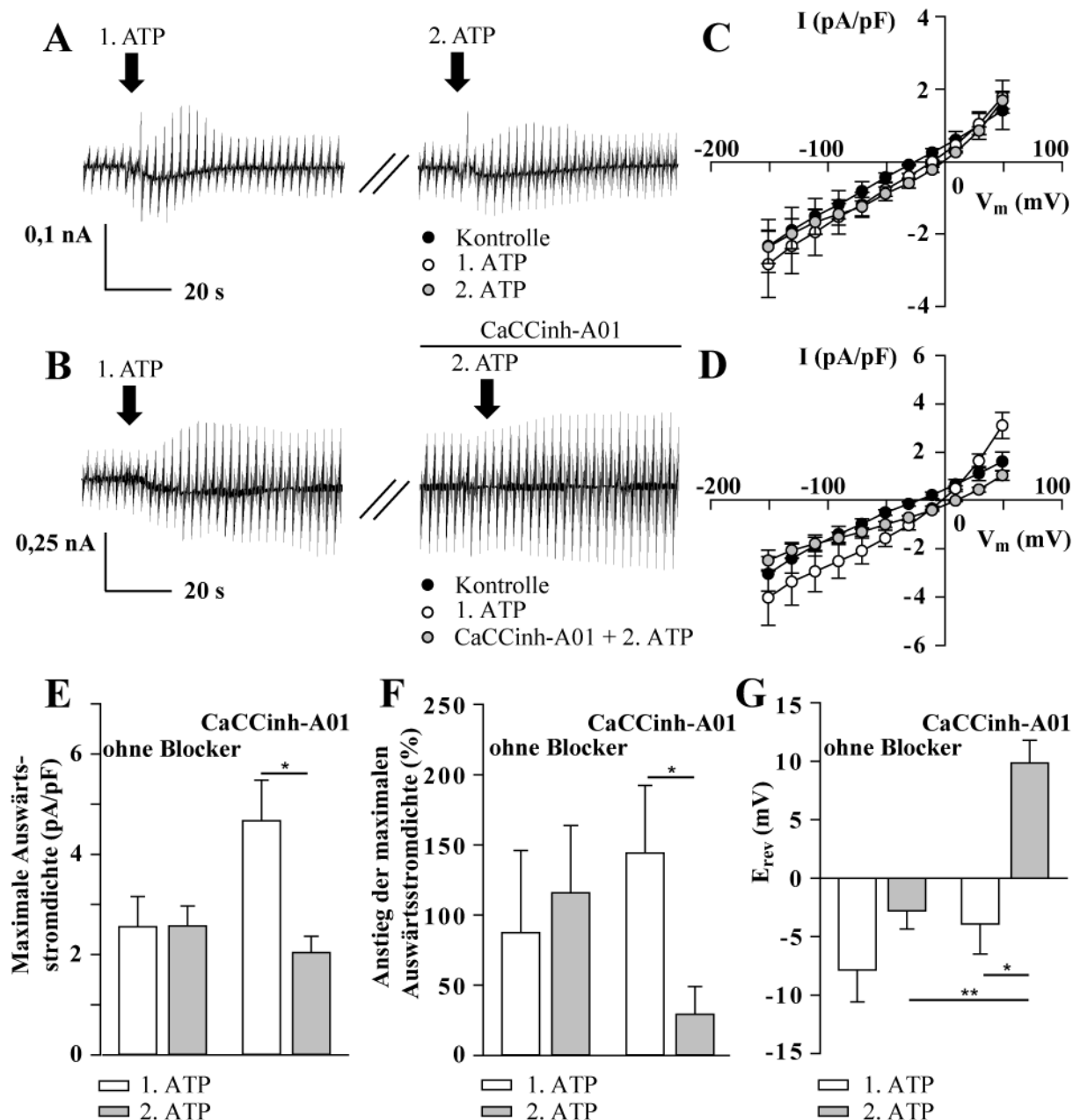


Abbildung 3.49: Effekt von $30 \mu\text{M}$ $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ auf die ATP-induzierte ($500 \mu\text{M}$) Anionenleitfähigkeit von primären Maus-RPE-Zellen. A, B: Repräsentative Stromantworten von primären RPE-Zellen auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. C, D: Strom-Spannungskennlinien vor und nach erster ATP-Zugabe und nach einer zweiten Zugabe von ATP in Abwesenheit (C; $n=5$; Mittelwerte \pm SEM) und Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ (D; $n=4$; Mittelwerte \pm SEM). E-G: Balkendiagramme, welche die maximalen Auswärtsstromdichten (E), prozentualen Anstiege der maximalen Auswärtsstromdichten (F) und Umkehrpotentiale (G) nach erster und zweiter ATP-Zugabe vergleichen ($n=4-5$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die Ergebnisse zeigen, dass im nativen RPE ein CaCC funktionell exprimiert wird, der vergleichbare Eigenschaften wie der in ARPE-19 Zellen gefundene Kanal besitzt.

3.4 Hitze- und Cannabidiol-aktivierte Ionenleitfähigkeit in ARPE-19 Zellen

Einen der Faktoren, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, stellen Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle dar. Ein Vertreter dieser Ionenkanalgruppe ist TRPV2, das unter anderem in RPE-Zellen exprimiert wird (Cordeiro *et al.*, 2010). TRPV2-Kanäle können über ihre Fähigkeit, das freie zytosolische Ca^{2+} zu steigern, die oben beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanäle aktivieren. Deshalb wurde die Regulation von TRPV2 untersucht, indem die Wirkung zweier TRPV2-Stimulantien, welche Hitze und Cannabidiol waren, sowie des TRPV2-Inhibitors SKF96365 analysiert wurde. ARPE-19 Zellen wurden in der Ganzzellkonfiguration mit dem Spannungsprotokoll „Rampe“ stimuliert. Es wurden K^+ -freie Lösungen mit symmetrischen Cl^- -Bedingungen verwendet (Kapitel 2.2.4).

Auf den Wechsel von einer raumtemperierten auf eine $45\text{ }^\circ\text{C}$ -warme Badlösung reagierten 60 % der Zellen mit einem Anstieg der Leitfähigkeit. Die Gesamtstromdichte stieg von $7,76 \pm 2,72\text{ pA/pF}$ auf $9,05 \pm 3,20\text{ pA/pF}$ ($n=6$) und damit um $16,59 \pm 2,03\%$ ($n=6$).

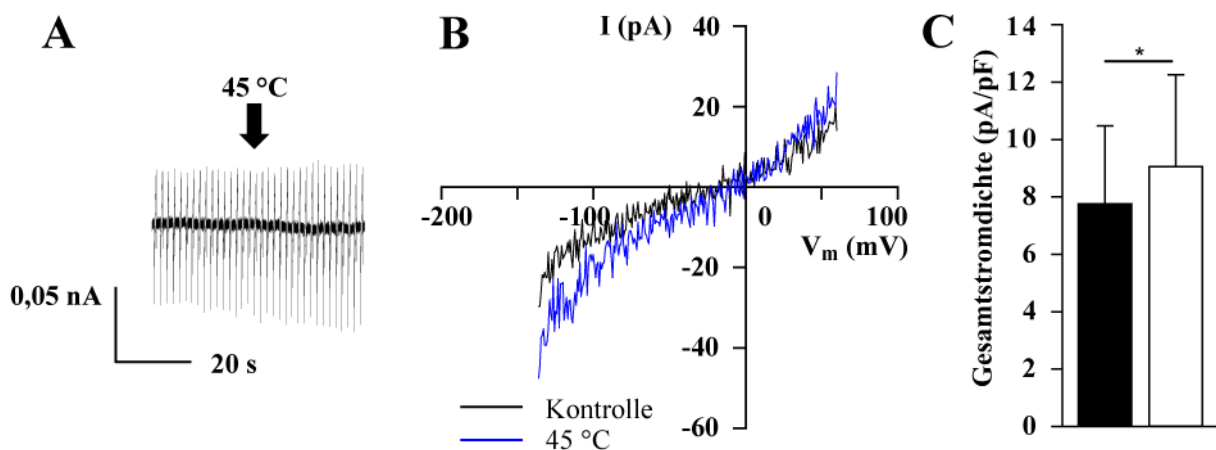


Abbildung 3.50: Effekt von Wärmeanwendung ($45\text{ }^\circ\text{C}$) auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf das Spannungsprotokoll „Rampe“. B: Strom-Spannungskennlinien der ARPE-19 Zelle in A vor und nach Wärmeanwendung. C: Balkendiagramm, das die Gesamtstromdichte vor und nach Wärmeanwendung vergleicht ($n=6$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$).

Auch auf die Zugabe von $45\text{ }\mu\text{M}$ Cannabidiol reagierten die ARPE-19 Zellen mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Die Gesamtstromdichte stieg von $0,76 \pm 0,15\text{ pA/pF}$ auf $2,96 \pm 0,46\text{ pA/pF}$ ($n=6$) und somit um $313,46 \pm 50,33\%$ ($n=6$). Der Wechsel auf eine $45\text{ }^\circ\text{C}$ warme Badlösung führte zu einem weiteren Anstieg der Gesamtstromdichte auf $4,20 \pm 0,64\text{ pA/pF}$ ($n=6$), was einen prozentualen Anstieg um $475,73 \pm 42,97\%$ ($n=6$) bezogen auf die Kontrollstromdichte bedeutet.

Nach 10-minütiger Vorinkubation der Zellen mit 20 μM des TRPV2-Inhibitors SKF96365 verstärkte Cannabidiol die Leitfähigkeit der Zellen nicht. Beim Wechsel von der raumtemperierten auf eine 45 °C-warme extrazelluläre Lösung stieg die Gesamtstromdichte, die unter Kontrollbedingungen $0,82 \pm 0,11 \text{ pA/pF}$ ($n=4$) betrug, auf $0,93 \pm 0,15 \text{ pA/pF}$ ($n=4$) und somit um $12,33 \pm 7,14 \%$ ($n=4$).

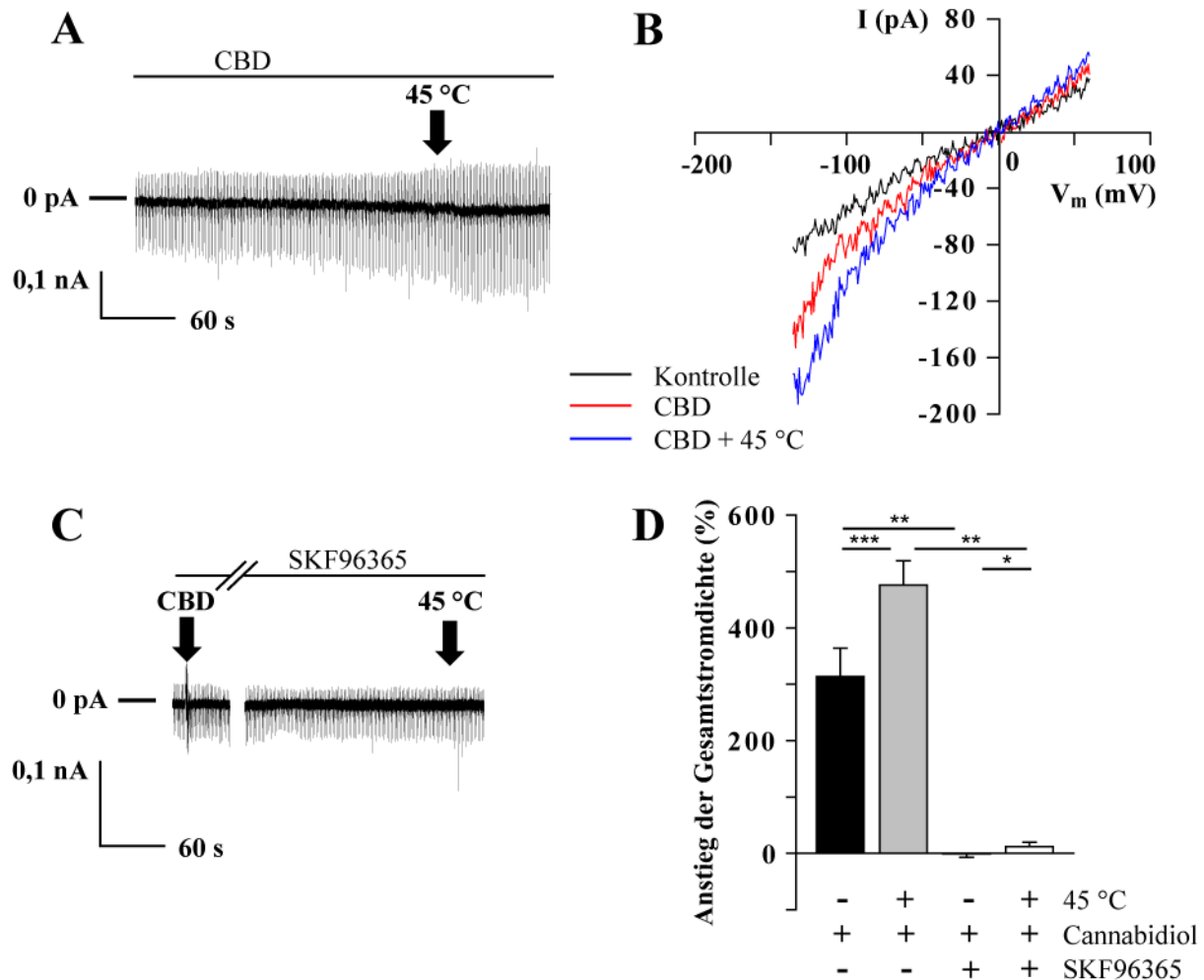


Abbildung 3.51: Effekt von 45 μM Cannabidiol auf die Leitfähigkeit von ARPE-19 Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf das Spannungsprotokoll „Rampe“. B: Strom-Spannungskennlinien der ARPE-19 Zelle in A vor und nach Wärmeanwendung. C: Balkendiagramm, das die Gesamtstromdichte vor und nach Wärmeanwendung vergleicht ($n=4-6$; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden für die Mehrheit der Experimente Zelllinien verwendet. An ihnen wurden *in vitro* funktionelle Untersuchungen zum elektrophysiologischen und pharmakologischen Verhalten durchgeführt. Mit HLE B-3 und ARPE-19 wurden bewusst Zelllinien gewählt, die strukturell und funktionell als physiologisch repräsentativ gelten und deshalb zu den am häufigsten verwendeten Zelllinien ihrer Art gehören (Andley *et al.*, 1994; Dunn *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 1998). Dennoch sind auch diese Zelllinien gegenüber nativen Zellen verändert. Deshalb wurden grundlegende Versuche an primären Linsenepithel- oder RPE-Zellen wiederholt und die Übertragbarkeit der untersuchten Eigenschaften überprüft. Zusätzlich zu den funktionellen Untersuchungen *in vitro* wurden die Daten *in vivo* mittels PCR und Western Blot und *in situ* mittels immunzyto- oder immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt. Die an den Zelllinien gewonnenen Ergebnisse wurden somit auf verschiedenen Ebenen validiert, damit sie auf die *in vivo* Situation übertragen werden können.

4.1 Ca^{2+} -aktivierte Kationenkanäle in humanen Linsenepithelzellen

In der Physiologie der Linse nehmen Ionenkanäle eine wichtige Rolle ein. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase und der intakten Funktion des Mikrozirkulationssystems beteiligt. Eine Störung dieser Funktionen bewirkt einen Verlust der Transparenz der Linse, was zur Erblindung führen kann (Hightower & McCready, 1989; Gao *et al.*, 2013). Die größte Vielfalt an Ionenkanälen und -transportern wird im Linsenepithel exprimiert, das den metabolisch aktiven Zelltyp in der Linse darstellt. Es wird angenommen, dass eine Schädigung von Linsenepithelzellen der Ausgangspunkt für die Pathogenese einiger Kataraktformen ist (Streeten & Eshaghian, 1978; Fagerholm & Philipson, 1981; Tseng *et al.*, 1994; Hightower, 1995; Kalariya *et al.*, 1998; Marcantonio & Vrensen, 1999).

In den 70er bis 90er Jahren beschäftigte sich eine Reihe von Forschungsgruppen mit dem elektrophysiologischen Verhalten der Linse, insbesondere des Linsenepithels. Sie konnten generelle Zusammenhänge zwischen einer gestörten Ionenpermeabilität und der Kataraktogenese demonstrieren sowie verschiedene Auslöser, sogenannte kataraktogene Faktoren, identifizieren (Marcantonio *et al.*, 1986; Hightower, 1995; Hales *et al.*, 1995; Spector, 1995; Jobling & Augusteyn, 2002). Die molekulare Identität von Ionenkanälen, die in Linsenepithelzellen an der Leitfähigkeit beteiligt sind, konnte mit Ausnahme einiger spannungs- und Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle damals allerdings nicht aufgeklärt werden. In den letzten Jahren wurden nur noch wenige Untersuchungen auf dem Gebiet unternommen. Das

Wissen um Ionenkanäle ist aber enorm gewachsen. Es ist deshalb sinnvoll die bisherigen Untersuchungen erneut zu betrachten und auszubauen, um das Verständnis für die Physiologie und Pathologie der Linse zu vertiefen.

Ziel dieser Studie war es deshalb in elektrophysiologischen Untersuchungen von Linsenepithelzellen Ionenkanäle zu identifizieren und einen möglichen Zusammenhang mit der Kataraktogenese der Linse herzustellen. Fokussiert wurden dabei Ca^{2+} - und ROS-aktivierte Ionenkanäle, da bekannt ist, dass sowohl Ca^{2+} als auch ROS in die Kataraktogenese involviert sind. Zudem wurde der Einfluss eines weiteren kataraktogenen Faktors, $\text{TGF}\beta_2$, auf die Leitfähigkeit untersucht.

4.1.1 Veränderte K^+ -Leitfähigkeit in immortalisierten Linsenepithelzellen

Zunächst wurden in dieser Studie die elektrophysiologischen Eigenschaften von Linsenepithelzellen der Zelllinie HLE B-3 und der Primärkultur unter annähernd physiologischen Lösungsbedingungen untersucht. Unter diesen Bedingungen unterschieden sich HLE B-3 Zellen und primäre Linsenepithelzellen bezüglich ihrer K^+ -Leitfähigkeit. So konnte in HLE B-3 Zellen weder unter Kontrollbedingungen noch nach Ionomycin-Applikation eine K^+ -Leitfähigkeit beobachtet werden. Die primären Zellen hingegen zeigten einen stark auswärtsrektifizierenden Ionenstrom unter Kontrollbedingungen, der anhand seiner Umkehrpotentiale K^+ -Kanälen zugeordnet werden konnte. Auf die Zugabe von Ionomycin reagierten die primären Linsenepithelzellen unterschiedlich. In einigen Zellen wurde der K^+ -Strom verstärkt, in den meisten Zellen jedoch reduziert. Ob es sich bei diesen Kanälen um Maxi-K-Kanäle, welche bereits in Linsenepithelzellen identifiziert werden konnten, oder um andere spannungsabhängige K^+ -Kanäle handelt, wurde nicht weiter untersucht (Rae *et al.*, 1990; Rae & Shepard, 1998).

Im Verlauf der Zellimmortalisierung oder des Passagierens der HLE B-3 Zelllinie scheint es also zu einem Verlust an K^+ -Kanälen gekommen zu sein. Linsenfaserzellen weisen mit fortschreitender Differenzierung und Elongation eine zunehmende Depolarisation auf und werden von einer nicht-spezifischen Basisleitfähigkeit dominiert. Dies lässt ebenfalls einen Verlust an K^+ -Kanälen vermuten, die maßgeblich an der Aufrechterhaltung des negativen Membranpotentials der Zellen beteiligt sind (Lovicu, 2004). Eine Überprüfung von Laura Wernecke bestätigt den epithelialen Charakter der hier verwendeten Linsenzelllinie HLE B-3. Dennoch ist denkbar, dass während des Immortalisierungsprozesses oder durch häufiges Passagieren eine Veränderung des Phänotyps oder eine Dedifferenzierung stattgefunden hat. Meissner und Noack (2008) fanden eine verringerte Expression verschiedener spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und ein deutlich reduziertes Zellwachstum in HLE B-3

Zellen, die mehr als 14-mal passagiert worden waren (Meissner & Noack, 2008). In Experimenten von Wang-Su *et al.* (2003) zeigten HLE B-3 Zellen einen Verlust von Kristallinen, aber eine zusätzliche Expression verschiedener anderer Proteine. Dies macht deutlich, dass beim Arbeiten mit Zelllinien die Ergebnisse mit besonderer Vorsicht interpretiert und mittels Vergleich mit primär kultivierten Zellen abgesichert werden sollten, da sie gegenüber den nativen Zellen oft verändert sind.

4.1.2 Funktionelle Expression von Maxi-K-Kanälen in HLE B-3 Zellen durch TGFβ2

In der Physiologie und Pathophysiologie vieler Gewebe spielt das multifunktionelle Zytokin TGFβ eine Rolle. Es beeinflusst Prozesse wie das Zellwachstum, die Zellreifung und -differenzierung, entzündliche Prozesse, die Wundheilung und Reparaturmechanismen (Santibañez *et al.*, 2011). In der Linse wird über die physiologische Rolle von TGFβ bislang nur spekuliert. Es ist jedoch bekannt, dass TGFβ an der Pathogenese verschiedener Kataraktformen beteiligt ist (Hales *et al.*, 1997, 1999; Lovicu *et al.*, 2002; de Iongh *et al.*, 2005; Chamberlain *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang wird es oft verwendet, um *in vitro* oder *in vivo* kataraktöse Veränderungen hervorzurufen und zu untersuchen. Hierbei steht meistens die Transformation epithelialer in mesenchymale Linsenzellen (EMT) im Fokus. Dieser Vorgang wird in erster Linie mit dem fibrotischen Nachstar sowie der vorderen subkapsulären Katarakt assoziiert.

Um einen möglichen Einfluss von TGFβ auf die Ca²⁺-abhängige Leitfähigkeit in Linsenepithelzellen zu untersuchen, wurden HLE B-3 Zellen 48 Stunden mit TGFβ2 vorbehandelt und anschließend unter physiologischen Lösungsbedingungen elektrophysiologisch untersucht. In Zellen, die mit TGFβ2 kultiviert worden waren, induzierte Ionomycin einen K⁺-Strom, den es nicht in Kontrollzellen aktivieren konnte. Die K_{Ca}-Kanäle konnten anhand ihrer Sensitivität gegenüber Paxillin als Maxi-K-Kanäle identifiziert werden. Die Vorbehandlung mit TGFβ2 führte demnach zu einer funktionellen Expression von Maxi-K-Kanälen. Dass der Effekt auf der Behandlung mit TGFβ2 und nicht auf einem „Aushungern“ der Zellen durch Serumentzug beruhte, konnte durch den Vergleich mit parallel serumfrei, aber in Abwesenheit von TGFβ2 kultivierten Zellen ausgeschlossen werden.

Das Auftreten der Maxi-K-Kanäle beeinflusste stark das Umkehrpotential im Maximum des Ca²⁺-induzierten K⁺-Stroms (Effekt 1) sowie im depolarisierenden Effekt (Effekt 2) nach Ionomycin-Zugabe. Beide Umkehrpotentiale waren in den TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen deutlich negativer als bei Messungen an unbehandelten HLE B-3 Zellen. Diese Hyperpolarisation wurde durch die Wirkung von Paxillin nivelliert.

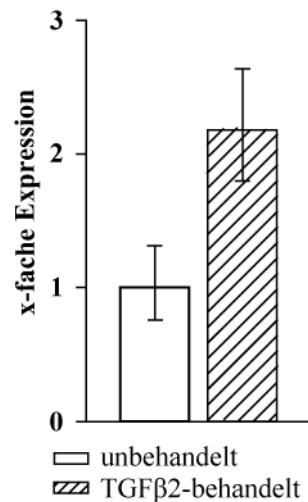


Abbildung 4.1: Hochregulierung der KCNMA1-mRNA in HLE B-3 Zellen durch Behandlung mit TGFβ2 (bereitgestellt von L. Wernecke, 2016; unveröffentlichte Daten). Ermittelt wurde die Hochregulierung mittels qPCR (n=4, Mittelwerte ± SEM; p = 0,053).

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war die mRNA von KCNMA1, welches das kodierende Gen für die porenbildende Untereinheit des Maxi-K-Kanals ist, in TGFβ2-behandelten HLE B-3 Zellen um das 2,18-Fache hochreguliert verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 4.1; bereitgestellt von Laura Wernecke). Eine Hochregulierung des Maxi-K-Kanals könnte das Auftreten von auswärtsrektifizierenden Strömen durch diesen Ionenkanal nach TGFβ2-Exposition erklären. Man könnte bei einem solch starken Einfluss auf die Leitfähigkeitsveränderung aber eine deutlichere Expressionserhöhung erwarten. Neben einer direkten Wirkung von TGFβ2 auf die Maxi-K-Expression könnte TGFβ2 zusätzlich indirekt über die Hochregulierung oder Aktivierung zwischengeschalteter Faktoren die Maxi-K-Aktivität steigern.

Diese Hypothese steht im Einklang mit früheren Studien der Arbeitsgruppe um Professor Dryer. Die Gruppe berichtete von einer Stimulierung von Maxi-K-Kanälen in Neuronen von Ziliarganglien des Huhns durch TGFβ1. Sie zeigten, dass TGFβ1 die Translokation von K_{Ca} -Kanälen aus intrazellulären Speichern in die Plasmamembran bewirkt (Lhuillier & Dryer, 2000, 2002; Dryer *et al.*, 2003; Chae *et al.*, 2005). Längerfristig führte TGFβ1 auch zu einer verstärkten Neusynthese der Kanäle (Dryer *et al.*, 2003).

In der Physiologie und Pathophysiologie der Linse spielt die Unterform TGFβ2 die wichtigste Rolle, weil sie im Gegensatz zu TGFβ1 und TGFβ3 von der Linse sowohl synthetisiert und sezerniert wird als auch ein hohes kataraktogenes Potential besitzt (Allen *et al.*, 1998; Gordon-Thomson *et al.*, 1998).

4.1.2.1 Mögliche Bedeutung einer vermehrten Maxi-K-Expression

Maxi-K-Kanäle spielen eine Rolle bei der Ca^{2+} -Homöostase und darüber bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen (Nilius & Droogmans, 2001; Zheng & Trudeau, 2015). In nicht-erregbaren Zellen, zu denen auch epitheliale Zellen gehören, können Maxi-K-Kanäle über einen Feedback-Mechanismus einen Ca^{2+} -Einstrom verstärken oder ihm entgegenwirken. Die Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} aktiviert K^+ -Kanäle in der Zytoplasmamembran. Der resultierende K^+ -Ausstrom hyperpolarisiert die Zellmembran. Das erhöht die Antriebskraft für den Einstrom von Ca^{2+} über Ca^{2+} -permeable Kanäle wie P2X-, TRP- oder Orai-Kanäle aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden durch eine Hyperpolarisation hingegen deaktiviert. Durch seine spannungsabhängige Aktivierung bei Depolarisation und Inaktivierung bei Hyperpolarisation der Zellmembran ist der Maxi-K-Kanal für eine Feinregulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des Membranpotentials geeignet (Zheng & Trudeau, 2015).

Über ihre Beteiligung am Ca^{2+} -Haushalt von Zellen spielen Maxi-K-Kanäle auch eine Rolle in der Zellproliferation. In verschiedenen Geweben führt eine gesteigerte Aktivität von Maxi-K-Kanälen zu einer Proliferationssteigerung (Wiecha, Münz, *et al.*, 1998; Kodal *et al.*, 2000; Urrego *et al.*, 2014). Auslöser für die Aktivierung der Maxi-K-Kanäle ist die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren. So aktiviert Insulin Maxi-K-Kanäle in Endothelzellen, Mesangiumzellen und Neuronen des Hippocampus und Hypothalamus verschiedener Spezies sowie rekombinante Maxi-K-Kanäle in HEK293-Zellen (Wiecha, Reineker, *et al.*, 1998; O'Malley & Harvey, 2004; Foutz *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). In kortikalen Neuronen der Maus führen Neurotrophin-3 und der Nervenwachstumsfaktor (NGF) zu einer Maxi-K-Kanal-Aktivierung (Holm *et al.*, 1997); in Neuronen des Ziliarganglions des Huhns sind es β -Neuregulin-1 und, wie bereits beschrieben, $\text{TGF}\beta 1$ (Cameron *et al.*, 1999; Dryer *et al.*, 2003). Ein weiterer Faktor, der eine gesteigerte Maxi-K-Aktivität bewirkt, ist bFGF. Untersuchungen humaner Endothelzellen konnten zudem einen direkten Zusammenhang zwischen der bFGF-induzierten Maxi-K-Kanal-Aktivierung und der ebenfalls bFGF-bedingten Steigerung der Proliferation aufzeigen (Wiecha, Münz, *et al.*, 1998).

Die verstärkte Expression des Maxi-K-Kanals durch $\text{TGF}\beta 2$ könnte über eine erhöhte K^+ -Leitfähigkeit und damit einhergehender Hyperpolarisierung zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase, Proliferation, Migration und Differenzierung der Linsenepithelzellen und der kortikalen Linsenfaserzellen beitragen. Ob ein Zusammenhang mit der $\text{TGF}\beta 2$ -induzierten Kataraktogenese in HLE B-3 Zellen besteht, bleibt offen.

Es muss jedoch beachtet werden, dass die fehlende funktionelle Expression des Maxi-K-Kanals in der Zelllinie ein Artefakt aus dem Immortalisierungs- oder Kultivierungsprozess sein könnte. Im Gegensatz zu den HLE B-3 Zellen zeigten die primären Linseneithelzellen eine ausgeprägte Grundleitfähigkeit für K^+ -Ionen. Auch in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte die funktionelle Expression von Maxi-K-Kanälen in Linseneithelzellen nachgewiesen werden (Rae *et al.*, 1990; Rae & Shepard, 1998). Um beurteilen zu können, ob die TGF β 2-bedingten Maxi-K-Kanal-Stimulierung physiologisch relevant ist, ist daher eine Wiederholung der Versuche an primären Linseneithelzellen notwendig.

4.1.3 Induzierung eines Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals in humanen Linseneithelzellen

Eine Gemeinsamkeit der primären Linseneithelzellen und der HLE B-3 Zellen war ein starker Anstieg der Leitfähigkeit nach Ionomycin-Zugabe. Ein solcher Stromanstieg trat sowohl unter K^+ -haltigen als auch K^+ -freien Bedingungen auf. Wurden Lösungen mit symmetrischen intra- und extrazellulären Konzentrationen an monovalenten Kationen und Cl^- verwendet, besaßen die Ionomycin-induzierten Ströme Umkehrpotentiale von annähernd 0 mV. Unter den gegebenen Bedingungen bedeutet das, dass entweder monovalente Kationen oder Cl^- -Ionen geleitet werden, wohingegen ein selektiver Strom von Ca^{2+} -Ionen, die extrazellulär in deutlich höherer Konzentration als intrazellulär vorliegen, unwahrscheinlich ist. Außerdem ergab sich eine lineare Strom-Spannungsbeziehung, was zusätzlich darauf hindeutet, dass der zugrundeliegende Ionenkanal nicht spannungsabhängig ist.

Die Linearität und das Umkehrpotential des Stroms blieben auch dann unverändert, wenn die Cl^- -Konzentration der Badlösungen variiert wurde. Ein Absenken der extra- oder intrazellulären Konzentration an monovalenten Kationen hingegen beeinflusste die Charakteristik der Ströme maßgeblich. Wurde NaCl in der Badlösung durch NMDG-Cl ersetzt, verschob sich das Umkehrpotential zu deutlich negativeren Werten. Dass bereits vor Ionomycin-Zugabe das Umkehrpotential gegenüber Standardbedingungen reduziert war, indiziert, dass in den HLE B-3 Zellen ein konstitutiv aktiver, nicht-selektiver Kationenkanal funktionell exprimiert wird. Die Auswärtsrektifikation des Stroms, und demnach die Verringerung der einwärtsgerichteten Stromkomponente, deutet auf eine asymmetrische Verteilung der am Stromfluss beteiligten Ionen in Bad- und Pipettenlösung hin. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war das für Cl^- und monovalente Kationen der Fall.

Umgekehrt verhielt es sich, als die Konzentration der monovalenten Kationen in der Pipettenlösung auf 30 mM reduziert wurde. Ionomycin aktivierte zunächst eine Leitfähigkeit

mit einem einwärtsrektifizierenden Strom-Spannungsverhältnis (Stufe 1). Der einwärtsgerichtete Ionenfluss war also stärker als der auswärtsgerichtete Fluss. Das Umkehrpotential stieg hierbei deutlich an. Mit 28 mV lag es knapp unter dem theoretischen Gleichgewichtspotential für monovalente Kationen von 40 mV, unterschied sich aber sehr stark von dem theoretischen Gleichgewichtspotential für Cl^- , das -39 mV betrug. Mit etwas Latenz stieg die Leitfähigkeit weiter an, das Umkehrpotential sank und die Einwärtsrektifikation flachte ab (Stufe 2). Dies sind Kennzeichen eines Leckstroms. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die erste Stufe des Effektes auf die Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals zurückzuführen ist. Die zweite Stufe hingegen basiert vermutlich auf einer Instabilität der Zellen unter den vorliegenden Lösungsbedingungen und folglich auf einem Verlust der Giga-Ohm-Dichtung zwischen Zelle und Pipette.

Zusammenfassend waren die Strom-Spannungsbeziehung und das Umkehrpotential des Ionomycin-induzierten Stroms abhängig von den Lösungsbedingungen der monovalenten Kationen, nicht jedoch der Cl^- -Ionen. Auch der Austausch von K^+ gegen Cs^+ zeigte keine Auswirkungen auf die Charakteristik des Stroms, der unter Normalbedingungen ein lineares Strom-Spannungsverhältnis besaß. Dem analysierten Ionenkanal liegt demnach ein spannungsunabhängiger, Ca^{2+} -aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal zugrunde. Da dieser Kationenkanal sowohl in der Zelllinie als auch in primären Linsenepithelzellen funktionell exprimiert wurde, stellt er kein Artefakt aus dem Immortalisierungsprozess der HLE B-3 Zellen dar und kann als physiologisch angesehen werden.

Ein Kationenkanal in Linsenepithelzellen, dessen Aktivierung die Anwesenheit von Ca^{2+} erfordert, wurde bislang lediglich von Cooper *et al.* (1990) beschrieben. Dieser Kanal wurde jedoch weder weitergehend charakterisiert noch seine physiologische Bedeutung interpretiert.

4.1.4 Genexpression verschiedener Ca^{2+} -aktivierter nicht-selektiver Kanäle in humanen Linsenepithelzellen

Generell ist die Anzahl der bislang identifizierten Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanäle überschaubar. Die meisten von ihnen sind Vertreter der TRP-Familie. Für TRPC3, TRPC5, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPML1 TRPP2 (PKD2L1) und TRPP1 (PKD2), das vermutlich als Heteromer mit PKD1 fungiert, wurde gezeigt, dass sie durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert werden (Zitt *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Hanaoka *et al.*, 2000; Koulen *et al.*, 2002; Launay *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009). All diese Kanäle sind zudem durchlässig für monovalente und, mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5, auch für divalente Kationen. Ein

weiteres Transmembranprotein, für das eine Kationen-leitende Funktion berichtet wurde, ist Ano6 (Yang *et al.*, 2012). Es gehört der Familie von Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanälen und Scramblasen, den Anoctaminen, an. Die genannten acht Proteine stehen nach dem aktuellen Stand der Forschung als mögliche Kandidaten für die molekulare Identifikation des gesuchten Ionenkanals zur Auswahl.

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass TRPC5- und TRPP2-mRNA weder in primären Linsenepithelzellen noch in HLE B-3 Zellen exprimiert sind, weshalb sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden können. TRPM5-mRNA wurde zwar in HLE B-3 Zellen detektiert; da sie jedoch nicht in den primären Zellen nachgewiesen werden konnte, ist die TRPM5-Expression vermutlich artifiziell. Wie bereits erwähnt exprimieren HLE B-3 Zellen eine Reihe von Proteinen, die sich nicht im nativen Linsenepithel finden (Wang-Su *et al.*, 2003). Beide Zelltypen exprimierten die mRNA von TRPC3, TRPM2, TRPM4, TRPML1 und PDK1/PKD2. Diese sechs Kandidaten wurden deshalb bei der weiteren Analyse berücksichtigt.

4.1.5 Biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften des Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals in humanen Linsenepithelzellen

Die Erstellung eines pharmakologischen Profils für den untersuchten Ionenkanal der Linsenepithelzellen sollte die Anzahl möglicher Kandidaten weiter eingrenzen (Tabelle - Anhang 8.1). Da für die Mehrheit der TRP-Kanäle und Anoctamine keine Kanalsubtypspezifischen inhibitorischen Substanzen zur Verfügung stehen, wurden Kationenkanalinhibitoren mit unterschiedlichen Wirkungsspektren getestet. Über ein Ausschlussverfahren wurden die am besten geeigneten Kandidaten ermittelt. Der Ionomycin-induzierte Kationenkanal wurde nicht von Rutheniumrot, DIDS und Spermin inhibiert. Die Zugabe von Rutheniumrot und DIDS führte zu einer leichten, aber signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Werten. $100 \mu\text{M La}^{3+}$ führten lediglich in 4 von 11 Zellen zu einer partiellen Inhibierung der Ionomycin-aktivierten Leitfähigkeit. In den verbleibenden sieben Zellen kam es zu keiner Reduktion, sondern tendenziell sogar zu einer Verstärkung des Stroms. Der nicht-selektive Ca^{2+} -aktivierte Kationenkanal war sensitiv gegenüber 2-APB, FFA, 9-Phenanthrol, Amilorid, Miconazol und $500 \mu\text{M La}^{3+}$. Der Stromrückgang nach Miconazol-Gabe erfolgte außergewöhnlich langsam, was möglicherweise auf Löslichkeitsprobleme der Substanz in der Badlösung zurückzuführen ist. Der unvollständige Rückgang des Umkehrpotentials nach Miconazol- und Amilorid-Zugabe bei gleichzeitiger Reduktion der Leitfähigkeit lässt auf die Beteiligung eines zweiten, Miconazol- und Amilorid-insensitiven Ionenkanals an der Membranleitfähigkeit schließen. Es

ergab sich damit ein biophysikalisches und pharmakologisches Profil für den analysierten Ionenkanal, das eine Reihe der verbliebenen Kandidaten (TRPML1, Ano6, TRPC3, TRPM2, TRPM4, TRPM5) ausschließt.

TRPML1 ist ein stark einwärtsrektifizierender Ionenkanal, sensitiv gegenüber Amilorid und La^{3+} , aber nicht gegenüber 2-APB (Dong 2008, Xu 2007, Zhang 2009). Er ist endogen in der Membran von Lysosomen, nicht jedoch in der Zytoplasmamembran lokalisiert (Cheng *et al.*, 2010). Ein Effekt durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ist vermutlich auf eine transiente Translokation in die Plasmamembran über Lysosomen zurückzuführen (LaPlante *et al.*, 2002). Es ist deshalb äußerst unwahrscheinlich, dass der hier untersuchte, Ca^{2+} -aktivierte Kationenstrom auf eine TRPML1-Aktivität zurückzuführen ist.

Ano6 ist im Gegensatz zu dem untersuchten Kanal auswärtsrektifizierend, insensitiv gegenüber Fenamaten und sensitiv gegenüber Rutheniumrot (Yang *et al.*, 2012). Es wird deshalb als Kandidat ausgeschlossen.

Eine ähnlich starke Beweislage liegt gegen TRPM5 vor. Nicht nur seine fehlende Expression in primären Linsenepithelzellen, auch seine biophysikalischen Eigenschaften eines stark auswärtsrektifizierenden Ionenkanals, seine Insensitivität gegenüber 9-Phenanthrol und Sensitivität gegenüber Spermin sprechen gegen TRPM5 (Prawitt *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2005; Grand *et al.*, 2008; Gonzales *et al.*, 2010).

Auch TRPM4 besitzt eine starke Auswärtsrektifikation und ist sensitiv gegenüber Spermin (Nilius *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2005). Weiterhin spricht der ausbleibende hemmende Effekt von DIDS auf den untersuchten Kanal gegen TRPM4, das durch DIDS inhibiert wird (Morita *et al.*, 2007). Trotz Gemeinsamkeiten der beiden Kanäle wie der Sensitivität gegenüber 9-Phenanthrol und FFA ist die Beweislast gegen TRPM4 deshalb so stark, dass es als Kandidat ausgeschlossen wird (Ullrich *et al.*, 2005; Grand *et al.*, 2008).

TRPC3 wird ebenfalls durch Ca^{2+} aktiviert. In diesem Zusammenhang zeigt es eine lineare Strom-Spannungsbeziehung (Zitt *et al.*, 1997). Wie auch der untersuchte Ionenkanal wird es inhibiert durch 2-APB, FFA und La^{3+} (Zhu *et al.*, 1998; van Rossum *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001). Gegen TRPC3 als gesuchten Ionenkanal in dieser Studie spricht allerdings, dass es von Rutheniumrot, nicht aber von $30\ \mu\text{M}$ 9-Phenanthrol gehemmt wird (Gonzales *et al.*, 2010; Lichtenegger *et al.*, 2013). Es ist damit als Kandidat unwahrscheinlich.

TRPP1 (auch Polycystin-2, PKD2), welches vermutlich als Heterodimer mit Polycystin-1 (PKD1) als nicht-selektiver Kationenkanal fungiert, besitzt ebenfalls eine lineare Strom-Spannungsbeziehung, wenn es durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert wird (Hanaoka *et al.*, 2000; Pelucchi *et al.*, 2006). Es ist sensitiv gegenüber den hier eingesetzten

Konzentrationen an 2-APB und Amilorid (González-Perrett *et al.*, 2001; Koulen *et al.*, 2002). Hanaoka *et al.* (2000) fanden eine dosisabhängige Sensitivität gegenüber Fenamaten. 50 μM NFA zeigten keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit des TRPP1-Stroms, 500 μM NFA reduzierten diesen jedoch stark. In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass La^{3+} eine partielle inhibierende Wirkung in einer Konzentration von 50 μM besitzt und 500 μM eine stärkere Reduzierung bewirken. In den Versuchen von Volk *et al.* (2003) hingegen reichten 100 μM La^{3+} nicht zur Reduzierung des Stroms aus; mit 1 mM La^{3+} wurde diese schließlich erreicht. TRPP1 zeigte demnach in verschiedenen Laboratorien kein identisches pharmakologisches Verhalten. Die Blockade des hier untersuchten Ionenkanals durch 100 μM FFA und die partielle Stromreduzierung durch 100 μM La^{3+} sprechen deshalb zwar gegen TRPP1, schließen es jedoch nicht gänzlich als Kandidaten aus.

TRPM2 ist ebenfalls bekannt für sein lineares Strom-Spannungsverhältnis, welches aus einer Spannungsunabhängigkeit resultiert. Es ist sensitiv gegenüber FFA und 2-APB (Hill *et al.*, 2004; Togashi *et al.*, 2008). Eine Sensitivität gegenüber Miconazol, die auch der untersuchte Ionenkanal aufwies, wurde bezüglich der hier aufgeführten Kandidaten lediglich für TRPM2 gezeigt (Togashi *et al.*, 2008). Eine weitere Besonderheit von TRPM2 ist, dass es insensitiv gegenüber 100 μM La^{3+} ist (Kraft *et al.*, 2004). In der vorliegenden Studie konnten 100 μM La^{3+} in den meisten Zellen den Ionomycin-induzierten Strom ebenfalls nicht reduzieren. Kontrovers ist jedoch die inhibierende Wirkung von 500 μM La^{3+} in HLE B-3 Zellen, welche Kraft *et al.* (2004) selbst bei Zugabe von 1 mM des Lanthanoids nicht beobachteten. Die Wirkung von La^{3+} auf TRPM2 scheint jedoch zell- oder Isoform-spezifisch zu sein. Denn im Gegensatz zu Kraft *et al.* (2004) identifizierten Herson *et al.* (1999) einen La^{3+} -sensitiven Ionenkanal, der in vielen weiteren Arbeiten TRPM2 zugeordnet wurde (Inamura *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2004; McNulty & Fonfria, 2005; Sumoza-Toledo & Penner, 2011). TRPM2 ist aufgrund der Vielzahl an Gemeinsamkeiten, insbesondere seiner Sensitivität gegenüber Miconazol, ein sehr viel versprechender Kandidat für den Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanal in humanen Linsenepithelzellen.

Zusammenfassend können aufgrund des Expressionsmusters der Linsenepithelzellen und der biophysikalischen sowie pharmakologischen Eigenschaften des untersuchten Ionenkanals die meisten aus der Literatur bekannten Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanäle ausgeschlossen werden. Die größten Übereinstimmungen weist der analysierte Ionenkanal mit TRPP2 und TRPM2 auf.

4.1.6 TRPM2-charakteristische Aktivierung des Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals durch H_2O_2

ROS appliziert in Form von H_2O_2 aktivierten mit einer Latenzzeit von einigen Minuten eine Leitfähigkeit in primären Linseneithelzellen und HLE B-3 Zellen. Die biophysikalischen Eigenschaften des H_2O_2 -induzierten Stroms glichen stark denen des Ionomycin-bedingten Stroms. Auswärts- und Einwärtsstrom stiegen gleichermaßen stark an und zeigten ein lineares Strom-Spannungsverhältnis. Eine weitere Gemeinsamkeit stellte die Sensitivität gegenüber FFA dar. Diese gemeinsamen Charakteristika lassen darauf schließen, dass beide Stimulanzien den gleichen, Ca^{2+} - und ROS-sensitiven Ionenkanal aktivieren. Ein Unterschied bestand jedoch in der Gesamtstromdichte, welche nach Ionomycin-Zugabe deutlich größer war als nach H_2O_2 -Applikation. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Ionomycin ein stärkerer Auslöser für den entsprechenden Ionenkanal ist als H_2O_2 . Möglich wäre auch die Aktivierung weiterer Ca^{2+} -aktivierter Ionenkanäle, die jedoch nicht durch ROS aktivierbar sind. Für die zweite Hypothese spricht, dass einige Inhibitoren (Amilorid, Miconazol, Rutheniumrot, DIDS) nur das Umkehrpotential, aber nicht die Gesamtstromdichte oder *vice versa* beeinflussten.

Bezüglich der zwei verbliebenen Kandidaten TRPP1 und TRPM2 wirkt H_2O_2 inhibierend auf TRPP1, das aufgrund dessen als gesuchter Ionenkanal ausgeschlossen wird (Montalbetti *et al.*, 2008). TRPM2 hingegen wird sowohl von H_2O_2 als auch einem intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg aktiviert (Wehage *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2009). Die lange Latenzzeit von mehreren Minuten bis zur H_2O_2 -bedingten Induzierung eines Stroms, der durch FFA inhibiert wird, steht im Einklang mit vergleichbar durchgeführten TRPM2-Untersuchungen von Naziroğlu *et al.* (2007) sowie Hill *et al.* (2004). Es wurde eine hohe Konzentration von 10 mM H_2O_2 gewählt, da dies die typischerweise verwendete Konzentration zur Stimulierung von endogen exprimiertem TRPM2 bei Patch-Clamp-Experimenten in der Ganzzell-Konfiguration ist (Herson *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2004; Naziroğlu *et al.*, 2007; Naziroğlu & Lückhoff, 2008; Bari *et al.*, 2009; Naziroğlu *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass die zur TRPM2-Aktivierung benötigte Menge an H_2O_2 von der Temperatur der Versuchslösungen abhängt und mit sinkender Temperatur steigt. Da die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, reagiert TRPM2 unter diesen Bedingungen wahrscheinlich weniger sensitiv auf H_2O_2 als bei Körpertemperatur (Togashi *et al.*, 2006; Wilkinson *et al.*, 2008; Bari *et al.*, 2009).

Der untersuchte Ionenkanal gleicht somit sowohl in seinen biophysikalischen als auch in seinen pharmakologischen Eigenschaften TRPM2 so stark wie kein anderer Ionenkanal.

4.1.7 Endogene Expression und Lokalisation von TRPM2 in Linseneithelzellen

Western Blots und immunzytochemische Färbungen von Linseneithelzellen bestätigten die Vermutung, dass es sich bei dem untersuchten Ionenkanal um TRPM2 handelt. Die Höhe der detektierten Proteinbanden deutet auf die Expression verschiedener TRPM2-Isoformen sowohl in HLE B-3 Zellen als auch primären Linseneithelzellen hin. Ähnlich wie in humanen arteriellen Lungen-Endothelzellen, in welchen ein TRPM2-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom eine Rolle bei entzündlichen Vorgängen spielt, zeigten auch die Linseneithelzellen eine dominante Expression der kurzen TRPM2-Isoform (95 kDa) sowie eine stabile Expression der unverkürzten TRPM2-Isoform (172 kDa) (Hecquet & Malik, 2009; Hecquet *et al.*, 2014). Weitere Banden wurden auf Höhe von 140 kDa sowie 120 kDa detektiert. Sie resultieren vermutlich aus der Expression weiterer TRPM2-Isoformen wie SSF-TRPM2, ΔC -TRPM2 und ΔN -TRPM2 oder Glykosylierungsprodukten. Eine genauere Differenzierung und Analyse der Funktion der verschiedenen Isoformen wurde nicht vorgenommen.

Anhand immunzytochemischer Färbungen konnte TRPM2 sowohl in der Zytoplasmamembran als auch in intrazellulären Kompartimenten der HLE B-3 Zellen lokalisiert werden. Das Ergebnis steht im Einklang mit Studien an pankreatischen β -Zellen, in denen TRPM2 sowohl in der Zellmembran als auch in lysosomalen Membranen zu finden ist (Lange *et al.*, 2009).

Es liegt somit eine sehr starke Beweislage dafür vor, dass TRPM2 endogen und funktionell in humanen Linseneithelzellen exprimiert wird und im aktivierten Zustand maßgeblich an der Leitfähigkeit und dem Membranpotential beteiligt ist.

4.1.8 Mögliche physiologische Rolle von TRPM2 im Linseneithel

In der Physiologie der Linse nehmen Ionenkanäle und -transporter eine wichtige Rolle ein. Ihre Hauptfunktion ist die Aufrechterhaltung der lentikulären Wasser- und Ionenhomöostase (Mathias *et al.*, 1997, 2007). Dies ist unabdingbar, um die Transparenz und somit die Funktion der Linse zu gewährleisten. Die Ionenkanäle und -transporter des Linseneithels sind dabei von besonderer Bedeutung. Das Linseneithel liefert die treibende Kraft, die für die Aufrechterhaltung der Ionengradienten und der Flüssigkeitszirkulation in der Linse über die Linsenfaserzellen benötigt wird (Fischbarg *et al.*, 1999; Bhat, 2001; Candia, 2004; Mathias *et al.*, 2007). Inwiefern TRPM2 an diesem Prozess beteiligt ist, bedarf einer tiefergehenden Untersuchung. Es könnte auf vielfältige Weise in die Regulierung der Ionenhomöostase und zellulärer Prozesse in der Linse eingebunden sein. Denn die Aktivierung von TRPM2 ist über ROS und einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg hinaus von

einer Reihe weiterer Substanzen und Faktoren abhängig. Zu diesen gehören Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Adenosindiphosphatribose (ADPR) und an der ADPR-Synthese beteiligte Faktoren des CD38- und des Poly(ADPR)-Polmyrase (PARP)-1-Signalwegs wie cADPR, Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) und Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) (Sumoza-Toledo & Penner, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). Diese Signalwege beziehungsweise -moleküle sind auch in die Regulierung des Ca²⁺-Haushalts und die Physiologie der Linse involviert (Counis *et al.*, 1985; Wride & Sanders, 1998; Churchill & Louis, 1998; Khoo & Chang, 1999; Smith *et al.*, 2016). Weiterhin ist TRPM2 nicht nur in der Zytoplasmamembran, sondern ebenfalls in der Membran von Lysosomen lokalisiert, aus denen es die Freisetzung von Ca²⁺ bewirkt (Lange *et al.*, 2009; Sumoza-Toledo & Penner, 2011; Sumoza-Toledo *et al.*, 2011). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung von TRPM2 in den Linseneithelzellen einen Ca²⁺-Einstrom über die Zytoplasmamembran und die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern vermittelt. Außerdem bewirkt seine Aktivierung eine Depolarisation der Zellmembran. Infolgedessen ist es in die Regulierung von Ca²⁺-Signalen und des Ca²⁺-Haushalts eingebunden und kann die Funktion des Linseneithels an spezifische Bedürfnisse anpassen. Ein Prozess, in den TRPM2 involviert sein könnte, ist die Differenzierung der Linseneithel- zu Linsenfaserzellen. Denn zu den Faktoren, welche die Differenzierung kontrollieren, zählt neben den TRPM2-Modulatoren TNF α und PARP-1 ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, an dem TRPM2 beteiligt sein könnte (Wride, 2011).

Ein überhöhtes Ca²⁺-Level in Linseneithelzellen ist assoziiert mit der Kataraktentstehung, speziell des kortikalen Typs, weshalb eine intakte Ca²⁺-Regulierung von immenser Bedeutung ist (Duncan & Bushell, 1975; Marcantonio *et al.*, 1986; Sanderson *et al.*, 2000; Jobling & Augusteyn, 2002).

4.1.9 Mögliche Rolle von TRPM2 bei der ROS-bedingten Kataraktogenese

TRPM2 könnte nicht nur in der Physiologie, sondern ebenfalls in der Pathologie der Linse eine Rolle spielen. Oxidativer Stress, der besonders mit zunehmendem Alter eine Belastung für die Linse darstellt, bewirkt eine erhöhte Permeabilität der Linseneithelzellmembranen für Kationen (Hightower *et al.*, 1989; Hightower & McCready, 1991; Sanderson & Duncan, 1993; Hightower, 1995; Duncan *et al.*, 1997; Cavallotti & Cerulli, 2008; Michael & Bron, 2011). Der resultierende Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt die Aktivierung der Cysteinprotease Calpain, die eine zentrale Rolle in der Entstehung kortikaler Katarakte einnimmt. Calpain degradiert wichtige strukturelle Linsenproteine (Kadoya *et al.*, 1993; Andersson *et al.*, 1998; Shearer *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Es

bewirkt außerdem die Aktivierung von Caspasen, was in den betroffenen Zellen Apoptose initiiert (McGinnis *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2004; Sharma & Rohrer, 2004; Reneker & Chen, 2010). Diese Prozesse führen zu einem Verlust der Integrität des Linsenepithels, woraus kataraktöse Veränderungen der peripheren Faserzellen resultieren (Azuma & Shearer, 1992; Li *et al.*, 1995; Spector, 1995; Kalariya *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2006).

In diesem Szenario bleibt die Frage offen, wie ROS die Membranpermeabilität der Epithelzellen erhöhen. Sanderson *et al.* (1999) vermuteten, dass hieran ein ROS-sensitiver nicht-selektiver Kationenkanal beteiligt ist. TRPM2 stellt einen vielversprechenden Kandidaten für einen solchen Ionenkanal dar. Es ist ein Ionenkanal, der sowohl für monovalente Kationen als auch für Ca^{2+} permeabel ist und sich durch ROS aktivieren lässt (Wehage *et al.*, 2002; Sumoza-Toledo & Penner, 2011). Es wurde außerdem an Lungen- und Gefäßendothelzellen, Monozyten und dopaminergen Neuronen gezeigt, dass ein TRPM2-medierter Ca^{2+} -Einstrom die Aktivität von Calpain und Caspasen pathologisch erhöht (Zhang *et al.*, 2006; Hecquet & Malik, 2009; Sun *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Hecquet *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016). Das trifft auch auf den ROS-sensitiven Kationenkanal in der Linse zu (Sanderson *et al.*, 1999; Rhodes & Sanderson, 2009).

Zusammenfassend ist bei der Kataraktogenese eine Signalkaskade (Abbildung 4.2) denkbar, in der TRPM2 als Sensor für Stressfaktoren wie oxidativen Stress aktiviert wird und dieses über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} als Signal an das Innere der Zelle weitergibt. Der Ca^{2+} -Einstrom, sich möglicherweise durch die Ca^{2+} -Sensitivität von TRPM2 selbst verstärkend, steigert die Aktivität von Calpain. Calpain wiederum degradiert Proteine oder setzt durch Aktivierung von Caspasen den Apoptoseapparat in Gang, wodurch es zu kataraktösen Veränderungen kommt.

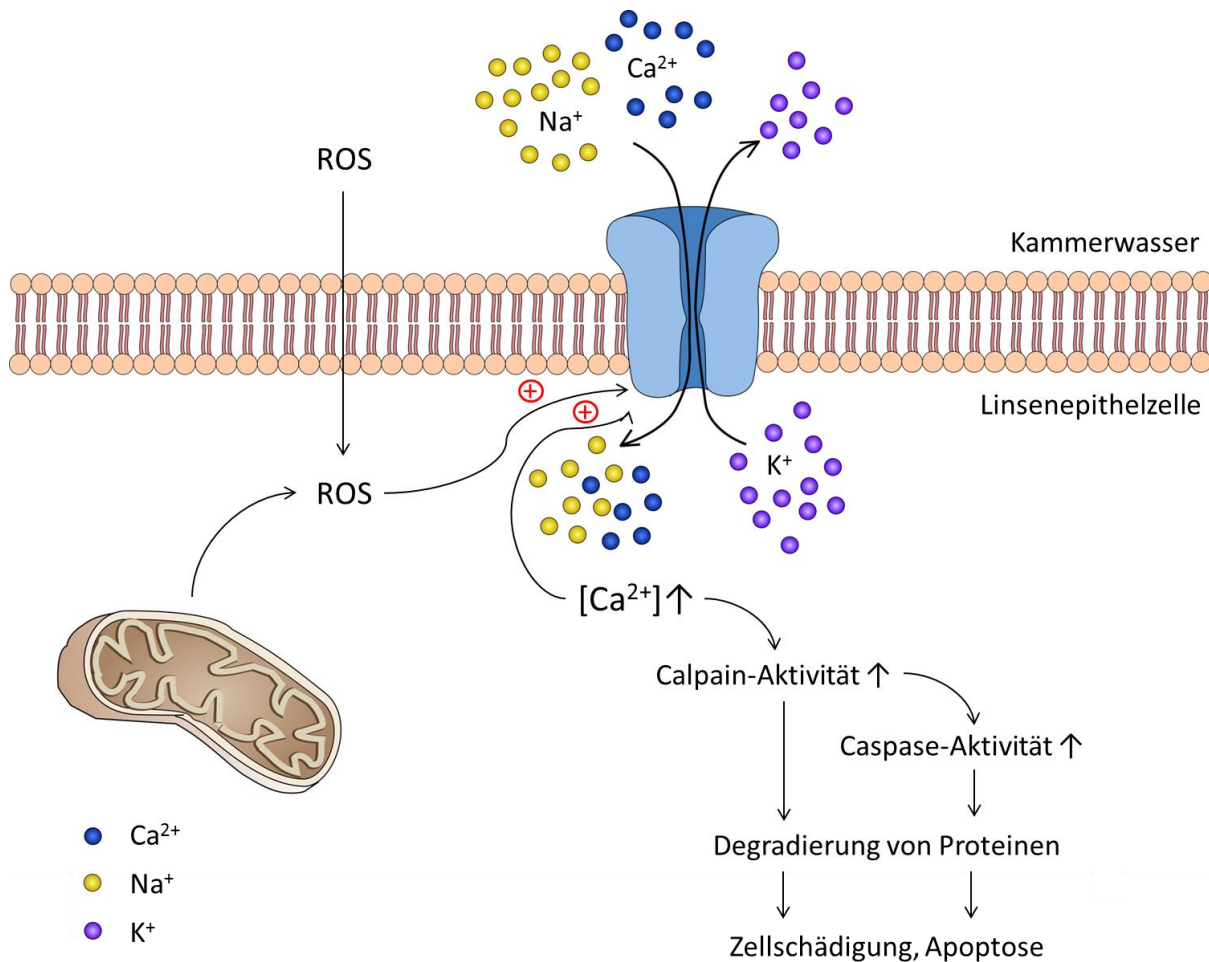


Abbildung 4.2: Mögliche Rolle von TRPM2 in der Pathogenese ROS-bedingter Katarakte. Die Zusammenhänge sind stark vereinfacht dargestellt.

4.1.10 Erhöhte TRPM2-Expression und Ionomycin-induzierte Leitfähigkeit in HLE B-3 Zellen durch TGF β 2

Nach einer Behandlung der HLE B-3 Zellen mit TGF β 2 zeigten diese Zellen eine mehr als vierfach erhöhte Expression der TRPM2-mRNA verglichen mit unbehandelten HLE B-3 Zellen. Außerdem war der TRPM2-assoziierte Strom in den TGF β 2-vorbehandelten HLE B-3 Zellen deutlich, jedoch nicht gänzlich signifikant erhöht ($p = 0,052$). Die hochregulierte TRPM2-Genexpression scheint demnach einen Effekt auf die Membranleitfähigkeit auszuüben, der im Verhältnis zur Hochregulierung allerdings eher schwach ausfällt. Es ist aber vorstellbar, dass die erhöhte Expression Agonist-induzierte Ca^{2+} -Antworten beeinflusst. Die Heterogenität der Gesamtstromdichte des Ionomycin-induzierten Stroms erschwert jedoch konkrete Beurteilungen, weshalb die Endzahl des Experiments erhöht werden sollte.

Es ist denkbar, dass die Hochregulierung des ROS-sensitiven TRPM2 durch TGF β 2 zu einer erhöhten Sensitivität der Linsenepithelzellen gegenüber oxidativem Stress mit den entsprechenden Folgen führt. Zudem beeinflussen sich TGF β und H_2O_2 gegenseitig. In

Linseneithelzellen führt TGF β zu einer verstärkten Produktion von ROS mit dem Resultat der Apoptose, und Antioxidantien unterdrücken kataraktöse Erscheinungen nach TGF β 2-Exposition (Rao *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007; Chamberlain *et al.*, 2009). Im Gegenzug unterdrücken TGF β 2-neutralisierende Antikörper die H₂O₂-bedingte Apoptose (Cao *et al.*, 2009). ROS bewirken in der Linse außerdem eine verstärkte Expression und Aktivierung von TGF β (Fatma *et al.*, 2005, 2009).

Diese Interaktion erklärt möglicherweise, weshalb Hales *et al.* Veränderungen in TGF β 2-behandelten Linsen fanden, die der kortikalen und hinteren subkapsulären Katarakt entsprachen (Hales *et al.*, 1999). Während bekannt ist, dass TGF β die EMT auslöst, die zur postoperativen und der vorderen subkapsulären Katarakt führt, wurde es bislang nicht im Zusammenhang mit altersbedingten Katarakten diskutiert. ROS sind hingegen prominente Faktoren dieser Kataraktformen. Aufgrund des Zusammenspiels von ROS und TGF β ist anzunehmen, dass TGF β auch eine Rolle bei den ROS-bedingten, senilen Katarakten spielt. Vermutlich geschieht das über einen Mechanismus, der unabhängig von dem der EMT ist. Yang *et al.* vermuteten bereits, dass der TGF β -induzierten Apoptose und EMT, die beide mit Katarakten assoziiert werden, unterschiedliche Signalwege zugrunde liegen. Sie zeigten, dass Caspase-Hemmer die TGF β -induzierte Apoptoserate, aber nicht die EMT reduzieren (Yang *et al.*, 2006).

Aus der Interaktion von ROS und TGF β könnte ein Teufelskreis resultieren, in den TRPM2 involviert ist (Abbildung 4.3): Oxidativer Stress führt in der Linse zu einer verstärkten Expression und Aktivierung von TGF β - und seiner Signalkaskade und umgekehrt werden durch TGF β vermehrt ROS generiert (Rao *et al.*, 2004; Fatma *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2007; Chamberlain *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2016); TGF β reguliert die TRPM2-Expression hoch, was wiederum die Sensitivität der Linseneithelzellen gegenüber ROS erhöht. Der TRPM2-medierte Ionenfluss bedingt einen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg. Das wirkt sich wiederum verstärkend auf die Aktivität des Ca²⁺-abhängigen TRPM2 aus, hat also eine positive Rückkopplung auf den TRPM2-bedingten Ca²⁺-Einstrom zur Folge (McHugh *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2007). Die Calpain- beziehungsweise Caspase-Kaskade wird aktiviert. Dies führt zu Proteindegradationen und einer erhöhten Apoptoserate (Kadoya *et al.*, 1993; Tamada *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Die erhöhte Membranpermeabilität und gestörte Ionenhomöostase durch die erhöhte TRPM2-Aktivität könnte zudem das Membranpotential der Linseneithelzellen erhöhen und weitere Störungen in den Zellen hervorrufen.

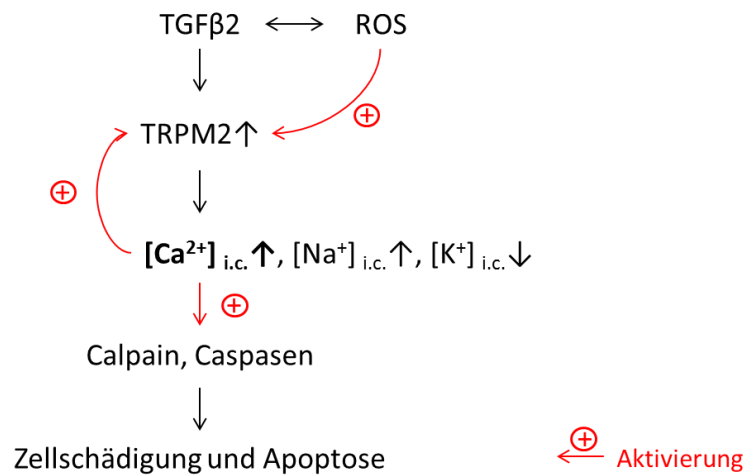


Abbildung 4.3: Hypothetischer Mechanismus, über den die TGFβ2-bedingte Hochregulierung von TRPM2 in die Pathogenese ROS-bedingter Katarakte eingebunden sein könnte.

4.2 Ano2 im RPE

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der molekularen Identifikation eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals (CaCC) in Zellen des retinalen Pigmentepithels. Ein solcher Kanal wurde in verschiedenen Spezies beobachtet. Er ist auf der basolateralen Seite des RPE lokalisiert und ihm wird eine Rolle in der Anpassung des Cl^- -getriebenen transepithelialen Wassertransport des RPE zugeschrieben (Ueda & Steinberg, 1994; Strauss *et al.*, 1996, 1999; Peterson *et al.*, 1997; Hartzell & Qu, 2003; Marmorstein *et al.*, 2006). Die Untersuchungen zu seiner molekularen Identität führten jedoch bislang ins Leere. Vor wenigen Jahren wurden die Anoctamine entdeckt, eine Familie von Ionenkanälen, die Vertreter der CaCCs beinhaltet (Galiotta, 2009; Pedemonte & Galiotta, 2014). Insbesondere Ano2 stellt einen vielversprechenden Kandidaten für den CaCC im RPE dar.

4.2.1 Aktivierung einer Anionenleitfähigkeit durch ATP in ARPE-19 Zellen

Als Zellmodell des RPE wurden in dieser Studie ARPE-19 Zellen untersucht, eine häufig verwendete und entsprechend gut charakterisierte Zelllinie humaner Zellen des RPE. In diesen Zellen führte extrazellulär appliziertes ATP zu einem transienten Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} . Dies konnte bereits an primären RPE-Zellen bestätigt werden und wird mit der Aktivierung ATP-abhängiger P2-Rezeptoren wie dem metabotropen P2Y2-Rezeptor erklärt, welche in Zellen des RPE funktionell exprimiert werden (Peterson *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1999; Fries *et al.*, 2004; Reigada *et al.*, 2005). ATP wird vom nativen RPE sezerniert und gelangt in den subretinalen Bereich, wodurch es P2Y2-Rezeptoren der apikalen RPE-Membran aktiviert. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel steigt,

CaCCs werden aktiviert und schließlich vermehrt Flüssigkeit aus dem subretinalen Raum zur Chorioidea transportiert (Mitchell, 2001; Wimmers *et al.*, 2007; Mitchell & Reigada, 2008). ATP ist deshalb der physiologische Stimulus des bislang nicht molekular identifizierten basolateralen CaCC und geeignet zur Untersuchung dieses Ionenkanals (Peterson *et al.*, 1997; Wimmers *et al.*, 2007).

Die ATP-bedingte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in den ARPE-19 Zellen ging einher mit einer zweiphasigen Stromantwort. Da in K^+ -freien Lösungen gearbeitet wurde, konnte eine Beteiligung von K^+ -Strömen von vorneherein ausgeschlossen werden. Anhand der Umkehrpotentiale unter asymmetrischen und symmetrischen intra- und extrazellulären Cl^- -Konzentrationen konnte der Stromantwort eine Kationenleitfähigkeit und eine zeitverzögerte Anionenleitfähigkeit zugeordnet werden. Der Kationenkanal zeigte eine leichte Einwärtsrektifikation, wurde allerdings meist durch die auswärtsrektifizierende Anionenleitfähigkeit überlagert. Einen Kationenkanal mit vergleichbaren Eigenschaften beobachteten bereits Ryan *et al.* (1999) und vermuteten die Beteiligung eines P2X-Purinozeptor-Subtyps, der als ATP-aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal fungiert.

Die zeitverzögerte zweite Phase der Stromantwort bestand aus einer auswärtsrektifizierenden Leitfähigkeit. Beim Wechsel von asymmetrischen, also einer intrazellulär niedrigeren Cl^- -Konzentration als extrazellulär, auf symmetrische Cl^- -Bedingungen verschob sich das Umkehrpotential zu positiveren Werten. Gemeinsam mit dem Wegfall der auswärtsrektifizierenden Stromkomponente beim Absenken der extrazellulären Cl^- -Konzentration deutet dies auf einen Cl^- -Strom hin. Dennoch weicht das Umkehrpotential unter asymmetrischen Cl^- -Bedingungen mit -11 mV stark vom berechneten Gleichgewichtspotential von -39 mV für Cl^- -Ionen ab. Eine mögliche Erklärung ist, dass der ATP-aktivierte Kationenkanal, vermutlich unter Beteiligung konstitutiv aktiver Kationenkanäle wie TRPC1/4, das Umkehrpotential zu positiven Werten hin verschiebt (Wimmers & Strauss, 2007). Eine ähnliche Beobachtung machten Hartzell und Qu (2003) bei Untersuchungen eines CaCC am *Xenopus*-RPE.

Mithilfe von Substanzen, die spezifisch inhibitorische Effekte auf unterschiedliche Cl^- -Kanalsubtypen besitzen, wurde der auswärtsrektifizierende Strom näher untersucht und identifiziert. Eingesetzt wurden die Cl^- -Kanalinhibitoren NFA, DIDS, $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ sowie $\text{T16A}_{\text{inh}}\text{-A01}$.

In Anwesenheit des unspezifischen Cl^- -Kanalinhibitors NFA aktivierte ATP eine dominante einwärtsrektifizierende Leitfähigkeit mit einem stark erhöhten Umkehrpotential.

Dieser einwärtsrektifizierende Strom maskierte andere mögliche Ströme. Eine Aussage über den Effekt von NFA auf den auswärtsrektifizierenden Strom ist deshalb nicht möglich.

DIDS ist ebenfalls ein unspezifischer Cl⁻-Kanalinhibitor. Extrazellulär appliziert legt es sich von außen in die Pore des Cl⁻-Kanals, wodurch es Cl⁻-Ionen am Einstrom in die Zelle, jedoch nicht am Ausstrom hindert. Somit hemmt es lediglich die auswärtsgerichtete Komponente des Cl⁻-Stroms (nach Vorzeichenkonvention, Kapitel 2.7.1.8). Diese Wirkung zeigte es auch auf den ATP-induzierten Auswärtsstrom der ARPE-19 Zellen. Neben der Hemmung von Cl⁻-Kanälen wäre ein weiterer möglicher Wirkmechanismus, dass DIDS durch Inhibierung von P2Y- und P2X-Purinozeptoren den zur CaCC-Aktivierung benötigten intrazellulären Ca²⁺-Anstieg unterbindet (Evans *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1997). Da lediglich der Auswärtsstrom, nicht jedoch der Einwärtsstrom reduziert wurde, ist aber eine direkte Inhibierung der Cl⁻-Kanäle wahrscheinlich.

CaCC_{inh}-A01 ist ein etablierter Inhibitor von CaCCs (Fuente *et al.*, 2008; Barro-Soria *et al.*, 2008; Almaça *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Pineda-Farias *et al.*, 2015; Cherkashin *et al.*, 2016). Die inhibitorische Wirkung von CaCC_{inh}-A01 auf den ATP-induzierten Auswärtsstrom in den ARPE-19 Zellen verstärkt die Beweislage, dass dem Strom ein CaCC zugrunde liegt.

Der letzte getestete Blocker war T16A_{inh}-A01. Die Substanz wurde entwickelt, um spezifisch Ano1, einen CaCC, zu inhibieren. In Abhängigkeit von der untersuchten Spezies und Ano1-Isoform hemmen 10 µM T16A_{inh}-A01 den Ano1-Strom partiell oder vollständig. Ob der Inhibitor auch Ano2, welches ebenfalls ein CaCC ist, hemmt, ist umstritten, da verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Ergebnisse erzielten (Namkung *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015; Cherkashin *et al.*, 2016). Bei einer eigenen Überprüfung zeigte T16A_{inh}-A01 keine Wirkung auf den Strom von heterolog exprimiertem murinen Ano2 (Anhang – Kapitel 8.2). In ARPE-19 Zellen konnte T16A_{inh}-A01 den untersuchten CaCC nicht hemmen.

Die pharmakologischen Untersuchungen bestätigen die Annahme, die aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften des ATP-aktivierten auswärtsrektifizierenden Stroms gewonnen wurde. Die Aktivierung des Kanals durch ATP sowie seine Hemmung durch DIDS und CaCC_{inh}-A01 zeigen, dass es sich um einen CaCC handelt. Der CaCC zeigte bei Depolarisation der ARPE-19 Zellen eine Auswärtsrektifikation und eine zeitabhängige Aktivierungskinetik. Seine pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften sind vergleichbar mit den Eigenschaften von CaCCs, die von anderen Arbeitsgruppen in primären RPE-Zellen verschiedener Spezies beschrieben wurde (Ueda & Steinberg, 1994; Strauss *et*

al., 1996; Peterson *et al.*, 1997; Hartzell & Qu, 2003; Schreiber & Kunzelmann, 2016). Hier sei insbesondere auf die Sensitivität des untersuchten Ionenkanals auf DIDS hingewiesen. DIDS wurde in vielen *in situ* Experimenten zum Elektoretinogramm (ERG) angewandt, um die Rolle von Cl⁻-Kanälen im RPE zu untersuchen (Gallemore & Steinberg, 1989; Miller & Edelman, 1990; Joseph & Miller, 1991; Fujii *et al.*, 1992; Gallemore *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1997).

In der Literatur wurden zwei CaCCs beschrieben, die eine Vielzahl der genannten Merkmale aufweisen. Dies sind die bereits erwähnten Ano1 und Ano2. Beide sind Vertreter der Anoctamine, einer Ca²⁺-abhängigen Ionenkanalfamilie in Säugetierzellen (Pedemonte & Galletta, 2014). Beide werden auf mRNA-Ebene auch im nativen humanen RPE exprimiert (Schreiber & Kunzelmann, 2016).

Heterolog sowie endogen exprimiertes Ano2 wurde in zahlreichen Studien als CaCC identifiziert. Ano2-Ströme besitzen eine Auswärtsrektifizierung und eine moderat langsame Aktivierungskinetik. In Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration erreichen sie ihre maximalen Werte innerhalb eines zweistelligen Millisekunden-Bereichs. Ano2-Ströme sind sensitiv gegenüber NFA, DIDS und CaCC_{inh}-A01 (Pifferi *et al.*, 2009; Sagheddu *et al.*, 2010, 2010; Namkung *et al.*, 2011; Billig *et al.*, 2011; Scudieri *et al.*, 2013; Cruz-Rangel *et al.*, 2015; Cherkashin *et al.*, 2016). In all diesen Eigenschaften stimmen Ano2 und der hier untersuchte Ionenkanal überein. In der vorliegenden Studie wurde außerdem gezeigt, dass ARPE-19 Zellen Ano2-mRNA exprimieren.

Eine Expression von Ano1-mRNA in ARPE-19 Zellen konnte hingegen nicht bestätigt werden. Wie Ano2 ist Ano1 ein auswärtsrektifizierender CaCC. Es ist sensitiv gegenüber NFA, DIDS, CaCC_{inh}-A01 und auch gegenüber T16A_{inh}-A01 (Bradley *et al.*, 2014). In dieser letzten Eigenschaft widerspricht es dem CaCC in den ARPE-19 Zellen. Es bestehen jedoch auch Unterschiede zwischen den biophysikalischen Eigenschaften von Ano1 und dem untersuchten CaCC. Zum einen besitzt Ano1 eine stärkere Auswärtsrektifizierung, zum anderen eine deutlich langsamere Aktivierungskinetik. Die zum Erreichen maximaler Stromwerte benötigte Zeit beträgt für Ano1 abhängig von der Ca²⁺-Konzentration mehrere hundert Millisekunden (Schroeder *et al.*, 2008; Manoury *et al.*, 2010; Scudieri *et al.*, 2013; Cruz-Rangel *et al.*, 2015). Ano1 vermittelt demnach nicht den untersuchten Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Strom in ARPE-19 Zellen. Es kann aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass es an der Anionenleitfähigkeit mitwirkt.

Der CaCC in den ARPE-19 Zellen zeigt demnach die größte Übereinstimmung mit Ano2, das in diesen Zellen auch exprimiert wird. In den weiteren Versuchen wurde sich auf

Ano2 konzentriert, da es nach dem aktuellen Stand der Literatur den am besten geeigneten Kandidaten darstellt.

4.2.2 Endogene Ano2-Expression im RPE

Über RT-PCR-Versuche wurde im Rahmen dieser Arbeit die Genexpression von Ano2 außer in ARPE-19 Zellen auch im nativen RPE der Maus, Ratte und einer Primatenart gezeigt. Schreiber und Kunzelmann (2016) detektierten außerdem Ano2-mRNA im nativen RPE von Schwein, Rind und Mensch.

Immunhistochemische Färbungen, die von Dr. Nadine Reichhart durchgeführt und zur Verfügung gestellt wurden, bestätigen die Befunde der RT-PCR-Versuche auf Proteinebene. Sie zeigen eine Ano2-spezifische Färbung in ARPE-19 Zellen, nativen murinen RPE-Zellen und einem sagittalen Schnitt der murinen Retina. Das Ano2-spezifische Signal des Retinaschnitts ist in der äußeren plexiformen Schicht, wie es bereits von Stöhr *et al.* (2009) berichtet wurde, sowie auf der basolateralen Seite des RPE lokalisiert. Dort wird ebenfalls der gesuchte CaCC vermutet (Wimmers & Strauss, 2007). Es tritt zudem ein Signal in den Photorezeptoraußensegmenten auf. Da dieses jedoch auch in einer Färbung erscheint, in der nur Sekundärantikörper ohne vorherige Inkubation mit Primärantikörper eingesetzt wurde, stellt es ein falsch positives Signal dar. In den primären RPE-Zellen und den ARPE-19 Zellen ist ein besonders starkes Ano2-Signal in der Zytoplasmamembran zu finden.

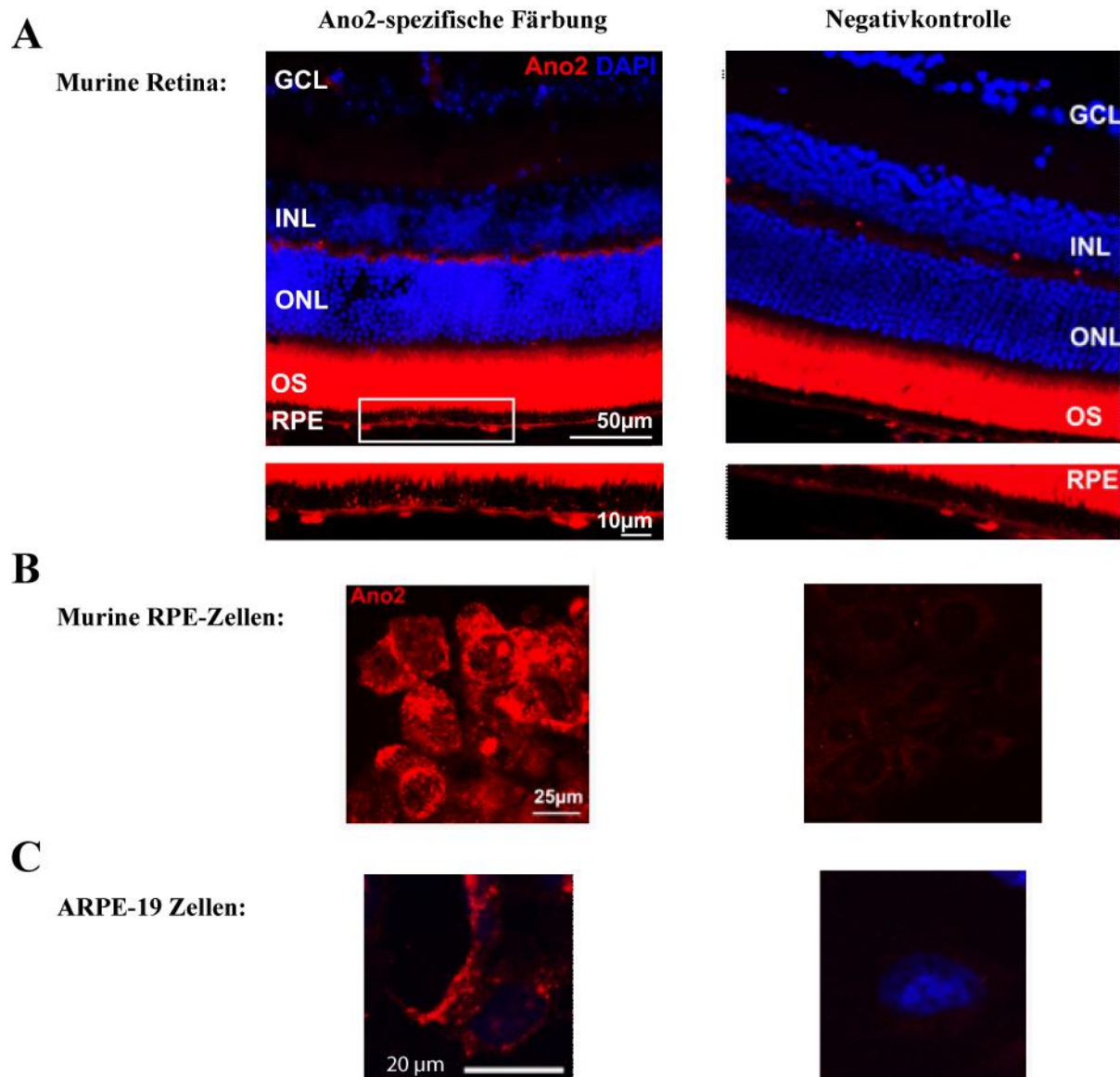


Abbildung 4.4: Expression von Ano2 im RPE (bereitgestellt von Dr. N. Reichhart, 2016). A: Immunfärbung eines sagittalen Retinaschnitts der Maus gegen Ano2 (links) und ohne primären Antikörper (rechts). B: Immunfärbung primärer RPE-Zellen der Maus gegen Ano2 (links) und ohne primären Antikörper (rechts). C: Immunfärbung von ARPE-19Zellen gegen Ano2 (links) und ohne primären Antikörper (rechts). Für alle Färbungen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Ano2 (MABN641; Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. GCL: Ganglienzellschicht; INL: innere Körnerschicht; ONL: äußere Körnerschicht; OS: Photorezeptoraußensegmente; RPE: retinales Pigmentepithel.

4.2.3 Reduzierte Anionenleitfähigkeit durch Herunterregulierung von Ano2

Die Transfektion der ARPE-19 Zellen mit Ano2-spezifischer siRNA führte zu einer Herunterregulierung von Ano2 auf mRNA- und Proteinebene. Im Western Blot zeigte der kommerzielle Antikörper gegen Ano2 von Alomone Labs die Färbung mehrerer Banden. Zur Auswertung der siRNA-Effekte zur Herunterregulation der Ano2-Expression wurde eine Bande der Größe 90 kDa herangezogen, da diese Bande die beständigste unter den Banden

war und den Angaben des Herstellers entsprach. Banden, die eine höhere Molekülmasse als 90 kDa anzeigten, könnten Glykosylierungsprodukte des Kanals sein; Produkte mit Molekülmassen unter 90 kDa sind eher unspezifische Färbungen des Alomone Antikörpers oder Fragmente des Kanalproteins, die durch Destabilisierung während der Proteinlyse und dem Transfer entstehen. Die prognostizierte Länge von Ano2 beträgt für die bekannteste Isoform, Isoform 1, 1003 Aminosäuren mit einem entsprechenden Gewicht von 114 kDa (NCBI Referenzsequenz NP_001265525). Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Werte ist, dass eine verkürzte, aber dennoch funktionstüchtige Isoform des Proteins in den ARPE-19 Zellen exprimiert wird. In der Datenbank des NCBI finden sich für *Homo sapiens* verschiedene prognostizierte Ano2-Isoformen, die im Vergleich zur Isoform 1 verkürzt sind. Ihre Signifikanz ist bislang aber nicht untersucht worden. Die Herunterregulierung durch siRNA des Ano2-Proteins betrug rund 40 %. Da etwa 75 % der ARPE-19 Zellen erfolgreich transfiziert worden waren (Anhang - Kapitel 8.3), war Ano2 in diesen Zellen um über 50 % herunterreguliert. Dementsprechend waren die ATP-induzierten Anionenströme in siRNA-transfizierten ARPE-19 Zellen um etwa 50 % kleiner als in den Zellen, die mit scrambled-siRNA transfiziert wurden. Folglich beruht die Anionenleitfähigkeit auf der Expression und Aktivität von Ano2. Ein falsch positives Ergebnis durch eine allgemeine Leitfähigkeitserhöhung nach Transfektion mit scrambled-siRNA wurde ausgeschlossen, indem Kontrollexperimente mit siAno4-transfizierten ARPE-19 Zellen durchgeführt wurden. Diese besaßen eine Anionenleitfähigkeit, die vergleichbar mit derjenigen der scrambled-siRNA transfizierten Zellen war. Dies bestätigt, dass die geringere Anionenleitfähigkeit auf der Herunterregulierung von Ano2 beruht. Lediglich die Ano2-spezifische siRNA, nicht aber die eines anderen Anoctamins, Ano4, konnte die CaCC-Aktivität verringern.

4.2.4 Ano2-Strom in ARPE-19 Zellen unter physiologischen intrazellulären Bedingungen

Im konventionellen Modus der Ganzzell-Konfiguration wird das Zytoplasma der Zellen nahezu vollständig durch die Pipettenlösung ersetzt. Die eingesetzten Pipettenlösungen sind in ihrer Ionenzusammensetzung meist dem intrazellulären Milieu der untersuchten Zellen angepasst, was auch in dieser Studie der Fall war. Einer definierten und konstanten Ca^{2+} -Konzentration kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da bereits leichte Veränderungen zu komplexen Wirkungen durch den universellen intrazellulären Signalüberträger Ca^{2+} führen können. Die physiologische intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration liegt bei etwa 100 nM. Um eine definierte Ca^{2+} -Konzentration zu gewährleisten, wird der Pipettenlösung häufig der Ca^{2+} -Chelator EGTA hinzugefügt. Dies geschah auch in dieser Studie. Die Zugabe von EGTA

kann aber insbesondere bei der Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse zu Problemen führen. Wenn die Reaktion der Zellen auf eine Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} als *second messenger* untersucht werden soll, kann EGTA Ca^{2+} im Zytosol abfangen und dieses entsprechend seine Wirkung verfehlen. Allerdings gibt es Bereiche in der Zelle, die EGTA nicht erreicht. Hier kann es zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kommen, obwohl die Pipettenlösung EGTA enthält. Durch die Zugabe von Kationenionophoren wie Nystatin zur Pipettenlösung sind Ganzzelleableitungen möglich, ohne dass das intrazelluläre Milieu der Zellen maßgeblich beeinflusst wird. Nystatin leitet lediglich monovalente Kationen, wohingegen divalente Kationen zurückgehalten werden. Es findet kein direkter Austausch der Pipettenlösung mit dem Zytosol statt, das deshalb weitestgehend unangetastet bleibt; und dennoch ist eine elektrische Verbindung zwischen dem Zellinneren und der Elektrode vorhanden. Diese Methode wird Perforated-Patch-Clamp genannt.

In dieser Studie wurde ATP als physiologischer Stimulus zur Aktivierung und Untersuchung eines CaCC verwendet. Eine Wirkung von ATP ist, dass es zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt. Im Perforated-Patch-Modus führte die ATP-Zugabe zu einer vergleichbaren Stromreaktion in ARPE-19 Zellen, wie sie im konventionellen Ganzzell-Modus beobachtet wurde. Der Anstieg des Auswärtsstroms konnte durch $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ reduziert werden. Das bekräftigt die Hypothese, dass die Aktivierung der Cl^- , also der Ano2-Leitfähigkeit durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung ausgelöst wird.

Der Auswärtsstrom nach einer zweiten alleinigen Applikation von ATP war gegenüber dem nach erster ATP-Zugabe nicht vermindert. Im Gegensatz zu den Versuchen im konventionellen Ganzzellmodus ist im Perforated-Patch-Modus eine bessere Wiederholbarkeit der Ca^{2+} -abhängigen Prozesse gegeben, ein bekannter Vorteil des Perforated-Patch-Modus (Akaike & Harata, 1994). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im konventionellen Ganzzell-Modus zu einem verminderten Anstieg an intrazellulärem freiem Ca^{2+} nach ATP-Zugabe kommt. Die Ursache hierfür könnte eine Komplexbildung von Ca^{2+} durch EGTA sein. Das betrifft insbesondere den Ca^{2+} -Anstieg nach der zweimaligen Zugabe von ATP. Denn EGTA bindet vermutlich Ca^{2+} , das nach einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol freigesetzt wurde. EGTA hindert Ca^{2+} damit an der Wiederaufnahme in die Speicher, sodass nach einer zweiten ATP-Zugabe weniger Ca^{2+} freigesetzt werden kann und die Ca^{2+} -abhängigen Effekte schwächer ausfallen.

4.2.5 Ano2-artige Anionenleitfähigkeit im nativen RPE

Die in diesem Teil der Arbeit verwendete humane RPE-Zelllinie ARPE-19 besitzt viele strukturelle und funktionelle Eigenschaften nativer humaner RPE-Zellen. Sie ist deshalb

geeignet für *in vitro* Untersuchungen des humanen RPE (Dunn *et al.*, 1996). Mit fortschreitender Dauer des Kultivierungsprozesses und in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen kann es aber zu Veränderungen der ARPE-19 Zellen kommen. Diese Veränderungen betreffen beispielsweise die veränderte Expression verschiedener Gene, einen Verlust der Pigmentierung, die Zellmorphologie sowie reduzierte sekretorische Fähigkeiten (Tian *et al.*, 2005; Alge *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; Mannermaa *et al.*, 2010; Ablonczy *et al.*, 2011; Kuznetsova *et al.*, 2014). Die Eignung der ARPE-19 Zellen für die präsenste Studie wurde deshalb in einem Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften mit nativen RPE-Zellen überprüft. Die Wiederholung der grundlegenden Versuche an primären Zellen des Maus-RPE zeigte, dass diese mit einer zweiphasigen Stromantwort auf eine ATP-Zugabe reagierten, die vergleichbar mit der der ARPE-19 Zellen war. Der Auswärtsstrom wurde aufgrund seiner Sensitivität gegenüber $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ als CaCC identifiziert. Mit seiner zeitabhängigen Aktivierungskinetik und Auswärtsrektifizierung teilt er weitere markante Eigenschaften des Ano2 -Stroms in ARPE-19 Zellen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen verschiedener Arbeitsgruppen (Strauss *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1997; Hartzell & Qu, 2003; Schreiber & Kunzelmann, 2016).

Cl^- -Kanäle in der basolateralen Membran des RPE sind von großer Bedeutung für den Ionen- und Wasserhaushalt des RPE und der Retina. Zum einen regulieren sie das zelluläre Volumen der RPE-Zellen, zum anderen den transepithelialen Flüssigkeitstransport und somit das extrazelluläre Volumen, also das Volumen des subretinalen Raums. Ein wichtiger Bestandteil der Cl^- -Leitfähigkeit ist der basolateral exprimierte CaCC . Ihm wird in der Feinjustierung des Wasser- und Ionenhaushalts von RPE und Retina eine wichtige Rolle zugeschrieben, weshalb seine molekulare Identifizierung Gegenstand früherer Studien war. Zwischenzeitlich stand Bestrophin-1 (Best1) im Zentrum dieser Untersuchungen. Bestrophine sind eine Familie von CaCC . Die biophysikalischen Eigenschaften der Bestrophine der Säugetiere unterscheiden sich jedoch von denen des CaCC der RPE-Zellen in Säugetieren (Sun *et al.*, 2002; Tsunenari *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2004). Best1-Ströme besitzen beispielsweise eine sehr viel schnellere Aktivierungskinetik und ihr Strom-Spannungsverhältnis ist nicht auswärtsrektifizierend, sondern fast linear. Zudem legen funktionelle Daten aus Studien des endogen exprimierten Best-1 nahe, dass ein wichtiger Anteil im Zytosol lokalisiert ist (Neussert *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2013). Best1-Knockout-Mäuse zeigen weder eine reduzierte Cl^- -Leitfähigkeit noch einen reduzierten Light Peak im dc-ERG. Stattdessen ist der Light Peak sogar verstärkt (Marmorstein *et al.*, 2006). Eine Beteiligung von Best1 an der basolateralen Cl^- -Leitfähigkeit des RPE ist demnach, falls

überhaupt vorhanden, vernachlässigbar gering. Es wird allerdings vermutet, dass Best1 eine Rolle bei der Regulierung anderer Ionenkanäle spielt, die einen Einfluss auf das Ca^{2+} -Level ausüben, und auf diese Weise an Ca^{2+} -abhängigen Prozessen im RPE beteiligt ist (Rosenthal *et al.*, 2006; Marmorstein *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Neussert *et al.*, 2010; Marmorstein *et al.*, 2015). Zu solchen Prozessen zählt auch die Aktivierung des basolateral exprimierten CaCC, als dessen Regulator Best1 fungieren könnte.

Im Gegensatz zu den Bestrophinen teilt Ano2 die biophysikalischen Eigenschaften des CaCC der RPE-Zellen. Zudem fand sich Ano2-mRNA in nativen Maus-RPE-Zellen. Immunzytochemische Färbungen von Dr. Nadine Reichhart (Abbildung 4.4) zeigen die Lokalisation von Ano2 in der Zytoplasmamembran dieser Zellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass Ano2 nicht nur in ARPE-19 Zellen, sondern ebenfalls in primären RPE-Zellen sowie *in vivo* an der Cl^- -Leitfähigkeit beteiligt ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen Ano2 und der Anionenleitfähigkeit mittels siRNA-Transfektion wurde allerdings lediglich in ARPE-19 Zellen, nicht in primären RPE-Zellen gezeigt.

4.2.6 Ano2 als einer von verschiedenen Cl^- -Kanälen im RPE

Während der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter in der apikalen RPE-Membran Cl^- über einen sekundär-aktiven Mechanismus in die RPE-Zelle befördert, verlässt das so akkumulierte Cl^- die Zelle durch Ionenkanäle auf der basolateralen Seite wieder. Der resultierende Cl^- -Transport durch das RPE zieht osmotisch Wasser nach und stellt damit die Antriebskraft für die Flüssigkeitsabsorption dar. Die Determinante für den Cl^- - und Flüssigkeitstransport ist die hohe Cl^- -Leitfähigkeit der basolateralen RPE-Membran. Diese wird wiederum durch die Aktivität der dort exprimierten Cl^- -Kanäle bestimmt, die über ganz unterschiedliche Mechanismen reguliert werden, um verschiedenen funktionellen Bedürfnissen des RPE gerecht zu werden (Strauss, 2005).

Eine Cl^- -Grundleitfähigkeit wird durch den ClC-2 -Kanal bereitgestellt, dessen Aktivität pH-abhängig moduliert werden kann (Bösl *et al.*, 2001; Hartzell & Qu, 2003). Über die Aktivierung von CFTR kann die Cl^- -Leitfähigkeit durch das intrazelluläre Signalmolekül cAMP gesteigert werden (Miller & Farber, 1984; Blaug *et al.*, 2003). Der CaCC ermöglicht eine Regulierung des Transports abhängig vom intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel. Hierdurch kann die Flüssigkeitsabsorption durch verschiedene Ca^{2+} -erhöhende Prozesse wie die Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Kanälen und die Speicherentleerung erhöht werden. Eine Situation, in der dies von Bedeutung ist, ist der Volumenanstieg im subretinalen Raum unter Lichteinfluss, wo extrazelluläres ATP P2Y2-Rezeptor-vermittelt eine Ca^{2+} -Speicherentleerung über IP3-

Rezeptoren und infolgedessen die Aktivierung des CaCCs bewirkt (Huang & Karwoski, 1992; Peterson *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 1999; Strauss, 2005).

Es ist demnach anzunehmen, dass Ano2, das maßgeblich an der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Leitfähigkeit des RPE beteiligt ist, eine wichtige Rolle in der Physiologie des RPE spielt. Die im RPE endogen exprimierten Proteine Best1 und CLCA1, die beide eine regulatorische Wirkung auf CaCCs besitzen, könnten als wichtige Regulatoren von Ano2 fungieren (Loewen *et al.*, 2003; Hamann *et al.*, 2009; Barro-Soria *et al.*, 2010; Neussert *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Yurtsever *et al.*, 2012; Sala-Rabanal *et al.*, 2015).

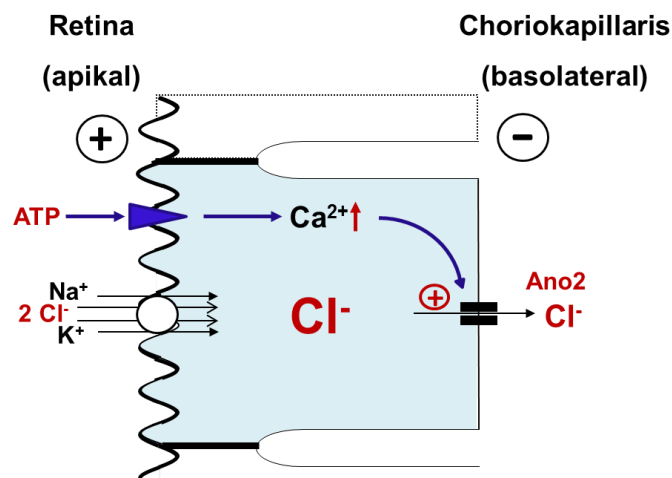


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Ano2-bedingten Cl^- -Transports. In den subretinalen Raum sekretiertes ATP stimuliert P2Y2-Rezeptoren, was einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Der Ca^{2+} -Anstieg führt über die Aktivierung von Ano2 zu einem Ausstrom von intrazellulärem Cl^- , welches zuvor über den $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransporter aus dem subretinalen Raum in das RPE gelangt ist (Abbildung modifiziert nach Olaf Strauß).

4.3 Expression von TRPV2 in ARPE-19 Zellen und seine Rolle im RPE

In dieser Studie wurde für die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanälen in RPE-Zellen extrazellulär appliziertes ATP als physiologischer Stimulus eingesetzt. Es führt als Ligand einiger P2Y-Rezeptorsubtypen zu einer *second messenger*-vermittelten Entleerung von Ca^{2+} -Speichern, als Ligand von P2X-Rezeptoren zu einem Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Bereich (North, 2002; Burnstock, 2004; Wimmers *et al.*, 2007).

Neben den zytosolischen Ca^{2+} -Speichern kann das freie intrazelluläre Ca^{2+} durch Aktivierung von Ca^{2+} -leitenden Ionenkanälen in der Plasmamembran erhöht und dadurch ebenfalls Ca^{2+} -abhängige Ionenkanäle aktiviert werden. Einer dieser Ca^{2+} -leitenden Ionenkanäle ist TRPV2, dessen funktionelle Expression im RPE des Menschen und Schweins und in ARPE-19 Zellen bekannt ist (Cordeiro *et al.*, 2010; Barro-Soria *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die gemeinsam mit Ergebnissen von Dr. Nadine

Reichhart und Frederick Fried zeigen, dass TRPV2 auch in ARPE-19 Zellen funktionell exprimiert wird. Es konnte durch Hitzeanwendung eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeit aktiviert werden, was eine charakteristische Eigenschaft von TRPV2 ist. Elektrophysiologische Untersuchungen von Frederick Fried zeigen, dass der Hitze-induzierte Strom sensitiv gegenüber Rutheniumrot oder SKF96365 ist (Abbildung 4.6). Dies sind ebenfalls Eigenschaften von TRPV2, was vergangene Studien zur Expression von TRPV2 in ARPE-19 Zellen bestätigen (Juvin *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2010).

Mit 45 °C war die zur Hitzeanwendung verwendete Temperatur ungewöhnlich niedrig. Gewöhnlich wird von einer Aktivierungsschwelle von 52 °C berichtet (Caterina *et al.*, 1999; Neeper *et al.*, 2007; Vriens *et al.*, 2009). Es wurden jedoch bewusst lediglich 45 °C gewählt, da die Zellenmembranen der ARPE-19 Zellen bei höheren Temperaturen instabil sind und deshalb keine Patch-Clamp-Ganzzellaufbauten ermöglichen (Cordeiro *et al.*, 2010). Ca^{2+} -Imaging-Versuche von Cordeiro *et al.*, in denen er den Ca^{2+} -Anstieg bei 45 °C und 56 °C in ARPE-19 vergleicht, zeigen, dass die Wahl von 45 °C mit Einbußen des TRPV2-Effekts einhergeht. Das war vermutlich auch in den Versuchen dieser Studie der Fall, in denen ein Hitze-induzierter Anstieg der Stromdichte von 16 % erreicht wurde.

In 40 % der ARPE-19 Zellen führte die Hitzeanwendung zu keinem Stromanstieg. Der Grund für die unterschiedlichen Reaktionen könnte die Spezialisierung einiger Zellen sein, was im Gewebeverband des nativen RPE ein natürlicher Prozess ist. Während alle RPE-Zellen Funktionen wie Photorezeptorphagozytose oder Ionen- und Flüssigkeitstransport ausführen, übernehmen einzelne RPE-Zellen weitere, spezielle Funktionen. Beispiele sind die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Immunregulatoren (Strauss, 2005; Reichhart *et al.*, 2015; Genewsky *et al.*, 2015). Die Spezialisierung bringt eine angepasste Proteinexpression mit sich. Möglich ist deshalb, dass nicht alle ARPE-19 Zellen TRPV2 exprimieren.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Cannabidiol-aktivierte Leitfähigkeitserhöhung durch Hitzeanwendung gesteigert wird, was durch Vorinkubation mit SKF96365 jedoch unterbunden wurde. Die Untersuchungen von Frederick Fried zeigen ein vergleichbares Ergebnis nach Inkubation der Zellen mit IGF-1 (Abbildung 4.6). Jedoch konnte Hitze die IGF-1-induzierte Leitfähigkeit nur unwesentlich steigern.

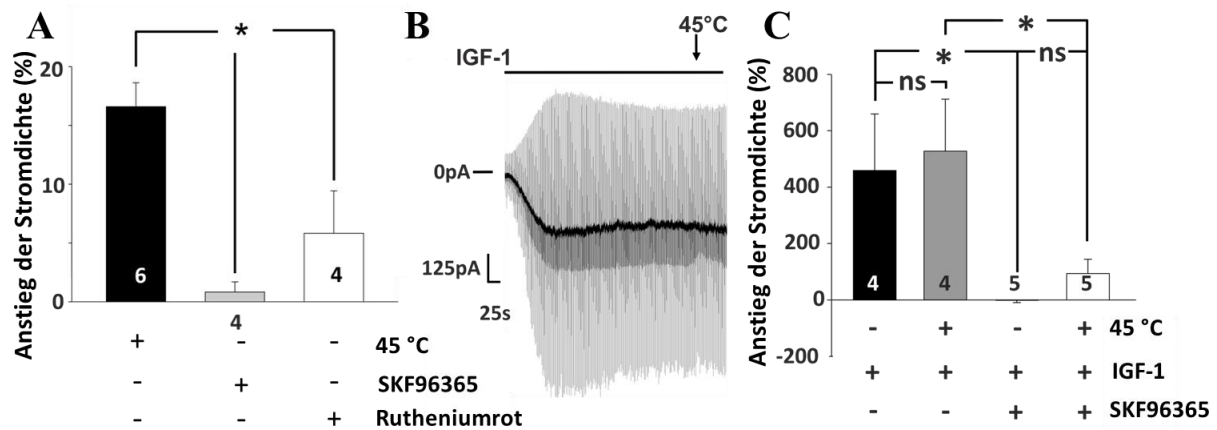


Abbildung 4.6: Hitze- und IGF-1-induzierte Effekte in ARPE-19 Zellen (nach Fried und Keckeis, 2013/2014). A: Balkendiagramm, das den prozentualen Anstieg der Stromdichte nach Hitzeanwendung in An- oder Abwesenheit der TRPV2-Inhibitoren SKF96365 (20 μ M) und Rutheniumrot (20 μ M) verglichen mit unstimulierten Zellen zeigt (n=4-6; Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05). B: Repräsentative Stromantwort einer ARPE-19 Zelle auf das Spannungsprotokoll „Rampe“. Die Inkubation mit IGF-1 (300 ng/ml) führt zu einem Stromanstieg, der durch Hitzeanwendung (45 °C) geringfügig gesteigert wird. C: Balkendiagramm, das die Gesamtstromdichte IGF-1-vorbehandelter Zellen vor und nach Wärmeanwendung in An- und Abwesenheit von SKF96365 vergleicht (n=4-5; Mittelwerte \pm SEM; ns = p > 0,05, * p < 0,05).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Dissertation von Frederik Fried stehen im Einklang mit immunzytochemischen Färbungen von Dr. Nadine Reichhart. Sie zeigen, dass TRPV2 insbesondere im Zytoplasma und nur geringfügig in der Zellmembran von ARPE-19 Zellen lokalisiert ist. Die Vorinkubation mit IGF-1 oder Cannabidiol führt zu einer Translokation von TRPV2 in die Zellmembran (Abbildung 4.7). Da dieser Prozess durch die Anwesenheit des PI3K-Inhibitors LY294002 unterbunden wird, ist die Translokation von TRPV2 aus intrazellulären Kompartimenten zur Zellmembran ein PI3K-abhängiger Prozess (Reichhart *et al.*, 2015).

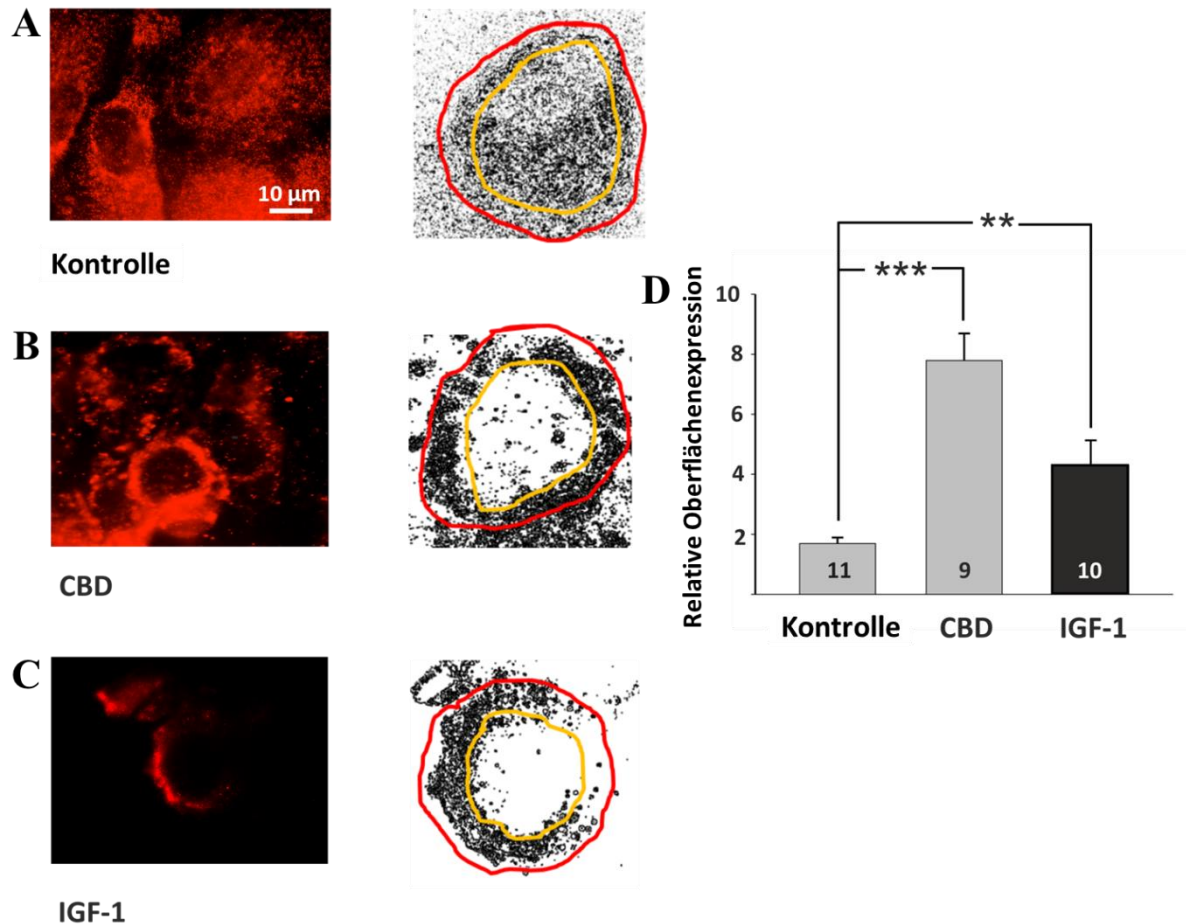


Abbildung 4.7: Erhöhung der TRPV2-Oberflächenexpression nach Behandlung mit Cannabidiol und IGF-1 (nach Reichhart, 2014). A-C: Die linken Abbildungen zeigen Immunfärbungen von unstimulierten (A), Cannabidiol-behandelten (B) und IGF-1-behandelten ARPE-19 Zellen (C) gegen TRPV2. Die rechten Abbildungen zeigen die Anwendung des „edge detection“-Algorithmus auf einzelne Zellen der entsprechenden linken Abbildungen. Die roten Linien umranden das Äußere der Zellen, die gelben Linien das Zellinnere. D: Balkendiagramm, das die relative Oberflächenexpression $[(\sum \text{Pixel innerhalb der roten Umrandungen} - \sum \text{Pixel innerhalb der gelben Umrandungen}) / \sum \text{Pixel innerhalb der roten Umrandungen}]$ der unstimulierten und Cannabidiol- und IGF-1-stimulierten Zellen zeigt (n=9-11; Mittelwerte \pm SEM; ** p < 0,01, *** p < 0,001). CBD: Cannabidiol.

Die TRPV2-Aktivierung durch IGF-1 und Cannabidiol scheint daher sowohl auf der direkten Stimulierung als auch einer erhöhten Expression von TRPV2 in der Zelloberfläche zu basieren. Unterschiede bestehen jedoch im Ausmaß der gesteigerten Oberflächenexpression und Stromaktivierung. IGF-1 steigert die Oberflächenexpression und aktiviert den TRPV-2-Strom, was durch Hitze nur geringfügig gesteigert wird. Cannabidiol bewirkt eine signifikant stärkere TRPV2-Oberflächenexpression als IGF-1. Es führt aber zu einer geringeren Stromaktivierung verglichen mit IGF-1, die sich durch Hitze deutlich steigern lässt. Solche Unterschiede ermöglichen eine feinere Regulierung des Ca^{2+} -Signalings (Reichhart *et al.*, 2015).

Neben der Aktivierung und Rekrutierung von TRPV2 durch Hitze, Cannabidiol und IGF-1 wird TRPV2 nach Stimulation des AT1-Rezeptors im Rahmen einer Phospholipase-C-abhängigen Signalkaskade aktiviert (Caterina *et al.*, 1999; Kanzaki *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2008; Barro-Soria *et al.*, 2012). TRPV2 stellt somit einen Ionenkanal in den ARPE-19 Zellen und im nativen RPE dar, der auf vielfältige Weise an der Erhöhung von intrazellulärem freiem Ca^{2+} und Steuerung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse beteiligt ist, zu denen auch die Ano2-Aktivierung zählt. Es wurde gezeigt, dass die VEGF-A-Sekretion aus dem RPE, die eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisation während der altersabhängigen Makuladegeneration spielt, TRPV2-gesteuert ist (Cordeiro *et al.*, 2010). Diese Regulierung kann über eine Temperaturerhöhung des RPE verlaufen. Dieses heizt durch Lichtabsorption auf Temperaturen über 40 °C auf (Parver *et al.*, 1980; Parver, 1991). Zum anderen unterliegt es bei Laserbehandlungen einer starken Wärmeentwicklung (Ibarra *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite kann die TRPV2-regulierte Sekretion von VEGF-A auf IGF-1 als Stimulus basieren, das über die Aktivierung der PI3K zur Translokation und Aktivierung von TRPV2 und zur VEGF-A-Sekretion führt (Kanzaki *et al.*, 1999; Rosenthal *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2010; Reichhart *et al.*, 2015). Inhibitoren der PI3K reduzieren sowohl die Effekte von IGF-1 auf TRPV2 als auch auf die Sekretion von VEGF-A.

4.4 Fazit

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass in humanen Linsenepithelzellen ein Ca^{2+} - und H_2O_2 -aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal funktionell exprimiert wird, dessen Aktivierung eine starke Erhöhung der Leitfähigkeit sowie eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt. Anhand seiner biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie durch Antikörper-spezifische Färbungen konnte dieser Ionenkanal als TRPM2 identifiziert werden. TRPM2, das durch verschiedenste Faktoren aktiviert und moduliert wird, könnte in die physiologische Ca^{2+} -Regulierung und Ionenhomöostase eingebunden sein. Andererseits könnte es ein Bindeglied zwischen kataraktogenen Faktoren und der Ionenhomöostase darstellen, deren Dysregulierung ein wichtiges Ereignis in der Kataraktogenese ist. Diese letzte Hypothese erscheint besonders vielversprechend, da $\text{TGF}\beta_2$, ein potenter kataraktogener Faktor, TRPM2 hochreguliert und den Ca^{2+} -aktivierten TRPM2-Strom verstärkt, was ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Der zweite Teil der Arbeit legte dar, dass Ano2 im nativen RPE sowie in ARPE-19 Zellen funktionell exprimiert wird, wo es auf der basolateralen Seite in der RPE-Zellmembran lokalisiert ist. Die Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskinetik und pharmakologischen

Eigenschaften von Ano2 entsprechen denen des CaCC, der in den untersuchten RPE-Zellen identifiziert wurde. Dieser wiederum stimmt in seinen Eigenschaften mit einem CaCC im RPE überein, der bereits in der Literatur beschrieben wurde und dessen Identifizierung seit längerem nachgegangen wird (Ueda & Steinberg, 1994; Strauss *et al.*, 1996; Loewen *et al.*, 2003; Marmorstein *et al.*, 2006; Schreiber & Kunzelmann, 2016). Dass Ano2 maßgeblich an der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Leitfähigkeit von RPE-Zellen beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit schließlich durch einen starken Rückgang dieser Leitfähigkeit infolge einer Herunterregulierung von Ano2 gezeigt werden. Ano2 kann daher wichtig für die Anpassung des transepithelialen Cl^- - und Wassertransports des RPE sein. Es könnte außerdem in retinale Erkrankungen involviert sein, denen ein verminderter Cl^- -Strom, insbesondere unter Lichteinfluss, zugrunde liegt.

Als einer der möglichen regulatorischen Faktoren der Ano2-Aktivität als Ca^{2+} -abhängiger Prozess wurde in diesem Teil der Arbeit weiterhin TRPV2 in ARPE-19 Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass neben Hitze auch Cannabidiol und IGF-1 die TRPV2-Aktivität steigern. Die genannten Faktoren sind in unterschiedlichem Ausmaß an der Oberflächenexpression und einer Stromaktivierung von TRPV2 beteiligt. Sie ermöglichen damit eine komplexe und feine Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} und Ca^{2+} -abhängiger Prozesse wie der Ano2-Aktivierung.

4.5 Weiterer Forschungsbedarf

Die Ergebnisse dieser Promotion erweitern die Kenntnisse um die molekularen Mechanismen, die dem Wasser- und Ionenstromtransport in der Linse und dem RPE zugrunde liegen. Die diskutierten Möglichkeiten, wie sich TRPM2 und Ano2 in die Physiologie oder Pathologie der jeweiligen Gewebe einbetten könnten, sind jedoch lediglich aus dem Kontext der verfügbaren Literatur erschlossene Hypothesen. Es bedarf deshalb weiterer Untersuchungen, um die funktionelle Bedeutung von TRPM2 für die Linse und von Ano2 für das RPE zu spezifizieren.

TRPM2 betreffend sollte der Einfluss von kataraktogenen Faktoren näher betrachtet werden. *In vitro* könnte geprüft werden, ob ROS neben einer Aktivierung auch die Expression des Kanals in Linsenepithelzellen verstärken, wie es für TGF β der Fall ist. Außerdem wäre zu prüfen, ob die kataraktogenen Faktoren ebenfalls das quantitative Verhältnis der Isoformen sowie die zelluläre Lokalisation von TRPM2 beeinflussen, und ob dies zu den in dieser Arbeit beobachteten Einflüssen auf die Leitfähigkeit beiträgt. Es sollte untersucht werden, ob TRPM2-Inhibitoren durch ROS und TGF β 2 verursachte kataraktöse Veränderungen in

Linsenexplantaten beeinflussen. Beschränkend wird hierbei allerdings sein, dass es momentan keine TRPM2-selektiven Inhibitoren gibt. In einem nächsten Schritt wären die Untersuchungen schließlich *in vivo* zu wiederholen. Optimal wären vergleichende Versuche an Wildtyp- und TRPM2-Knockout-Mäusen, welche neben einer pathologischen Rolle auch physiologische Funktionen von TRPM2 in der Linse aufklären könnten.

Um zu klären, ob Ano2 die für das RPE und die Retina prognostizierte physiologische und pathologische Bedeutung zukommt, wären ebenfalls Versuche an Knockout-Mäusen aufschlussreich. Von solchen Tieren sollte ein dc-ERG erstellt sowie Ussing-Kammer-Experimente und Patch-Clamp-Ableitungen kultivierter RPE-Zellen durchgeführt werden. Von Interesse wäre außerdem, vorherberechnete/prognostizierte verkürzte Ano2-Isoformen auf ihre Signifikanz zu überprüfen und elektrophysiologisch sowie pharmakologisch zu analysieren. Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Best1-abhängigen Ca^{2+} -Kanal-Modulation und der Aktivität von Ano2 untersucht werden. Möglich wären beispielsweise gekoppelte Ca^{2+} -Imaging/Patch-Clamp-Versuche an RPE-Zellen, die mit Best1-siRNA oder Wildtyp- und Mutanten-Best1 alleine sowie in Kombination mit Ano2-siRNA transfiziert werden. Dies könnte dabei helfen die Frage zu klären, ob und in welcher Weise Best1-Mutationen bei Morbus Best zu einem fehlenden Light-Peak führen.

Sollten solche Analysen erfolgreich sein, stellen TRPM2 und Ano2 interessante Targets bei der Prävention und Behandlung von Linseneintrübungen und retinalen Degenerationen wie Morbus Best dar.

5. Literaturverzeichnis

- Abe K, Puertollano R (2011). Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiol Bethesda Md* **26**: 14–22.
- Ablonczy Z, Dahrouj M, Tang PH, Liu Y, Sambamurti K, Marmorstein AD, *et al.* (2011). Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 8614–8620.
- Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, *et al.* (1993). Synthesis and Secretion of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor by Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 631–638.
- Adelman WJ, Senft JP (1966). Voltage Clamp Studies on the Effect of Internal Cesium Ion on Sodium and Potassium Currents in the Squid Giant Axon. *J Gen Physiol* **50**: 279–293.
- Adorante JS, Miller SS (1990). Potassium-dependent volume regulation in retinal pigment epithelium is mediated by Na,K,Cl cotransport. *J Gen Physiol* **96**: 1153–1176.
- Akaike N, Harata N (1994). Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn J Physiol* **44**: 433–473.
- Akaike N, Okajima Y (1982). Effects of veratrine and tetrodotoxin on the frog lens potential in normal and calcium-free media. *Pflüg Arch* **394**: 333–337.
- Alexander SP, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, *et al.* (2015). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol* **172**: 5904–5941.
- Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M (2006). Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res* **5**: 862–878.
- Allen JB, Davidson MG, Nasisse MP, Fleisher LN, McGahan MC (1998). The lens influences aqueous humor levels of transforming growth factor-beta 2. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* **236**: 305–311.
- Almaça J, Tian Y, Aldehni F, Ousingsawat J, Kongsuphol P, Rock JR, *et al.* (2009). TMEM16 Proteins Produce Volume-regulated Chloride Currents That Are Reduced in Mice Lacking TMEM16A. *J Biol Chem* **284**: 28571–28578.
- Andersson M, Sjöstrand J, Karlsson JO (1996). Calpains in the human lens: relations to membranes and possible role in cataract formation. *Ophthalmic Res* **28 Suppl 1**: 51–54.
- Andersson M, Sjöstrand J, Petersen A, Karlsson JO (1998). Calcium-dependent proteolysis in rabbit lens epithelium after oxidative stress. *Ophthalmic Res* **30**: 157–167.

- Andjelić S, Zupan A, G, Hawlina M (2011). The Preparations Used to Study Calcium in Lens Epithelial Cells and Its Role in Cataract Formation. *J Clin Exp Ophthalmol*.
- Andley UP, Rhim JS, Chylack LT, Fleming TP (1994). Propagation and immortalization of human lens epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**: 3094–3102.
- Arden GB, Constable PA (2006). The electro-oculogram. *Prog Retin Eye Res* **25**: 207–248.
- Armstrong CM (1969). Inactivation of the Potassium Conductance and Related Phenomena Caused by Quaternary Ammonium Ion Injection in Squid Axons. *J Gen Physiol* **54**: 553–575.
- Auker CR, Parver LM, Doyle T, Carpenter DO (1982). Choroidal Blood Flow: I. Ocular Tissue Temperature as a Measure of Flow. *Arch Ophthalmol* **100**: 1323–1326.
- Azuma M, Shearer TR (1992). Involvement of calpain in diamide-induced cataract in cultured lenses. *FEBS Lett* **307**: 313–317.
- Babizhayev MA, Li DW-C, Kasus-Jacobi A, Žorić L, Alió JL (2014). *Studies on the Cornea and Lens*. Springer.
- Balzer M, Lintschinger B, Groschner K (1999). Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* **42**: 543–549.
- Ban Y, Rizzolo LJ (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Dev Brain Res* **121**: 89–95.
- Bao L, Sachs F, Dahl G (2004). Connexins are mechanosensitive. *Am J Physiol - Cell Physiol* **287**: C1389–C1395.
- Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kühn FJP, Gustafsson AJ, Lückhoff A, *et al.* (2009). H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med* **13**: 3260–3267.
- Barro-Soria R, Aldehni F, Almaça J, Witzgall R, Schreiber R, Kunzelmann K (2010). ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflugers Arch* **459**: 485–497.
- Barro-Soria R, Schreiber R, Kunzelmann K (2008). Bestrophin 1 and 2 are components of the Ca²⁺ activated Cl⁻ conductance in mouse airways. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1783**: 1993–2000.
- Barro-Soria R, Stindl J, Müller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, *et al.* (2012). Angiotensin-2-Mediated Ca²⁺ Signaling in the Retinal Pigment Epithelium: Role of Angiotensin-Receptor-Associated-Protein and TRPV2 Channel. *PLOS ONE* **7**: e49624.
- Barry PH (1994). JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods* **51**: 107–116.

- Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB (1992). Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol* **318**: 295–306.
- Bazan NG, Turco EBR de, Gordon WC (1994). Docosahexaenoic Acid Supply to the Retina and Its Conservation in Photoreceptor Cells by Active Retinal Pigment Epithelium-Mediated Recycling. *75*: 120–123.
- Bennett JP, Cockcroft S, Gomperts BD (1979). Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex. *Nature* **282**: 851–853.
- Berbers GA, Feenstra RW, van den Bos R, Hoekman WA, Bloemendal H, de Jong WW (1984). Lens transglutaminase selects specific beta-crystallin sequences as substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7017–7020.
- Berkefeld H, Fakler B, Schulte U (2010). Ca²⁺-Activated K⁺ Channels: From Protein Complexes to Function. *Physiol Rev* **90**: 1437–1459.
- Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart J-O, Eble S, *et al.* (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* **314**: 615–620.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998). Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**: 645–648.
- Berthoud VM, Minogue PJ, Osmolak P, Snabb JI, Beyer EC (2014). Roles and regulation of lens epithelial cell connexins. *FEBS Lett* **588**: 1297–1303.
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, *et al.* (1992). Electrical measurements on endomembranes. *Science* **258**: 873–874.
- Bevers EM, Comfurius P, Van Rijn JLML, Hemker HC (1982). Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *Eur J Biochem* **122**: 429–436.
- Beyer EC, Berthoud VM (2014). Connexin hemichannels in the lens. *Front Physiol* **5**.
- Bhat SP (2001). The ocular lens epithelium. *Biosci Rep* **21**: 537–563.
- Bialek S, Miller SS (1994). K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition. *J Physiol* **475**: 401–417.
- Billig GM, Pál B, Fidzinski P, Jentsch TJ (2011). Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nat Neurosci* **14**: 763–769.
- Blaug S, Quinn R, Quong J, Jalickee S, Miller SS (2003). Retinal pigment epithelial function: a role for CFTR? *Doc Ophthalmol* **106**: 43–50.
- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol* **86**: 407–485.

- Bösl MR, Stein V, Hübner C, Zdebik AA, Jordt S-E, Mukhopadhyay AK, *et al.* (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell–cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J* **20**: 1289–1299.
- Boucher C, Sandford R (2004). Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD, MIM 173900, PKD1 and PKD2 genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). *Eur J Hum Genet EJHG* **12**: 347–354.
- Bradley E, Fedigan S, Webb T, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, *et al.* (2014). Pharmacological characterization of TMEM16A currents. *Channels Austin Tex* **8**: 308–320.
- Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A, Dutzler R (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* **516**: 207–212.
- Brunner JD, Schenck S, Dutzler R (2016). Structural basis for phospholipid scrambling in the TMEM16 family. *Curr Opin Struct Biol* **39**: 61–70.
- Buchholz B, Faria D, Schley G, Schreiber R, Eckardt K-U, Kunzelmann K (2014). Anoctamin 1 induces calcium-activated chloride secretion and proliferation of renal cyst-forming epithelial cells. *Kidney Int* **85**: 1058–1067.
- Burge WE (1909). Analyses of the Ash of the Normal and the Cataractous Lens. *Arch Ophthalmol* **38**: 435–450.
- Burnstock G (2004). Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* **4**: 793–803.
- Cameron JS, Dryer L, Dryer SE (1999). Regulation of neuronal K(+) currents by target-derived factors: opposing actions of two different isoforms of TGFbeta. *Development* **126**: 4157–4164.
- Campochiaro PA, Hackett SF, Vinoses SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, *et al.* (1994). Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* **107** (Pt 9): 2459–2469.
- Candia OA (2004). Electrolyte and fluid transport across corneal, conjunctival and lens epithelia. *Exp Eye Res* **78**: 527–535.
- Cao X, Li X, Hu J, Bao Y (2009). Hydrogen peroxide-induced cellular apoptosis is mediated by TGF-β2 signaling pathway in cultured human lens epithelial cells. *Int Ophthalmol* **30**: 229–237.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, *et al.* (2008). TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. *Science* **322**: 590–594.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**: 436–441.
- Cavallotti C, Cerulli L (2008). *Age-Related Changes of the Human Eye*. Springer Science & Business Media.

- Chae K-S, Martin-Caraballo M, Anderson M, Dryer SE (2005). Akt activation is necessary for growth factor-induced trafficking of functional K(Ca) channels in developing parasympathetic neurons. *J Neurophysiol* **93**: 1174–1182.
- Chamberlain CG, Mansfield KJ, Cerra A (2009). Glutathione and catalase suppress TGFbeta-induced cataract-related changes in cultured rat lenses and lens epithelial explants. *Mol Vis* **15**: 895–905.
- Charakidas A, Kalogeraki A, Tsilimbaris M, Koukoulomatis P, Brouzas D, Delides G (2005). Lens epithelial apoptosis and cell proliferation in human age-related cortical cataract. *Eur J Ophthalmol* **15**: 213–220.
- Chen X-Z, Vassilev PM, Basora N, Peng J-B, Nomura H, Segal Y, *et al.* (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* **401**: 383–386.
- Cheng G, Shao Z, Chaudhari B, Agrawal DK (2007). Involvement of chloride channels in TGF-beta1-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**: L1339-1347.
- Cheng X, Shen D, Samie M, Xu H (2010). Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 Channels. *FEBS Lett* **584**: 2013–2021.
- Cherkashin AP, Kolesnikova AS, Tarasov MV, Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, *et al.* (2016). Expression of calcium-activated chloride channels Ano1 and Ano2 in mouse taste cells. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **468**: 305–319.
- Chimote AA, Adragna NC, Lauf PK (2010). Ion transport in a human lens epithelial cell line exposed to hyposmotic and apoptotic stress. *J Cell Physiol* **223**: 110–122.
- Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, *et al.* (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* **15**: 1015–1021.
- Churchill GC, Louis CF (1998). Roles of Ca²⁺, inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose in mediating intercellular Ca²⁺ signaling in sheep lens cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 9): 1217–1225.
- Churchill GC, Louis CF (2002). Ca(2+) regulation in differentiating lens cells in culture. *Exp Eye Res* **75**: 77–85.
- Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517–524.
- Clark JI, Matsushima H, David LL, Clark JM (1999). Lens cytoskeleton and transparency: a model. *Eye Lond Engl* **13** (Pt 3b): 417–424.
- Clay JR (1985). Comparison of the effects of internal TEA⁺ and Cs⁺ on potassium current in squid giant axons. *Biophys J* **48**: 885–892.
- Clément S, Velasco PT, Murthy SNP, Wilson JH, Lukas TJ, Goldman RD, *et al.* (1998). The Intermediate Filament Protein, Vimentin, in the Lens Is a Target for Cross-linking by Transglutaminase. *J Biol Chem* **273**: 7604–7609.

- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011). Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacol Rev* **63**: 641–683.
- Cooper K, Gates P, Rae JL, Dewey J Electrophysiology of cultured human lens epithelial cells. *J Membr Biol* **117**: 285–298.
- Cooper KE, Tang JM, Rae JL, Eisenberg RS (1986). A cation channel in frog lens epithelia responsive to pressure and calcium. *J Membr Biol* **93**: 259–269.
- Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM, Strauss O (2010). Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 6001–6008.
- Counis MF, Chaudun E, Courtois Y, Skidmore CJ (1985). Nuclear ADP-ribosylation in the chick lens during embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* **126**: 859–866.
- Crutzen R, Virreira M, Markadieu N, Shlyonsky V, Sener A, Malaisse WJ, *et al.* (2016). Anoctamin 1 (Ano1) is required for glucose-induced membrane potential oscillations and insulin secretion by murine β -cells. *Pflugers Arch* **468**: 573–591.
- Cruz-Rangel S, De Jesús-Pérez JJ, Contreras-Vite JA, Pérez-Cornejo P, Hartzell HC, Arreola J (2015). Gating modes of calcium-activated chloride channels TMEM16A and TMEM16B. *J Physiol* **593**: 5283–5298.
- Dalagiorgou G, Piperi C, Georgopoulou U, Adamopoulos C, Basdra EK, Papavassiliou AG (2013). Mechanical stimulation of polycystin-1 induces human osteoblastic gene expression via potentiation of the calcineurin/NFAT signalling axis. *Cell Mol Life Sci CMLS* **70**: 167–180.
- Dalton AC, Barton WA (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci Publ Protein Soc* **23**: 517–525.
- Das SJ, Lovicu FJ, Collinson EJ (2016). Nox4 Plays a Role in TGF- β -Dependent Lens Epithelial to Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**: 3665–3673.
- Dauner K, Möbus C, Frings S, Möhrle F (2013). Targeted Expression of Anoctamin Calcium-Activated Chloride Channels in Rod Photoreceptor Terminals of the Rodent Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 3126–3136.
- David LL, Shearer TR, Shih M (1993). Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* **268**: 1937–1940.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H-J, Benedict W, *et al.* (1999). Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis. *Science* **285**: 245–248.
- Donaldson P, Kistler J, Mathias RT (2001). Molecular Solutions to Mammalian Lens Transparency. *Physiology* **16**: 118–123.

- Dong X, Cheng X, Mills E, Delling M, Wang F, Kurz T, *et al.* (2008). The Type IV Mucopolidosis-Associated Protein TRPML1 is an Endo-lysosomal Iron Release Channel. *Nature* **455**: 992–996.
- Dong X, Wang X, Shen D, Chen S, Liu M, Wang Y, *et al.* (2009). Activating Mutations of the TRPML1 Channel Revealed by Proline-scanning Mutagenesis. *J Biol Chem* **284**: 32040–32052.
- Dornonville de la Cour M (1993). Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol Suppl*: 1–32.
- Dryer SE, Lhuillier L, Cameron JS, Martin-Caraballo M (2003). Expression of KCa channels in identified populations of developing vertebrate neurons: role of neurotrophic factors and activity. *J Physiol-Paris* **97**: 49–58.
- Du J, Xie J, Yue L (2009). Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 7239–7244.
- Du J, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H, Fusco D, Silverman D, *et al.* (2010). TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res* **106**: 992–1003.
- Duncan G, Bushell AR (1975). Ion analyses of human cataractous lenses. *Exp Eye Res* **20**: 223–230.
- Duncan G, Collison DJ (2002). Calcium Signalling in Ocular Tissues: Functional Activity of G-protein and Tyrosine–Kinase Coupled Receptors. *Exp Eye Res* **75**: 377–389.
- Duncan G, Jacob TJ (1984). Calcium and the physiology of cataract. *Ciba Found Symp* **106**: 132–152.
- Duncan G, Marcantonio JM, Tomlinson J (1991). Lens Calcium and Cataract. In: *Presbyopia Research, Perspectives in Vision Research*. Springer, Boston, MA, pp 33–40.
- Duncan G, Wormstone IM (1999). Calcium cell signalling and cataract: Role of the endoplasmic reticulum. *Eye* **13**: 480–483.
- Duncan G, Wormstone IM, Davies PD (1997). The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour. *Br J Ophthalmol* **81**: 818–823.
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* **62**: 155–169.
- Duran C, Hartzell HC (2011). Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin* **32**: 685–692.
- Edelman JL, Lin H, Miller SS (1994). Acidification stimulates chloride and fluid absorption across frog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **266**: C946–C956.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* **48**: 178–183.

- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950* **148**: 2207–2216.
- Fagerholm PP, Philipson BT (1981). Human lens epithelium in normal and cataractous lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **21**: 408–414.
- Fang L, Huang C, Meng X, Wu B, Ma T, Liu X, *et al.* (2014). TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **280**: 335–344.
- Fatma N, Kubo E, Sharma P, Beier DR, Singh DP (2005). Impaired homeostasis and phenotypic abnormalities in Prdx6^{-/-}-mice lens epithelial cells by reactive oxygen species: increased expression and activation of TGF β . *Cell Death Differ* **12**: 734–750.
- Fatma N, Kubo E, Takamura Y, Ishihara K, Garcia C, Beebe DC, *et al.* (2009). Loss of NF- κ B Control and Repression of Prdx6 Gene Transcription by Reactive Oxygen Species-driven SMAD3-mediated Transforming Growth Factor β Signaling. *J Biol Chem* **284**: 22758–22772.
- Fischbarg J, Diecke FPJ, Kuang K, Yu B, Kang F, Iserovich P, *et al.* (1999). Transport of fluid by lens epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **276**: C548–C557.
- Fleming TP, Song Z, Andley UP (1998). Expression of growth control and differentiation genes in human lens epithelial cells with extended life span. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 1387–1398.
- Foutz RM, Grimm PR, Sansom SC (2008). Insulin increases the activity of mesangial BK channels through MAPK signaling. *Am J Physiol - Ren Physiol* **294**: F1465–F1472.
- Fox JA, Pfeffer BA, Fain GL (1988). Single-channel recordings from cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Gen Physiol* **91**: 193–222.
- Freichel M, Almering J, Tsvilovskyy V (2012). The Role of TRP Proteins in Mast Cells. *Front Immunol* **3**.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K (2004). Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 Receptor Subtypes in the Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3410–3417.
- Fuente RDL, Namkung W, Mills A, Verkman AS (2008). Small-Molecule Screen Identifies Inhibitors of a Human Intestinal Calcium-Activated Chloride Channel. *Mol Pharmacol* **73**: 758–768.
- Fujii S, Gallemore RP, Hughes BA, Steinberg RH (1992). Direct evidence for a basolateral membrane Cl⁻ conductance in toad retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* **262**: C374–383.
- Galiotta LJV (2009). The TMEM16 Protein Family: A New Class of Chloride Channels? *Biophys J* **97**: 3047–3053.

- Gallemore RP, Hernandez E, Tayyanipour R, Fujii S, Steinberg RH (1993). Basolateral membrane Cl⁻ and K⁺ conductances of the dark-adapted chick retinal pigment epithelium. *J Neurophysiol* **70**: 1656–1668.
- Gallemore RP, Steinberg RH (1989). Effects of DIDS on the chick retinal pigment epithelium. II. Mechanism of the light peak and other responses originating at the basal membrane. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **9**: 1977–1984.
- Gallemore RP, Steinberg RH (1993). Light-evoked modulation of basolateral membrane Cl⁻ conductance in chick retinal pigment epithelium: the light peak and fast oscillation. *J Neurophysiol* **70**: 1669–1680.
- Galvani L, Volta A, Zambelli J, Burndy Library donor D (1791). *Aloysii Galvani De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Bononiae : Ex Typographia Institutii Scientiarium.
- Gao J, Sun X, Martinez-Wittinghan FJ, Gong X, White TW, Mathias RT (2004). Connections Between Connexins, Calcium, and Cataracts in the Lens. *J Gen Physiol* **124**: 289–300.
- Gao J, Sun X, White TW, Delamere NA, Mathias RT (2015). Feedback Regulation of Intracellular Hydrostatic Pressure in Surface Cells of the Lens. *Biophys J* **109**: 1830–1839.
- Gao J, Wang H, Sun X, Varadaraj K, Li L, White TW, *et al.* (2013). The Effects of Age on Lens Transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 7174–7187.
- Genewsky A, Jost I, Busch C, Huber C, Stindl J, Skerka C, *et al.* (2015). Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **467**: 2179–2191.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* **110**: 103–116.
- Girault A, Brochiero E (2014). Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am J Physiol - Cell Physiol* **306**: C307–C319.
- Gómez NM, Tamm ER, Strauß O (2013). Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **465**: 481–495.
- Gonzales AL, Garcia ZI, Amberg GC, Earley S (2010). Pharmacological inhibition of TRPM4 hyperpolarizes vascular smooth muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol* **299**: C1195–C1202.
- González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, *et al.* (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1182–1187.
- Gordon-Thomson C, Iongh RU de, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW (1998). Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 1399–1409.

- Gosak M, Markovič R, Fajmut A, Marhl M, Hawlina M, Andjelić S (2015). The Analysis of Intracellular and Intercellular Calcium Signaling in Human Anterior Lens Capsule Epithelial Cells with Regard to Different Types and Stages of the Cataract. *PLOS ONE* **10**: e0143781.
- Grand T, Demion M, Norez C, Mettey Y, Launay P, Becq F, *et al.* (2008). 9-Phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br J Pharmacol* **153**: 1697–1705.
- Grehn F (2011). *Augenheilkunde*. Springer.
- Grisanti S (1998). Das Immunprivileg des Auges. *Ophthalmol* **95**: 124–135.
- Gross SA, Guzmán GA, Wissenbach U, Philipp SE, Zhu MX, Bruns D, *et al.* (2009). TRPC5 is a Ca²⁺-activated channel functionally coupled to Ca²⁺-selective ion channels. *J Biol Chem* **284**: 34423–34432.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440–3450.
- Gupta PD, Johar K, Vasavada A (2004). Causative and preventive action of calcium in cataracto-genesis. *Acta Pharmacol Sin* **25**: 1250–1256.
- Gupta VB, Rajagopala M, Ravishankar B (2014). Etiopathogenesis of cataract: An appraisal. *Indian J Ophthalmol* **62**: 103–110.
- Hales AM, Chamberlain CG, Dreher B, McAvoy JW (1999). Intravitreal Injection of TGFβ Induces Cataract in Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 3231–3236.
- Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW (1995). Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 1709–1713.
- Hales AM, Chamberlain CG, Murphy CR, McAvoy JW (1997). Estrogen protects lenses against cataract induced by transforming growth factor-beta (TGFbeta). *J Exp Med* **185**: 273–280.
- Hamann M, Gibson A, Davies N, Jowett A, Walhin JP, Partington L, *et al.* (2009). Human ClCa1 modulates anionic conduction of calcium-dependent chloride currents. *J Physiol* **587**: 2255–2274.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85–100.
- Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, *et al.* (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* **408**: 990–994.
- Harding JJ, Crabbe MJC (1984). Chapter 3 - The Lens: Development, Proteins, Metabolism and Cataract. In: Davson H (ed) *The Eye (Third Edition)*, Academic Press, pp 207–492.

- Hartzell HC, Qu Z (2003). Chloride Currents in Acutely Isolated Xenopus Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Physiol* **549**: 453–469.
- Hecquet CM, Malik AB (2009). Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* **101**: 619–625.
- Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, *et al.* (2014). Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. *Circ Res* **114**: 469–479.
- Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Ashford MLJ (1999). Hydrogen Peroxide Induces Intracellular Calcium Overload by Activation of a Non-selective Cation Channel in an Insulin-secreting Cell Line. *J Biol Chem* **274**: 833–841.
- Hidasi V, Adány R, Muszbek L (1995). Localization of transglutaminase in human lenses. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **43**: 1173–1177.
- Hightower KR (1995). The role of the lens epithelium in development of UV cataract. *Curr Eye Res* **14**: 71–78.
- Hightower KR, McCready JP (1989). Effects of selenium on ion homeostasis and transparency in cultured lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**: 171–175.
- Hightower KR, McCready JP (1991). Effect of selenite on epithelium of cultured rabbit lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**: 406–409.
- Hightower KR, Reddan JR, Dziedzic DC (1989). Susceptibility of lens epithelial membrane SH groups to hydrogen peroxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**: 569–574.
- Hightower KR, Reddan JR, McCready JP, Dziedzic DC (1994). Lens epithelium: a primary target of UVB irradiation. *Exp Eye Res* **59**: 557–564.
- Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD (2004). Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* **47**: 450–460.
- Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol CB* **13**: 1153–1158.
- Holm NR, Christophersen P, Olesen SP, Gammeltoft S (1997). Activation of calcium-dependent potassium channels in rat brain neurons by neurotrophin-3 and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 1002–1006.
- Huang B, Karwoski CJ (1992). Light-evoked expansion of subretinal space volume in the retina of the frog. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **12**: 4243–4252.
- Huang WC, Xiao S, Huang F, Harfe BD, Jan YN, Jan LY (2012). Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons. *Neuron* **74**: 179–192.

- Huang F, Zhang H, Wu M, Yang H, Kudo M, Peters CJ, *et al.* (2012). Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16354–16359.
- Ibarra MS, Hsu J, Mirza N, Wu I-H, Ying G, Mainster MA, *et al.* (2004). Retinal temperature increase during transpupillary thermotherapy: effects of pigmentation, subretinal blood, and choroidal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3678–3682.
- Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, *et al.* (2003). Response to ADP-Ribose by Activation of TRPM2 in the CRI-G1 Insulinoma Cell Line. *J Membr Biol* **191**: 201–207.
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, *et al.* (2001). The Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP6 Is the Essential Component of Vascular α 1-Adrenoceptor-Activated Ca^{2+} -Permeable Cation Channel. *Circ Res* **88**: 325–332.
- de Iongh RU, Gordon-Thomson C, Chamberlain CG, Hales AM, McAvoy JW (2001). Tgfbeta receptor expression in lens: implications for differentiation and cataractogenesis. *Exp Eye Res* **72**: 649–659.
- de Iongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW (2005). Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs* **179**: 43–55.
- Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* **235**: 159–167.
- Ishibashi H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2012). Perforated Whole-Cell Patch-Clamp Technique: A User's Guide. In: *Patch Clamp Techniques*, Springer Protocols Handbooks. Springer, Tokyo, pp 71–83.
- Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm* **11**: 91–105.
- Jacob TJ (1988). Fresh and cultured human lens epithelial cells: an electrophysiological study of cell coupling and membrane properties. *Exp Eye Res* **47**: 489–506.
- Jacob TJC (1999). The relationship between cataract, cell swelling and volume regulation. *Prog Retin Eye Res* **18**: 223–233.
- Jang Y, Oh U (2014). Anoctamin 1 in secretory epithelia. *Cell Calcium* **55**: 355–361.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002). Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol Rev* **82**: 503–568.
- Jiang L-H, Yang W, Zou J, Beech DJ (2010). TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets* **14**: 973–988.

- Jiang H-N, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu J-M, *et al.* (2013). Involvement of TRPC Channels in Lung Cancer Cell Differentiation and the Correlation Analysis in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **8**.
- Jobling AI, Augusteyn RC (2002). What causes steroid cataracts? A review of steroid-induced posterior subcapsular cataracts. *Clin Exp Optom* **85**: 61–75.
- Joseph DP, Miller SS (1991). Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol* **435**: 439–463.
- Juuti-Uusitalo K, Delporte C, Grégoire F, Perret J, Huhtala H, Savolainen V, *et al.* (2013). Aquaporin expression and function in human pluripotent stem cell-derived retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 3510–3519.
- Juvin V, Penna A, Chemin J, Lin Y-L, Rassendren F-A (2007). Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of transient receptor potential V2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Mol Pharmacol* **72**: 1258–1268.
- Kadoya K, Azuma M, David LL, Shearer TR (1993). Role of calpain in hydrogen peroxide induced cataract. *Curr Eye Res* **12**: 341–346.
- Kalariya N, Rawal UM, Vasavada AR (1998). Human lens epithelial layer in cortical cataract. *Indian J Ophthalmol* **46**: 159.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T (1995). *Neurowissenschaften: Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* **1**: 165–170.
- Karim AK, Jacob TJ, Thompson GM (1987). The human anterior lens capsule: cell density, morphology and mitotic index in normal and cataractous lenses. *Exp Eye Res* **45**: 865–874.
- Karlsson JO, Andersson M, Kling-Petersen A, Sjöstrand J (1999). Proteolysis in human lens epithelium determined by a cell-permeable substrate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 261–264.
- Kaufman PL, Adler FH, Levin LA, Alm A (2011). *Adler's Physiology of the Eye*. Elsevier Health Sciences.
- Kennedy BG (1990). Na(+)-K(4)-Cl- cotransport in cultured cells derived from human retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **259**: C29–C34.
- Kenyon E, Maminishkis A, Joseph DP, Miller SS (1997). Apical and basolateral membrane mechanisms that regulate pHi in bovine retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **273**: C456–C472.
- Khoo KM, Chang CF (1999). Characterization and localization of CD38 in the vertebrate eye. *Brain Res* **821**: 17–25.

- Kmit A, van Kruchten R, Ousingsawat J, Mattheij NJA, Senden-Gijsbers B, Heemskerk JWM, *et al.* (2013). Calcium-activated and apoptotic phospholipid scrambling induced by Ano6 can occur independently of Ano6 ion currents. *Cell Death Dis* **4**: e611.
- Kociok N, Hueber A, Esser P, Schraermeyer U, Thumann G, Luther TT, *et al.* (2002). Vitreous Treatment of Cultured Human RPE Cells Results in Differential Expression of 10 New Genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**: 2474–2480.
- Kociok N, Radetzky S, Krohne TU, Gavranic C, Jousen AM (2006). Pathological but Not Physiological Retinal Neovascularization Is Altered in TNF-Rp55-Receptor-Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 5057–5065.
- Kodal H, Weick M, Moll V, Biedermann B, Reichenbach A, Bringmann A (2000). Involvement of calcium-activated potassium channels in the regulation of DNA synthesis in cultured Müller glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 4262–4267.
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, *et al.* (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* **4**: 191–197.
- Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, *et al.* (2004). Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol - Cell Physiol* **286**: C129–C137.
- Kuznetsova AV, Kurinov AM, Aleksandrova MA (2014). Cell Models to Study Regulation of Cell Transformation in Pathologies of Retinal Pigment Epithelium. *J Ophthalmol* **2014**: e801787.
- Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R (2009). TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. *Sci Signal* **2**: ra23.
- LaPlante JM, Falardeau J, Sun M, Kanazirska M, Brown EM, Slaugenhaupt SA, *et al.* (2002). Identification and characterization of the single channel function of human mucolipin-1 implicated in mucopolipidosis type IV, a disorder affecting the lysosomal pathway. *FEBS Lett* **532**: 183–187.
- Lara WC, Jordan BL, Hope GM, Dawson WW, Foster RA, Kaushal S (2003). Fast Oscillations of the Electro-oculogram in Cystic Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4957–4957.
- Lauf PK, Misri S, Chimote AA, Adragna NC (2008). Apparent intermediate K conductance channel hyposmotic activation in human lens epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: C820-832.
- Lauf PK, Warwar R, Brown TL, Adragna NC (2006). Regulation of potassium transport in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* **82**: 55–64.
- Launay P, Fleig A, Perraud A-L, Scharenberg AM, Penner R, Kinet J-P (2002). TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* **109**: 397–407.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* **21**: 69–78.

- Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E (2014). Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: Past, present and future. *Exp Eye Res* **126**: 5–15.
- Lhuillier L, Dryer SE (2000). Developmental Regulation of Neuronal KCa Channels by TGF β 1: Transcriptional and Posttranscriptional Effects Mediated by Erk MAP Kinase. *J Neurosci* **20**: 5616–5622.
- Lhuillier L, Dryer SE (2002). Developmental Regulation of Neuronal KCa Channels by TGF β 1: An Essential Role for PI3 Kinase Signaling and Membrane Insertion. *J Neurophysiol* **88**: 954–964.
- Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wang RR, Ma W, Wang GM, *et al.* (1995). Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* **130**: 169–181.
- Lichtenegger M, Stockner T, Poteser M, Schleifer H, Platzer D, Romanin C, *et al.* (2013). A novel homology model of TRPC3 reveals allosteric coupling between gate and selectivity filter. *Cell Calcium* **54**: 175–185.
- Lin H, Miller SS (1994). pHi-dependent Cl-HCO₃ exchange at the basolateral membrane of frog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **266**: C935–C945.
- Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW (1994). Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**: 388–401.
- Liu C, Hermann TE (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* **253**: 5892–5894.
- Liu D, Scholze A, Zhu Z, Kreutz R, Wehland-von-Trebra M, Zidek W, *et al.* (2005). Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **18**: 1503–1507.
- Liu Y, Zhang H, Huang D, Qi J, Xu J, Gao H, *et al.* (2015). Characterization of the effects of Cl⁻ channel modulators on TMEM16A and bestrophin-1 Ca²⁺ activated Cl⁻ channels. *Pflug Arch - Eur J Physiol* **467**: 1417–1430.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Loewen ME, Smith NK, Hamilton DL, Grahn BH, Forsyth GW (2003). CLCA protein and chloride transport in canine retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **285**: C1314–C1321.
- Lovicu FJ (2004). *Development of the Ocular Lens*. Cambridge University Press.
- Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, Vincent LN, Overbeek PA, Chamberlain CG, *et al.* (2002). TGF β induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol* **86**: 220–226.
- Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ (2006). Effects of Culture Conditions on Heterogeneity and the Apical Junctional Complex of the ARPE-19 Cell Line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 3644–3655.

- Ma H, Shih M, Throneberg DB, David LL, Shearer TR (1997). Changes in calpain II mRNA in young rat lens during maturation and cataract formation. *Exp Eye Res* **64**: 437–445.
- Maddala R, Nagendran T, de Ridder GG, Schey KL, Rao PV (2013). L-Type Calcium Channels Play a Critical Role in Maintaining Lens Transparency by Regulating Phosphorylation of Aquaporin-0 and Myosin Light Chain and Expression of Connexins. *PLoS ONE* **8**.
- Mannermaa E, Reinisalo M, Ranta V-P, Vellonen K-S, Kokki H, Saarikko A, *et al.* (2010). Filter-cultured ARPE-19 cells as outer blood–retinal barrier model. *Eur J Pharm Sci* **40**: 289–296.
- Manoury B, Tamuleviciute A, Tammaro P (2010). TMEM16A/Anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol* **588**: 2305–2314.
- Marcantonio JM, Duncan G, Rink H (1986). Calcium-induced opacification and loss of protein in the organ-cultured bovine lens. *Exp Eye Res* **42**: 617–630.
- Marcantonio JM, Vrensen GFJM (1999). Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye* **13**: 484–488.
- Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, Marmorstein LY (2015). Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **21**: 347–359.
- Marmorstein LY, Wu J, McLaughlin P, Yocom J, Karl MO, Neussert R, *et al.* (2006). The Light Peak of the Electroretinogram Is Dependent on Voltage-gated Calcium Channels and Antagonized by Bestrophin (Best-1). *J Gen Physiol* **127**: 577–589.
- Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, Crouch RK, *et al.* (2005). Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Retinal Pigment Epithelium Is Essential for Choriocapillaris Development and Visual Function. *Am J Pathol* **167**: 1451–1459.
- Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, Krämer F, Rivera A, Weber BH (1998). Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best’s disease). *Hum Mol Genet* **7**: 1517–1525.
- Marrion NV, Tavalin SJ (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* **395**: 900–905.
- Martin DM, Yee D, Feldman EL (1992). Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Mol Brain Res* **12**: 181–186.
- Martínez-García MC, Martínez T, Pañeda C, Gallego P, Jimenez AI, Merayo J (2013). Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes. *Histol Histopathol* **28**: 1507–1516.
- Martins JR, Faria D, Kongsuphol P, Reisch B, Schreiber R, Kunzelmann K (2011). Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18168–18172.

- Mata NL, Radu RA, Clemmons RC, Travis GH (2002). Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* **36**: 69–80.
- Mathias RT, Kistler J, Donaldson P (2007). The Lens Circulation. *J Membr Biol* **216**: 1–16.
- Mathias RT, Rae JL, Baldo GJ (1997). Physiological properties of the normal lens. *Physiol Rev* **77**: 21–50.
- Mathias RT, Rae JL, Ebihara L, McCarthy RT (1985). The localization of transport properties in the frog lens. *Biophys J* **48**: 423–434.
- Matsui H, Lin L-R, Singh DP, Shinohara T, Reddy VN (2001). Lens Epithelium-Derived Growth Factor: Increased Survival and Decreased DNA Breakage of Human RPE Cells Induced by Oxidative Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 2935–2941.
- McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK (1999). Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 94–99.
- McHugh D, Flemming R, Xu S-Z, Perraud A-L, Beech DJ (2003). Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J Biol Chem* **278**: 11002–11006.
- McNulty S, Fonfria E (2005). The role of TRPM channels in cell death. *Pflüg Arch* **451**: 235–242.
- Meissner A, Noack T (2008). Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage-gated calcium channels. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **457**: 47–59.
- Michael R, Bron AJ (2011). The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **366**: 1278–1292.
- Miller SS, Edelman JL (1990). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol* **424**: 283–300.
- Miller S, Farber D (1984). Cyclic AMP modulation of ion transport across frog retinal pigment epithelium. Measurements in the short-circuit state. *J Gen Physiol* **83**: 853–874.
- Miller SS, Steinberg RH (1977a). Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **25**: 235–248.
- Miller SS, Steinberg RH (1977b). Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* **36**: 337–372.
- Minke B, Wu C-F, Pak WL (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* **258**: 84–87.
- Mitchell CH (2001). Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol* **534**: 193–202.

- Mitchell CH, Reigada D (2008). Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE. *Purinergic Signal* **4**: 101–107.
- Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, *et al.* (2009). A Pathogenic C Terminus-truncated Polycystin-2 Mutant Enhances Receptor-activated Ca²⁺ Entry via Association with TRPC3 and TRPC7. *J Biol Chem* **284**: 34400–34412.
- Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma J (2005). RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12413–12418.
- Montalbetti N, Cantero MR, Dalghi MG, Cantiello HF (2008). Reactive Oxygen Species Inhibit Polycystin-2 (TRPP2) Cation Channel Activity In Term Human Syncytiotrophoblast. *Placenta* **29**: 510–518.
- Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay FS (1990). Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium* **11**: 157–179.
- Morita H, Honda A, Inoue R, Ito Y, Abe K, Nelson MT, *et al.* (2007). Membrane Stretch-Induced Activation of a TRPM4-Like Nonselective Cation Channel in Cerebral Artery Myocytes. *J Pharmacol Sci* **103**: 417–426.
- Nagaraj NS, Datta PK (2010). Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 77–91.
- Namkung W, Phuan P-W, Verkman AS (2011). TMEM16A Inhibitors Reveal TMEM16A as a Minor Component of Calcium-activated Chloride Channel Conductance in Airway and Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* **286**: 2365–2374.
- Naziroğlu M, Lückhoff A (2008). A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res* **33**: 1256–1262.
- Naziroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E (2007). Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct* **25**: 383–387.
- Naziroğlu M (2011). TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* **36**: 355–366.
- Naziroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E (2011). Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol* **241**: 69–75.
- Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007). Activation Properties of Heterologously Expressed Mammalian TRPV2 EVIDENCE FOR SPECIES DEPENDENCE. *J Biol Chem* **282**: 15894–15902.
- Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799–802.
- Nernst W (1888). Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper. Theorie der Diffusion. *Z Für Chem Phys* **2**: 613–637.

- Neussert R, Müller C, Milenkovic VM, Strauss O (2010). The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER. *Pflugers Arch* **460**: 163–175.
- Nilius B, Droogmans G (2001). Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *Physiol Rev* **81**: 1415–1459.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007). Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol Rev* **87**: 165–217.
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, *et al.* (2003). Voltage Dependence of the Ca²⁺-activated Cation Channel TRPM4. *J Biol Chem* **278**: 30813–30820.
- Nita M, gorzata, Grzybowski A (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev* **2016**: e3164734.
- Noorani MMZ, Noel RC, Marrelli SP (2011). Upregulated TRPC3 and Downregulated TRPC1 Channel Expression during Hypertension is Associated with Increased Vascular Contractility in Rat. *Front Physiol* **2**: 42.
- North RA (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev* **82**: 1013–1067.
- Numata T, Kiyonaka S, Kato K, Takahashi N, Mori Y (2011). Activation of TRP Channels in Mammalian Systems. In: Zhu MX (ed) *TRP Channels*, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton (FL), p .
- Numberger M, Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Oh U, Jung J (2016). Cellular functions of TMEM16/anoctamin. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **468**: 443–453.
- O'Malley D, Harvey J (2004). Insulin activates native and recombinant large conductance Ca(2+)-activated potassium channels via a mitogen-activated protein kinase-dependent process. *Mol Pharmacol* **65**: 1352–1363.
- Ooi A, Wong A, Esau L, Lemtiri-Chlieh F, Gehring C (2016). A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. *Front Physiol* **7**.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 552–565.
- Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y, Roussa E, Schreiber R, Cook DI, *et al.* (2011). Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na⁺ absorption. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **461**: 579–589.
- Ozawa T (2010). Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review). *Mol Med Rep* **3**: 199–204.

- Parver LM (1991). Temperature modulating action of choroidal blood flow. *Eye Lond Engl* **5** (Pt 2): 181–185.
- Parver LM, Auker C, Carpenter DO (1980). Choroidal Blood Flow As a Heat Dissipating Mechanism in the Macula. *Am J Ophthalmol* **89**: 641–646.
- Pedemonte N, Galiotta LJV (2014). Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol Rev* **94**: 419–459.
- Pelucchi B, Aguiari G, Pignatelli A, Manzati E, Witzgall R, Senno L del, *et al.* (2006). Nonspecific Cation Current Associated with Native Polycystin-2 in HEK-293 Cells. *J Am Soc Nephrol* **17**: 388–397.
- Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, *et al.* (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**: 1169–1176.
- Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS (1997). Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **17**: 2324–2337.
- Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, *et al.* (1998). Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* **19**: 241–247.
- Pfeffer BA, Clark VM, Flannery JG, Bok D (1986). Membrane receptors for retinol-binding protein in cultured human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 1031–1040.
- Philp NJ, Yoon H, Grollman EF (1998). Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *Am J Physiol* **274**: R1824–R1828.
- Pifferi S, Dibattista M, Menini A (2009). TMEM16B induces chloride currents activated by calcium in mammalian cells. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **458**: 1023–1038.
- Pineda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Loeza-Alcocer E, Torres-López JE, Rocha-González HI, Pérez-Severiano F, *et al.* (2015). Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Mol Pain* **11**: 41.
- Plafker SM, O’Mealey GB, Szweda LI (2012). Mechanisms for counteracting oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* **298**: 135–177.
- Pleyer U (2014). *Entzündliche Augenerkrankungen*. Springer-Verlag.
- Prawitt D, Monteilh-Zoller MK, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, *et al.* (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 15166–15171.
- Puertollano R, Kiselyov K (2009). TRPMLs: in sickness and in health. *Am J Physiol - Ren Physiol* **296**: F1245–F1254.

- Purkiss JR, Willars GB (1996). Ionomycin induced changes in intra-cellular free calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: sources of calcium and effects on [3H]-noradrenaline release. *Cell Calcium* **20**: 21–29.
- Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**: 6231–6238.
- Qu Z, Fischmeister R, Hartzell C (2004). Mouse Bestrophin-2 Is a Bona fide Cl⁻ Channel. *J Gen Physiol* **123**: 327–340.
- Qu B, Zhang J (2003). [Expression and role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and ryanodine receptor in a human lens epithelial cell line]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi Chin J Ophthalmol* **39**: 389–394.
- Rae JL, Dewey J, Rae JS, Cooper K (1990). A maxi calcium-activated potassium channel from chick lens epithelium. *Curr Eye Res* **9**: 847–861.
- Rae JL, Mathias RT, Cooper K, Baldo G (1992). Divalent cation effects on lens conductance and stretch-activated cation channels. *Exp Eye Res* **55**: 135–144.
- Rae JL, Shepard AR (1998). Molecular biology and electrophysiology of calcium-activated potassium channels from lens epithelium. *Curr Eye Res* **17**: 264–275.
- Rajini B, Shridas P, Sundari CS, Muralidhar D, Chandani S, Thomas F, *et al.* (2001). Calcium binding properties of gamma-crystallin: calcium ion binds at the Greek key beta gamma-crystallin fold. *J Biol Chem* **276**: 38464–38471.
- Rando RR (2001). The Biochemistry of the Visual Cycle. *Chem Rev* **101**: 1881–1896.
- Rao PV, Maddala R, John F, Zigler JS (2004). Expression of nonphagocytic NADPH oxidase system in the ocular lens. *Mol Vis* **10**: 112–121.
- Reed NA, Castellini MA, Ma H, Shearer TR, Duncan MK (2003). Protein expression patterns for ubiquitous and tissue specific calpains in the developing mouse lens. *Exp Eye Res* **76**: 433–443.
- Reichhart N, Keckeis S, Fried F, Fels G, Strauss O (2015). Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **253**: 865–874.
- Reigada D, Lu W, Zhang X, Friedman C, Pendrak K, McGlenn A, *et al.* (2005). Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol - Cell Physiol* **289**: C617–C624.
- Reneker LW, Chen H (2010). Calpain and Caspase-12 Activation Mediates Apoptosis in Transgenic Mouse Lens Expressing a Dominant-Negative Mutant of FGFR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 2617–2617.
- Rhodes JD, Collison DJ, Duncan G (2003). Calcium Activates SK Channels in the Intact Human Lens. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **44**: 3927.

- Rhodes JD, Russell SL, Illingworth CD, Duncan G, Wormstone IM (2009). Regional differences in store-operated Ca²⁺ entry in the epithelium of the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 4330–4336.
- Rhodes JD, Sanderson J (2009). The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. *Exp Eye Res* **88**: 226–234.
- Richiert DM, Ireland ME (1999). TGF-beta elicits fibronectin secretion and proliferation in cultured chick lens epithelial cells. *Curr Eye Res* **18**: 62–71.
- Rizzolo LJ (1997). Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol Histopathol* **12**: 1057–1067.
- Rizzolo LJ (2008). Glucose Transporters in Retinal Pigment Epithelium Development. In: Phd JT-T, Dphil CJB (eds) *Ocular Transporters In Ophthalmic Diseases And Drug Delivery*, Ophthalmology Research. Humana Press, pp 185–199.
- Roedding AS, Gao AF, Au-Yeung W, Scarcelli T, Li PP, Warsh JJ (2012). Effect of oxidative stress on TRPM2 and TRPC3 channels in B lymphoblast cells in bipolar disorder. *Bipolar Disord* **14**: 151–161.
- Rosenthal R, Bakall B, Kinnick T, Peachey N, Wimmers S, Wadelius C, *et al.* (2006). Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **20**: 178–180.
- Rosenthal R, Malek G, Salomon N, Peill-Meininghaus M, Coeppicus L, Wohlleben H, *et al.* (2005). The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 241–247.
- Rosenthal R, Thieme H, Strauss O (2001). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in brain neurons and retinal pigment epithelial cells act via stimulation of neuroendocrine L-type channels (Ca(v)1.3). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **15**: 970–977.
- Rosenthal R, Wohlleben H, Malek G, Schlichting L, Thieme H, Bowes Rickman C, *et al.* (2004). Insulin-like growth factor-1 contributes to neovascularization in age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 1203–1208.
- van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2000). Ca²⁺ entry mediated by store depletion, S-nitrosylation, and TRP3 channels. Comparison of coupling and function. *J Biol Chem* **275**: 28562–28568.
- Ryan JS, Baldrige WH, Kelly MEM (1999). Purinergic regulation of cation conductances and intracellular Ca²⁺ in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *J Physiol* **520**: 745–759.
- Sagheddu C, Boccaccio A, Dibattista M, Montani G, Tirindelli R, Menini A (2010). Calcium concentration jumps reveal dynamic ion selectivity of calcium-activated chloride currents in mouse olfactory sensory neurons and TMEM16b-transfected HEK 293T cells. *J Physiol* **588**: 4189–4204.

- Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Nichols CG, Brett TJ (2015). Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca(2+)-dependent chloride currents in human cells. *eLife* **4**.
- Sanderson J, Duncan G (1993). pCMPS-induced changes in lens membrane permeability and transparency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**: 2518–2525.
- Sanderson J, Marcantonio JM, Duncan G (1996). Calcium Ionophore Induced Proteolysis and Cataract: Inhibition by Cell Permeable Calpain Antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 893–901.
- Sanderson J, Marcantonio JM, Duncan G (2000). A Human Lens Model of Cortical Cataract: Ca²⁺-Induced Protein Loss, Vimentin Cleavage and Opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 2255–2261.
- Sanderson J, McLauchlan WR, Williamson G (1999). Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. *Free Radic Biol Med* **26**: 639–645.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011). TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci Lond Engl 1979* **121**: 233–251.
- Schey KL, Wang Z, Wenke JL, Qi Y (2014). Aquaporins in the eye: Expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 1513–1523.
- Schreiber R, Kunzelmann K (2016). Expression of anoctamins in retinal pigment epithelium (RPE). *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **468**: 1921–1929.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* **134**: 1019–1029.
- Scudieri P, Caci E, Venturini A, Sondo E, Pianigiani G, Marchetti C, *et al.* (2015). Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms. *J Physiol* **593**: 3829–3848.
- Scudieri P, Sondo E, Caci E, Ravazzolo R, Galletta LJV (2013). TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels. *Biochem J* **452**: 443–455.
- Shahidullah M, Mandal A, Delamere NA (2012). TRPV4 in porcine lens epithelium regulates hemichannel-mediated ATP release and Na-K-ATPase activity. *Am J Physiol - Cell Physiol* **302**: C1751–C1761.
- Sharma AK, Rohrer B (2004). Calcium-induced Calpain Mediates Apoptosis via Caspase-3 in a Mouse Photoreceptor Cell Line. *J Biol Chem* **279**: 35564–35572.
- Sharma KK, Santhoshkumar P (2009). Lens Aging: Effects of Crystallins. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1095–1108.
- Shearer T, Ma H, Shih M, Fukiage C, Azuma M (2000). Calpains in the Lens and Cataractogenesis. In: Elce J (ed) *Calpain Methods and Protocols*, Methods in Molecular BiologyTM. Humana Press, pp 277–285.

- Shen D, Wang X, Li X, Zhang X, Yao Z, Dibble S, *et al.* (2012). Lipid Storage Disorders Block Lysosomal Trafficking By Inhibiting TRP Channel and Calcium Release. *Nat Commun* **3**: 731.
- Shridas P, Sharma Y, Balasubramanian D (2001). Transglutaminase-mediated cross-linking of α -crystallin: structural and functional consequences. *FEBS Lett* **499**: 245–250.
- Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 190724.
- Smith AJO, Ball SSR, Bowater RP, Wormstone IM (2016). PARP-1 inhibition influences the oxidative stress response of the human lens. *Redox Biol* **8**: 354–362.
- Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR (2009). A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* **4**: 662–673.
- Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP (2010). The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Curr Mol Med* **10**: 802–823.
- Spector A (1995). Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* **9**: 1173–1182.
- Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS (2003). Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 2803–2808.
- Steinberg RH (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* **60**: 327–346.
- Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, Cygnar KD, Reisert J, Zhao H (2009). ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 11776–11781.
- Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT (1989). Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res* **8**: 1029–1037.
- Stocker M (2004). Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* **5**: 758–770.
- Stöhr H, Heisig JB, Benz PM, Schöberl S, Milenkovic VM, Strauss O, *et al.* (2009). TMEM16B, A Novel Protein with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity, Associates with a Presynaptic Protein Complex in Photoreceptor Terminals. *J Neurosci* **29**: 6809–6818.
- Strauss O (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev* **85**: 845–881.

- Strauss O, Steinhausen K, Mergler S, Stumpff F, Wiederholt M (1999). Involvement of protein tyrosine kinase in the InsP₃-induced activation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* **169**: 141–153.
- Strauss O, Wiederholt M, Wienrich M (1996). Activation of Cl⁻ Currents in Cultured Rat Retinal Pigment Epithelial Cells by Intracellular Applications of Inositol-1,4,5-triphosphate: Differences Between Rats with Retinal Dystrophy (RCS) and Normal Rats. *J Membr Biol* **151**: 189–200.
- Streeten BW, Eshaghian J (1978). Human Posterior Subcapsular Cataract: A Gross and Flat Preparation Study. *Arch Ophthalmol* **96**: 1653–1658.
- Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* **42**: 487–495.
- Sullivan DM, Erb L, Anglade E, Weisman GA, Turner JT, Csaky KG (1997). Identification and characterization of P₂Y₂ nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res* **49**: 43–52.
- Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, *et al.* (2011). Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca²⁺ release. *FASEB J*: fj.10-178483.
- Sumoza-Toledo A, Penner R (2011). TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* **589**: 1515–1525.
- Sun H, Harris WT, Kortyka S, Kotha K, Ostmann AJ, Rezayat A, *et al.* (2014). TGF-Beta Downregulation of Distinct Chloride Channels in Cystic Fibrosis-Affected Epithelia. *PLOS ONE* **9**: e106842.
- Sun Y, Sukumaran P, Selvaraj S, Cilz NI, Schaar A, Lei S, *et al.* (2016). TRPM2 Promotes Neurotoxin MPP⁺/MPTP-Induced Cell Death. *Mol Neurobiol*: 1–12.
- Sun H, Tsunenari T, Yau K-W, Nathans J (2002). The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 4008–4013.
- Sun L, Yau H-Y, Wong W-Y, Li RA, Huang Y, Yao X (2012). Role of TRPM2 in H₂O₂-Induced Cell Apoptosis in Endothelial Cells. *PLOS ONE* **7**: e43186.
- Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **468**: 834–838.
- Suzuki-Kerr H, Lim JC, Donaldson PJ (2010). Purinergic Receptors in the Rat Lens: Activation of P₂X Receptors following Hyperosmotic Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 4156–4163.
- Suzuki-Kerr H, Vlajkovic S, Donaldson PJ, Lim J (2008). Molecular identification and localization of P₂X receptors in the rat lens. *Exp Eye Res* **86**: 844–855.
- Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y (2011). Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* **50**: 279–287.

- Tamada Y, Fukiage C, Nakamura Y, Azuma M, Kim YH, Shearer TR (2000). Evidence for Apoptosis in the Selenite Rat Model of Cataract. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 300–306.
- Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N (1993). Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**: 413–419.
- Tian J, Ishibashi K, Honda S, Boylan SA, Hjelmeland LM, Handa JT (2005). The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br J Ophthalmol* **89**: 1510–1517.
- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, *et al.* (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* **25**: 1804–1815.
- Togashi K, Inada H, Tominaga M (2008). Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol* **153**: 1324–1330.
- Tran TDN, Zolochovska O, Figueiredo ML, Wang H, Yang L-J, Gimble JM, *et al.* (2014). Histamine-induced Ca²⁺ signalling is mediated by TRPM4 channels in human adipose-derived stem cells. *Biochem J* **463**: 123–134.
- Tseng SH, Yen JS, Chien HL (1994). Lens epithelium in senile cataract. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi* **93**: 93–98.
- Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, Yau K-W, *et al.* (2003). Structure-Function Analysis of the Bestrophin Family of Anion Channels. *J Biol Chem* **278**: 41114–41125.
- Turner HC, Guggenheim JA, Davies N, Candia OA (2003). Identification and Distribution of Rabbit Lens Epithelial Chloride Channels (CLC). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4473–4473.
- Ueda Y, Steinberg RH (1994). Chloride currents in freshly isolated rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **58**: 331–342.
- Ullrich ND, Voets T, Prenen J, Vennekens R, Talavera K, Droogmans G, *et al.* (2005). Comparison of functional properties of the Ca²⁺-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* **37**: 267–278.
- Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**.
- Van Heyningen R (1972). The human lens. I. A comparison of cataracts extracted in Oxford (England) and Shikarpur (W. Pakistan). *Exp Eye Res* **13**: 136–147.
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 321–329.

- Vivekanandan S, Lou MF (1989). Evidence for the presence of phosphoinositide cycle and its involvement in cellular signal transduction in the rabbit lens. *Curr Eye Res* **8**: 101–111.
- Volk T, Schwoerer AP, Thiessen S, Schultz J-H, Ehmke H (2003). A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **58**: 76–88.
- Vrensen GFJM (1995). Aging of the human eye lens—A morphological point of view. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **111**: 519–532.
- Vrensen GFJM, Wolf A de (1996). Calcium Distribution in the Human Eye Lens. *Ophthalmic Res* **28**: 78–85.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B (2009). Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. *Mol Pharmacol* **75**: 1262–1279.
- Wang T, Wang L, Moreno-Vinasco L, Lang GD, Siegler JH, Mathew B, *et al.* (2012). Particulate matter air pollution disrupts endothelial cell barrier via calpain-mediated tight junction protein degradation. *Part Fibre Toxicol* **9**: 35.
- Wang-Su S-T, McCormack AL, Yang S, Hosler MR, Mixon A, Riviere MA, *et al.* (2003). Proteome Analysis of Lens Epithelia, Fibers, and the HLE B-3 Cell Line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4829–4836.
- Watsky MA, Cooper K, Rae JL (1991). Sodium channels in ocular epithelia. *Pflugers Arch* **419**: 454–459.
- Webb KF, Donaldson PJ (2009). Whole-Cell Patch Clamping of Isolated Fiber Cells Confirms that Spatially Distinct Cl⁻ Influx and Efflux Pathways Exist in the Cortex of the Rat Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 3808–3818.
- Webb KF, Merriman-Smith BR, Stobie JK, Kistler J, Donaldson PJ (2004). Cl⁻ influx into rat cortical lens fiber cells is mediated by a Cl⁻ conductance that is not ClC-2 or -3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 4400–4408.
- Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A (2002). Activation of the cation channel LTRPC2 by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**: 463–472.
- Wen X, Ke Y, Zhao-hui S, Kai-jun W, Xing-chao S (2004). Expression and proteolytic activity of calpain in lens epithelial cells of oxidative cataract. *J Zhejiang Univ-Sci A* **5**: 743–748.
- Wenning AS, Neblung K, Strauss B, Wolfs M-J, Sappok A, Hoth M, *et al.* (2011). TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 412–423.

- Whitlock JM, Hartzell HC (2017). Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annu Rev Physiol* **79**: 119–143.
- WHO | Causes of blindness and visual impairment *WHO*.
- Wiecha J, Münz B, Wu Y, Noll T, Tillmanns H, Waldecker B (1998). Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor. *J Vasc Res* **35**: 363–371.
- Wiecha J, Reineker K, Reitmayer M, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, *et al.* (1998). Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human vascular cells by insulin and basic fibroblast growth factor. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc* **8**: 175–181.
- Wiederholt M, Zadunaisky JA (1984). Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res* **3**: 673–675.
- Wilkinson JA, Scragg JL, Boyle JP, Nilius B, Peers C (2008). H₂O₂-stimulated Ca²⁺ influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death. *Pflug Arch - Eur J Physiol* **455**: 1141–1151.
- Wimmers S, Karl MO, Strauss O (2007). Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res* **26**: 263–301.
- Wimmers S, Strauss O (2007). Basal Calcium Entry in Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by TRPC Channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 5767–5772.
- Wride MA (2011). Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **366**: 1219–1233.
- Wride MA, Sanders EJ (1998). Nuclear degeneration in the developing lens and its regulation by TNFalpha. *Exp Eye Res* **66**: 371–383.
- Wu J, Marmorstein AD, Peachey NS (2006). Functional abnormalities in the retinal pigment epithelium of CFTR mutant mice. *Exp Eye Res* **83**: 424–428.
- Xie Y-F, MacDonald JF, Jackson MF (2010). TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **2**: 95–103.
- Xu H, Delling M, Li L, Dong X, Clapham DE (2007). Activating mutation in a mucolipin transient receptor potential channel leads to melanocyte loss in varitint-waddler mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18321–18326.
- Xu M, Li X, Walsh SW, Zhang Y, Abais JM, Boini KM, *et al.* (2013). Intracellular two-phase Ca²⁺ release and apoptosis controlled by TRP-ML1 channel activity in coronary arterial myocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol* **304**: C458–C466.
- Xu W, Yao K, Sun Z, Wang K, Shentu X (2004). Expression and proteolytic activity of calpain in lens epithelial cells of oxidative cataract. *J Zhejiang Univ Sci* **5**: 743–748.
- Yan Q, Liu J-P, Wan-Cheng Li D (2006). Apoptosis in lens development and pathology. *Differentiation* **74**: 195–211.

- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim W-S, *et al.* (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* **455**: 1210–1215.
- Yang H, Kim A, David T, Palmer D, Jin T, Tien J, *et al.* (2012). TMEM16F Forms a Ca²⁺-Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation. *Cell* **151**: 111–122.
- Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J (2006). Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene* **25**: 7235–7244.
- Yang M-J, Wang F, Wang J-H, Wu W-N, Hu Z-L, Cheng J, *et al.* (2010). PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E193-201.
- Yanoff M, Duker JS (2009). *Ophthalmology*. Elsevier Health Sciences.
- Yao K, Tan J, Gu W, Ye P-P, Wang K (2007). Reactive oxygen species mediates the apoptosis induced by transforming growth factor β 2 in human lens epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 278–283.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134.
- Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I (1984a). Limited proteolysis of bovine lens alpha-crystallin by calpain, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, isolated from the same tissue. *Biochim Biophys Acta* **798**: 252–259.
- Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I (1984b). Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett* **170**: 259–262.
- Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I (1985). Distribution of calpain I, calpain II, and calpastatin in bovine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**: 953–956.
- Young RW (1971). THE RENEWAL OF ROD AND CONE OUTER SEGMENTS IN THE RHESUS MONKEY. *J Cell Biol* **49**: 303–318.
- Yu K, Xiao Q, Cui G, Lee A, Hartzell HC (2008). The Best Disease-Linked Cl Channel hBest1 Regulates Cav1 (L-type) Ca²⁺ Channels Via SH3-binding Domains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**: 5660–5670.
- Yurtsever Z, Sala-Rabanal M, Randolph DT, Scheaffer SM, Roswit WT, Alevy YG, *et al.* (2012). Self-cleavage of human CLCA1 protein by a novel internal metalloprotease domain controls calcium-activated chloride channel activation. *J Biol Chem* **287**: 42138–42149.
- Zhang X, Cheng X, Yu L, Yang J, Calvo R, Patnaik S, *et al.* (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun* **7**: 12109.

- Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, *et al.* (2003). A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem* **278**: 16222–16229.
- Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun S-C, Penn L, *et al.* (2006). TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol - Cell Physiol* **290**: C1146–C1159.
- Zhang JJ, Jacob TJ (1994a). A new approach to measuring transepithelial potentials in the bovine lens reveals a chloride-dependent component. *Exp Physiol* **79**: 741–753.
- Zhang JJ, Jacob TJ (1994b). ATP-activated chloride channel inhibited by an antibody to P glycoprotein. *Am J Physiol - Cell Physiol* **267**: C1095–C1102.
- Zhang JJ, Jacob TJ (1996). Volume regulation in the bovine lens and cataract. The involvement of chloride channels. *J Clin Invest* **97**: 971–978.
- Zhang F, Jin S, Yi F, Li P-L (2009). TRP-ML1 functions as a lysosomal NAADP-sensitive Ca²⁺ release channel in coronary arterial myocytes. *J Cell Mol Med* **13**: 3174–3185.
- Zhang F, Li P-L (2007). Reconstitution and characterization of a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-sensitive Ca²⁺ release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem* **282**: 25259–25269.
- Zhang W, Schmelzeisen S, Parthier D, Frings S, Möhrle F (2015). Anoctamin Calcium-Activated Chloride Channels May Modulate Inhibitory Transmission in the Cerebellar Cortex. *PLOS ONE* **10**: e0142160.
- Zhang H, Wong CL, Shan SW, Li KK, Cheng AK, Lee KL, *et al.* (2011). Characterisation of Cl⁻ transporter and channels in experimentally induced myopic chick eyes. *Clin Exp Optom* **94**: 528–535.
- Zheng J, Trudeau MC (2015). *Handbook of Ion Channels*. CRC Press.
- Zhu X, Jiang M, Birnbaumer L (1998). Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* **273**: 133–142.
- Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD, *et al.* (2009). A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* **587**: 4905–4918.
- Zitt C, Obukhov AG, Strübing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Lückhoff A, *et al.* (1997). Expression of TRPC3 in Chinese Hamster Ovary Cells Results in Calcium-activated Cation Currents Not Related to Store Depletion. *J Cell Biol* **138**: 1333–1341.

6. Publikationen

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht.

Artikel:

Keckeis S*, Reichhart N*, Roubeix C, Strauß O (2017). Anoctamin2 (TMEM16B) forms the Ca(2+)-activated Cl(-) channel in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **154**: 139–150.

Keckeis S, Wernecke L, Salchow DJ, Reichhart N, Strauß O (2017). Activation of a Ca(2+)-dependent cation conductance with properties of TRPM2 by reactive oxygen species in lens epithelial cells. *Exp Eye Res* **161**: 61–70.

Reichhart N, Keckeis S, Fried F, Fels G, Strauss O (2015). Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **253**: 865–874.

* geteilte Erstautorenschaft

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß. Er hat mich während der ganzen Zeit der Dissertation mit unermüdlichem Optimismus betreut und motiviert und hatte stets, auch in stressigen Zeiten, ein offenes Ohr für mich. Er war in vielerlei Hinsicht ein großartiges Vorbild. Danke auch an Frau Dr. Nadine Reichhart, die tatkräftig bei der Betreuung meiner Doktorarbeit geholfen hat. Einen großen Dank möchte ich auch Frau Prof. Dr. Ursula Koch aussprechen, die mir ermöglicht hat, meinen naturwissenschaftlichen Doktor an der Freien Universität Berlin absolvieren zu können.

Herr Prof. Dr. Daniel Salchow und Herr PD Dr. Eckart Bertelmann haben durch die Bereitstellung von Linsenkapseln einen Teil der Arbeit erst ermöglicht. Herzlichen Dank hierfür. Ich möchte außerdem meinen lieben Kollegen für eine schöne Zeit und gegenseitige Unterstützung danken. Danke an Magda für die tägliche kleine und schöne Auszeit, und an Laura, die mit mir um jede Linse gebangt hat. Vielen Dank an Talitha, die mir nicht nur eine liebe Kollegin sondern auch Freundin war. Der rege Austausch mit ihr, auf privater und wissenschaftlicher Ebene, hat mich unglaublich bestärkt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Partner und meiner Familie bedanken, die mich unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben, und bei allen weiteren lieben Menschen, die, in welcher Weise auch immer, zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

8. Anhang

8.1 Pharmakologisches Profil des untersuchten Kationenkanals in Linsenepithelzellen

	Gefundener Ionenkanal	TRPC3	TRPM2	TRPM4
Genexpression in HLE B-3 Zellen		+	+	+
Genexpression in primären Linsenepithelzellen		+	+	+
Strom-Spannungsbeziehung	Linear	Linear	Linear	Auswärts- rektifizierend
2-APB	+	+	+	n.a.
FFA	+	+	+	+
La ³⁺ 100µM	- (?)	+	- (?)	n.a.
La ³⁺ 500µM	+			
Rutheniumrot	-	-	n.a.	n.a.
DIDS	-	n.a.	n.a.	+
Amilorid	+	n.a.	n.a.	n.a.
9-Phenanthrol 30µM	+	-	n.a.	+
9-Phenanthrol 100µM	+	n.a.	n.a.	+
Spermin	-	n.a.	n.a.	+
Miconazol	+	n.a.	+	n.a.
Aktivierung durch H ₂ O ₂	+	+	+	n.a.
Quellen		(Zitt <i>et al.</i> , 1997; Zhu <i>et al.</i> , 1998; Balzer <i>et al.</i> , 1999; van Rossum <i>et al.</i> , 2000; Inoue <i>et al.</i> , 2001; Gonzales <i>et al.</i> , 2010; Roedding <i>et al.</i> , 2012; Lichtenegger <i>et al.</i> , 2013)	(Wehage <i>et al.</i> , 2002; Kraft <i>et al.</i> , 2004; Hill <i>et al.</i> , 2004; Naziroğlu <i>et al.</i> , 2007; Togashi <i>et al.</i> , 2008)	(Nilius <i>et al.</i> , 2003; Ullrich <i>et al.</i> , 2005; Morita <i>et al.</i> , 2007; Grand <i>et al.</i> , 2008)

+ : inhibitorischer Effekt; - : kein inhibitorischer Effekt; n.a.: nicht analysiert

	TRPM5	TRPML1	Polycystin-1/TRPP1	Ano6
Genexpression in HLE B-3 Zellen	+	+	+	+
Genexpression in primären Linsene­pithelzellen	–	+	+	+
Strom-Spannungsbeziehung	Auswärts- rektifizierend	Einwärts- rektifizierend	Linear	Auswärts- rektifizierend
2-APB	n.a.	–	+	+
FFA	+	n.a.	NFA: – (50 µM) + (500 µM)	–
La³⁺	<u>100µM</u> + <u>500µM</u>	+	+(?) +	n.a.
Rutheniumrot	n.a.	–	n.a.	+
DIDS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Amilorid	n.a.	+	+	n.a.
9-Phenanthrol	<u>100µM</u> – <u>30µM</u>	n.a. n.a.	n.a. n.a.	n.a. n.a.
Spermin	+	n.a.	n.a.	n.a.
Miconazol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Aktivierung durch H₂O₂	n.a.	+	–	n.a.
Quellen	(Pérez <i>et al.</i> , 2002; Prawitt <i>et al.</i> , 2003; Ullrich <i>et al.</i> , 2005; Grand <i>et al.</i> , 2008; Gonzales <i>et al.</i> , 2010)	(LaPlante <i>et al.</i> , 2002; Zhang and Li, 2007; Xu <i>et al.</i> , 2007; Dong <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2009; Dong <i>et al.</i> , 2009; Xu <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2016)	(Hanaoka <i>et al.</i> , 2000; González-Perrett <i>et al.</i> , 2001; Koulen <i>et al.</i> , 2002; Volk <i>et al.</i> , 2003; Pelucchi <i>et al.</i> , 2006; Montalbetti <i>et al.</i> , 2008)	(Yang <i>et al.</i> , 2012)

+ : inhibitorischer Effekt; – : kein inhibitorischer Effekt; n.a.: nicht analysiert

8.2 Sensitivität von Ano2 gegenüber T16A_{inh}-A01

8.2.1 Material und Methoden:

Zelllinien und Zellkultivierung

Die Zelllinien CHO (*chinese hamster ovary*) und HEK293 (*human embryonic kidney 293*) wurden als heterologe Expressionssysteme zur Untersuchung von Ano2 gewählt. Zu ihren Vorzügen zählen eine relativ einfache Handhabung, eine hohe Transfektionseffizienz und eine geringe Menge endogen exprimierter Ionenkanäle, weshalb sie bevorzugt für die Untersuchung von heterolog exprimierten Proteinen eingesetzt werden (Dalton & Barton, 2014; Ooi *et al.*, 2016). CHO- und HEK293-Zellen wurden in Vorbereitung auf die Experimente wie in 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben kultiviert.

Transiente Transfektion mit Plasmiden

CHO- oder HEK293-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % in FKS- und P/S-haltigem DMEM/Ham-F12 kultiviert. Sobald die gewünschte Zelldichte von CHO- beziehungsweise HEK293-Zellen erreicht war, wurde in getrennten Gefäßen 2,5 µl Plasmid (1 µg/µl) und 5 µl Lipofectamine 2000 in jeweils 1 ml Optimem verdünnt. Es wurde eine 2:1 Mischung aus Ano2- und grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Plasmid verwendet, für Kontrollexperimente lediglich GFP-Plasmid. 5 Minuten später wurden beide Lösungen vorsichtig gemischt und zur Liposomenbildung 20 Minuten stehen gelassen. Das Medium in den Vertiefungen wurde abpipettiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend das Liposomengemisch tropfenweise hinzugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Gemisch wieder abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden mindestens weitere 18 Stunden kultiviert, bevor sie erneut passagiert wurden. Die transfizierten Zellen wurden in 24-Loch-Platten auf Deckgläschen eines Durchmessers von 12 mm über Nacht kultiviert und anschließend für Patch-Clamp-Versuche verwendet. Für eine bessere Haftung der wenig adhärenenten HEK293-Zellen wurden jegliche Pipettierschritte mit besonderer Vorsicht durchgeführt und in allen beschriebenen Schritten die Vertiefungen zuvor mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Poly-L-Lysin wurde in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten in die Vertiefungen gegeben, welche anschließend zweimal gründlich mit PBS gewaschen wurden.

Elektrophysiologische Untersuchungen

Es wurden parallel mit GFP transfizierte Kontrollzellen und mit Ano2 sowie GFP transfizierte Zellen vorbereitet und Zellströme in der Ganzzellkonfiguration gemessen. Nach Zugabe von Ionomycin wurde abgewartet, ob es zu einem Stromanstieg kam. Im Falle eines Stromanstiegs wurden 10 μM T16A_{inh}-A01 zur Badlösung gegeben. Es wurden lediglich Zellen zur Messung verwendet, die eine Fluoreszenz auf GFP-spezifischer Wellenlänge und somit eine gelungene Transfektion aufwiesen. Die folgenden Lösungen wurden verwendet:

<u>Badlösung</u>	145,0	mM	NaCl
Nach Stöhr <i>et al.</i> (2009)	1,6	mM	K ₂ HPO ₄
	0,4	mM	KH ₂ PO ₄
	1,3	mM	Ca-Gluconat
	1,0	mM	MgCl ₂
	5,0	mM	Glukose (am Versuchstag hinzugefügt)
	Einstellen auf pH 7,2 mit Tris und filtrieren.		

<u>Pipettenlösung</u>	95,0	mM	K-Gluconat
Nach Stöhr <i>et al.</i> (2009)	30,0	mM	KCl
	4,8	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,2	mM	NaH ₂ PO ₄
	0,81	mM	Ca-Gluconat
	1,0	mM	EDTA
	5,0	mM	Glukose
	3,0	mM	ATP (am Versuchstag hinzufügen)
	Einstellen auf pH 7,2 mit KOH und sterilfiltrieren.		

8.2.2 Ergebnisse und Interpretation

Sowohl in CHO- als auch in HEK293-Kontrollzellen führte Ionomycin in einigen Zellen zu einer minimalen Erhöhung der Leitfähigkeit. CHO- oder HEK293-Zellen, die mit Ano2 transfiziert worden waren, reagierten auf die Ionomycin-Zugabe mit einem starken Stromanstieg. Zunächst wurde in erster Linie ein Auswärtsstrom induziert. Mit Verzögerung stieg zusätzlich der Einwärtsstrom. Die Zugabe von T16A_{inh}-A01 zu Beginn des Stromanstiegs beeinflusste den Effekt nicht.

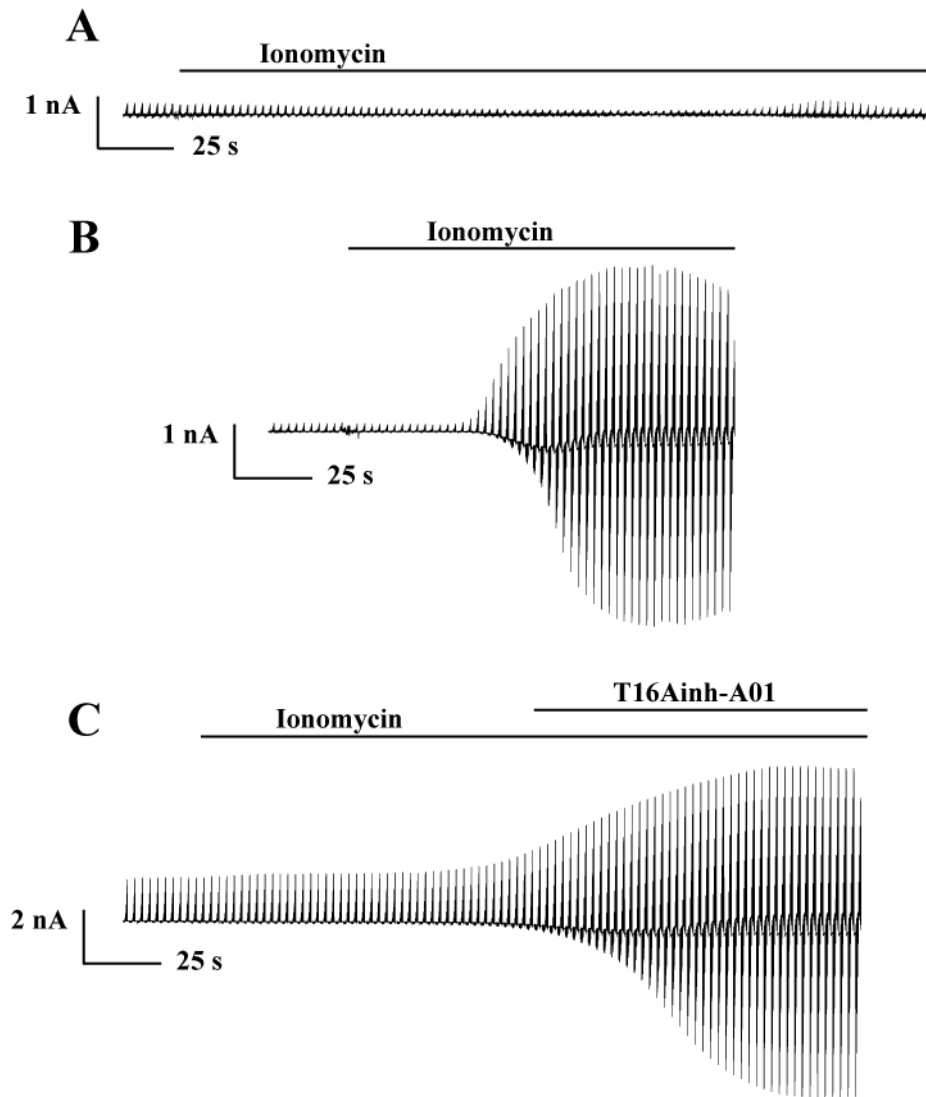


Abbildung 8.1: Effekt von 1 μM Ionomycin und T16A_{inh}-A01 auf die Leitfähigkeit von HEK293-Zellen. A: Repräsentative Stromantwort einer HEK293-Kontrollzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll unter Ionomycin-Zugabe. B: Repräsentative Stromantwort einer mit Ano2 transfizierten HEK293-Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll unter Ionomycin-Zugabe. C: Repräsentative Stromantwort einer mit Ano2 transfizierten HEK293-Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. Die Zugabe von T16A_{inh}-A01 führte zu keiner Reduktion des Ionomycin-induzierten Stroms.

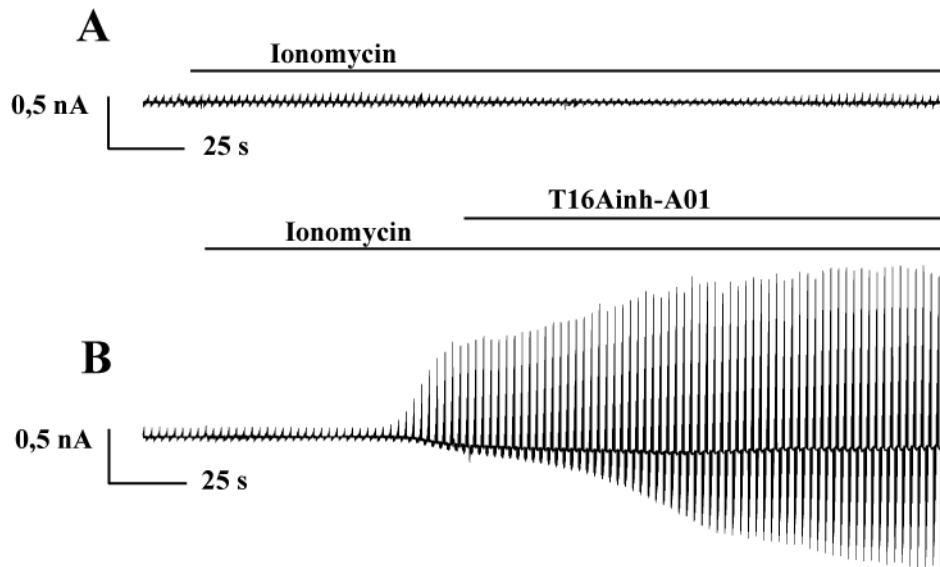


Abbildung 8.2: Effekt von 1 μM Ionomycin und T16A_{inh}-A01 auf heterolog exprimiertes Ano2. A: Repräsentative Stromantwort einer CHO-Kontrollzelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll unter Ionomycin-Zugabe. B: Repräsentative Stromantwort einer mit Ano2 transfizierten HEK293-Zelle auf ein Verlaufsspannungsprotokoll. Die Zugabe von T16A_{inh}-A01 führte zu keiner Reduktion des Ionomycin-induzierten Stroms.

8.3 Effizienz der Ano2-siRNA-Transfektion

8.3.1 Material und Methoden

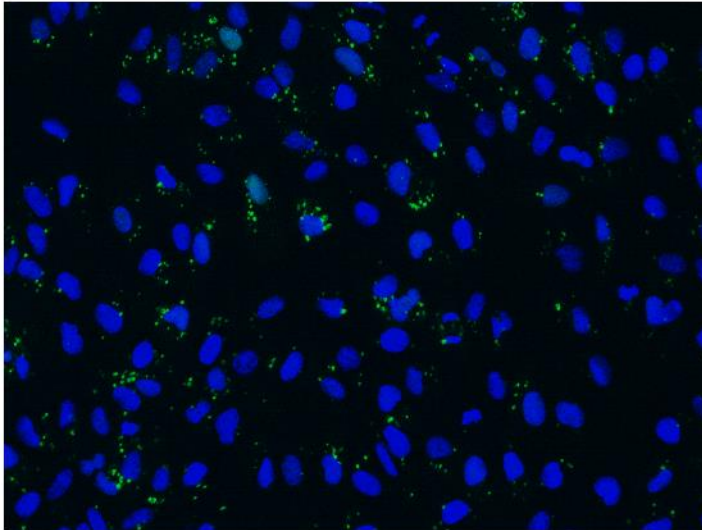
Färbung (DAPI), Mikroskopieren, Auswertung

ARPE-19 Zellen wurden in 24-Loch-Platten auf 12-mm-Deckgläsern wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben mit siRNA gegen Ano2 oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit TBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Nach erneutem Waschen (3x 5 Minuten) wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit einem Tropfen Eindeckmittel (Fluorescence Mounting Medium, Dako) auf einem Objektträger fixiert und bis zur mikroskopischen Detektion bei 4 °C aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer AxioCam MRm und der Software Zen pro 2002. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz der Zellen bestimmt. Jeder angefärbte Zellkern wurde als eine Zelle gezählt. Die Transfektion jeder einzelnen Zelle wurde als erfolgreich gewertet, wenn der Zellkern deutlich von fluoreszierenden Partikeln, welche die markierte siRNA darstellen, umgeben war. Es wurden jeweils drei Deckgläser mit transfizierten Zellen ausgewertet und der Mittelwert sowie die Standardfehler ermittelt.

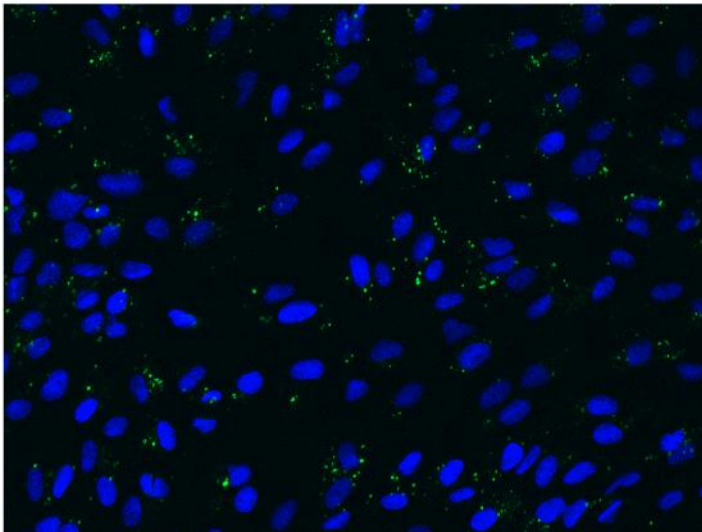
8.3.2 Ergebnisse

75,46 ± 1,82 % der ARPE-19 Zellen waren erfolgreich mit scrambled-siRNA und 75,40 ± 0,51 % mit Ano2-spezifischer siRNA transfiziert worden.

A scrambled siRNA



B Ano2 siRNA



C

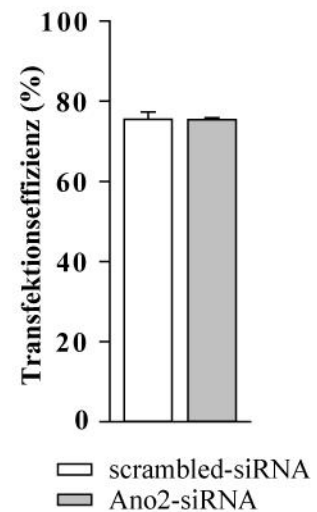


Abbildung 8.3: Transfektion von ARPE-19 Zellen mit Ano2- und Kontroll-siRNA. A, B: ARPE-19 Zellen, die mit scrambled- (A) oder Ano2-spezifischer (B) siRNA (grün) transfiziert und deren Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt wurden. C: Balkendiagramm, das die prozentuale Menge der erfolgreich mit siRNA transfizierten ARPE-19 Zellen darstellt (n=3, Mittelwerte ± SEM).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erstellt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 23.08.2016

Susanne Keckeis