

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren und transienten
Rezeptor Potenzial (TRP-) Kanälen auf die intrazelluläre
Calciumkonzentration in kultivierten, humanen uvealen
Melanomzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clara Andrea Budde

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Ein Teil der in dieser Monographie enthaltenen Daten und Ergebnisse wurde bereits in einer internationalen Zeitschrift mit Review Verfahren veröffentlicht.

Publikation 1: Walcher L, Budde C, Bohm A, Reinach PS, Dhandapani P, Ljubojevic N, Schweiger MW, von der Waydbrink H, Reimers I, Kohrle J, Mergler S. TRPM8 Activation via 3-Iodothyronamine Blunts VEGF-Induced Transactivation of TRPV1 in Human Uveal Melanoma Cells. *Front Pharmacol* 2018;9:1234.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1. Einleitung	1
1.1 Uveales Melanom	1
1.2 Wachstumsfaktoren	5
1.2.1 Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)	6
1.2.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	8
1.3 Calciumhomöostase	10
1.4 Transient Rezeptor Potenzial (TRP)-Kanäle	12
1.4.1 TRPV-Kanäle	15
1.4.1.1 TRPV1	16
1.4.1.2 TRPV4	16
1.4.2 TRPM	17
1.4.2.1 TRPM8	18
1.5 Thyronamine (3-T₁AM)	19
2. Zielsetzung der Arbeit	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1 Zellmodell	23
3.1.2 Chemikalien und Lösungen	23
3.1.3 Geräte	25
3.2 Zellkultur	25
3.3 Fluoreszenzoptische Messungen (Calcium – Imaging)	26
3.4 Planare Patch-Clamp Technik	29
3.5 Datenanalyse und Statistik	32
4. Ergebnisse	34
4.1 Zellkultur und Morphologie der UM 92.1 Zellen	34
4.2 Funktionelle Calciumregulation in UM 92.1 Zellen	34
4.3 Wirkung von Lanthanum auf die Calciumhomöostase in 92.1 Zellen	36
4.4 Expression von TRPV4 in uvealen Melanomzellen	37
4.5 VEGF aktiviert TRPV1 Kanäle aber nicht TRPV4 Kanäle	39
4.6 FGF-2 aktiviert TRPV1 und TRPV4 Kanäle	43
4.7 3-T₁AM Wirkung auf die VEGF-induzierte Ca²⁺ Erhöhung	45
5. Diskussion	47
5.1 Zellmorphologie der UM 92.1 Zellen	47
5.2 Funktionelle Calciumregulation in UM 92.1 Zellen	48
5.3 Funktionelle Expression von TRPV4 in UM 92.1 Zellen	49
5.4 FGF-2 aktiviert TRPV1 und TRPV4	51
5.5 VEGF aktiviert TRPV1	53
5.6 3-T₁AM Wirkung	54
5.7 Limitationen	55
5.8 Weiterer Forschungsbedarf / Ausblick	58
Quellenverzeichnis	IX

Eidesstattliche Erklärung	XXVII
Anteilerklärung	XXVIII
Lebenslauf	XXIX
Publikationen	XXXI
Danksagung	XXXII

Abkürzungen

AMTB	N-(3-Aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methoxy]-N-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride
BCTC	N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
CAP	Capsaicin
Cl ⁻	Chlorid
CPZ	Capsazepin
CRAC	Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ channel, durch Ca ²⁺ Freisetzung aktivierter Calciumkanal
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK 1 / 2	Extracellular signal regulated kinase 1 / 2
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FGF-2	Fibroblast Growth Factor -2 (bFGF=Bindegewebswachstumsfaktor)
f ₃₄₀ /f ₃₈₀	Fluoreszenzquotient zwischen 340 und 380 nm
Fura-2/AM	Fura-2/acetoxymethylester
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSK 1016790A	Glaxosmithkline 1016790A (potenter spezifischer TRPV4 Agonist)
GSK 2193874	Glaxosmithkline 2193874 (spezifischer TRPV4 Antagonist)
HiF	Hypoxie induzierter Faktor (Transkriptionsfaktor)
K ⁺	Kalium
KCNQ	Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle
La ³⁺	Lanthanum-III-Chorid
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Transkriptionsfaktor)
ORAI	Calcium release – activated calcium ion channel Gen, kodiert für CRAC Kanäle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase (= Membranständige Calciumpumpe)
ROI	Region of interest

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR (RNA abhängige DNA Polymerase)
SD	Standard deviation (Standardfehler)
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler/ \sqrt{n})
SOCE	Store operated calcium entry (Calciumspeicherfreisetzung)
STIM	Stromal interaction molecule
TAAR	Trace amine associated receptor
T ₁ AM	3-Iodothyronamin
TRP	Transient Rezeptor Potenzial
TRPs	Transient Rezeptor Potenzial Kanäle
TRPV	TRP Vanilloid Rezeptor
TRPV1	TRP Vanilloid Rezeptor Subtyp 1 (Capsaicinrezeptor)
TRPV4	TRP Vanilloid Rezeptor Subtyp 4 (Osmosensor)
TRPM	TRP Melastatin Rezeptor
TRPM8	TRP Melastatin Rezeptor Subtyp 8 (Mentholrezeptor)
TTT	Transpupilläre Thermotheapie
UM	Uveales Melanom/ Aderhautmelanom
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Anatomie des Auges mit Darstellung häufiger UM Lokalisationen und Risikofaktoren sowie typischer Symptome. Jager et al., 2020 (Übersetzung C. Budde), Verwendung mit freundlicher Erlaubnis des Verlages [2] _____ 1
- Abbildung 2 A** Schematische Darstellung des Auges. Das uveale Melanom betrifft zumeist die Choroidea [5]. **B** Funduskopische Darstellung eines UM. Der Tumor zeichnet sich deutlich dunkler vom gesunden Augenhintergrund ab und ist dabei in charakteristischer Weise unscharf begrenzt und irregulär [6]. _____ 2
- Abbildung 3** Schematische Darstellung der VEGF-Proteine und ihrer Rezeptoren. Grafik von C.Budde auf Basis von Apte, R 2019 [43]. _____ 8
- Abbildung 4** Übersicht über zelluläre Calciumhomöostasemechnismen.. Grafik von C.Budde _____ 11
- Abbildung 5 A** Schematische Darstellung eines TRP Kanals, die einzelnen Subtypen unterscheiden sich in der Anzahl der Ankyrinwiederholungen. **B** TRP Kanaltetramer Grafik von C.Budde orientiert an Takahashi 2012 [64]. _____ 13
- Abbildung 6** Die TRP-Kanal Familie. Überblick über die bekannten Subtypen. Bisher konnte in UM Zellen die TRPM8 und TRPV1 Expression nachgewiesen werden. Grafik von C.Budde _____ 13
- Abbildung 7** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Fura-2AM gefärbten UM 92.1 Zellen. _____ 27
- Abbildung 8 A** Aufnahme des Calcium-Imaging Mikroskops und der Detektionseinheit im Messlabor. **B** Nahaufnahme der Badkammer während einer Messung. Der Deckgläschen mit den Zellen befindet sich auf dem Kammerboden, die Kammer ist mit Ringer ähnlicher Lösung gefüllt. (Fotos C. Budde) _____ 28
- Abbildung 9** Beispiel einer fluoreszenzoptischen Messung (f_{340}/f_{380}) mit vielen Einzelkurven ($n = 101$). _____ 29
- Abbildung 10 A** Aufbau des planaren Patch-Clamp-Systems mit eingesetztem Mikrochip und angeschlossener Elektrode (Nanion® Port-a-Patch). **B** NPC Mikrochip von unten gezeigt, dabei ist der Bereich erkennbar, in den die intrazelluläre Lösung mit einer Pipette eingesetzt wird. Bei den Experimenten wird der Chip dabei in der Hand

gehalten, um eine Beschädigung der Oberseite zu vermeiden. (Fotos C. Budde)

30

Abbildung 11 Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen; Grafik von C. Budde _____ 31

Abbildung 12 A Mikroskopische Aufnahmen der UM 92.1 Zelllinie in 40-facher Vergrößerung **B** Mikroskopische Aufnahmen der UM 92.1 Zelllinie in 100-facher Vergrößerung (Fotos S. Mergler) Skalierungsbalken 30 μm _____ 34

Abbildung 13 Calciumverminderung in UM 92.1 Zellen nach Zugabe von Ca^{2+} freier Lösung. _____ 35

Abbildung 14 Effekt von Lanthanum auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in UM Zellen 92.1, gemessen in Ringer-ähnlicher Lösung mittels Calcium-Imaging mit fura-2/AM gefärbten Zellen. _____ 36

Abbildung 15 Effekt von 10 μM GSK 1016790A In An- und Abwesenheit von 10 μM RN 1734 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in humanen UM Zellen (92.1), gemessen in Ringer-ähnlicher Lösung von mit 3 μM fura-2/AM gefärbten Zellen mittels Calcium-Imaging. _____ 37

Abbildung 16 RuR inhibiert die GSK1016790A-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. _____ 38

Abbildung 17 VEGF bewirkt eine TRPV1-Antwort in UM 92.1. Zellen [68]. _____ 39

Abbildung 18 Vergleich der Effekte von CPZ und AMTB auf die VEGF-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. _____ 41

Abbildung 19 Effekt von 10 ng/ml VEGF auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in An- und Abwesenheit von 10 μM RN 1734 in mit 3 μM fura-2/AM gefärbten humanen uvealen Melanomzellen (92.1) gemessen mittels Calcium-Imaging in Ringer-ähnlicher Lösung. _____ 42

Abbildung 20 Effekt von 20 ng/ml FGF-2 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in humanen uvealen Melanomzellen und Einfluss verschiedener Blocker auf die FGF-2 Wirkung; gemessen in Ringer ähnlicher Lösung mittels fura-2/AM vermitteltem Calcium-Fluoreszenz-Imaging. _____ 43

Abbildung 21 Vergleich der Effekte von CPZ und RN Sigma 1734 auf die FGF-2-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. _____ 44

Abbildung 22 VEGF- induzierte TRPV1-Aktivierung kann durch 3-T₁AM inhibiert werden in UM 92.1. Zellen [65]. _____ 45

Abbildung 23 3-T ₁ AM inhibiert die VEGF-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen [68].	46
Abbildung 24 Schematische Darstellung der Ca ²⁺ Signaltransduktion in UM Zellen anhand der Ergebnisse.	47
Abbildung 25 Mikroskopische Darstellung der UM 92.1 Zellen von De Waard et al 1995, mit freundlicher Erlaubnis des herausgebenden Verlages [153]	48

Zusammenfassung

EINLEITUNG: Das uveale Melanom (UM) oder Aderhautmelanom ist der häufigste intraokulare Tumor im Erwachsenenalter. Trotz erfolgreicher Lokalthherapie ist die Prognose aufgrund der hohen Metastasierungsrate ungünstig. Eine erfolgreiche systemische Therapie konnte bisher nicht etabliert werden. Mit der Tumorprogression wird eine Verschiebung der Homöostase zugunsten proangiogenetischer Faktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) diskutiert. Erhöhte VEGF Konzentrationen konnten mit erhöhter Metastasierungsrate assoziiert werden. Zellüberleben, Apoptose und Wachstum sind unter anderem calciumabhängig reguliert. Mittels *in vitro* elektrophysiologischen Methoden wie Patch-Clamp und Fluoreszenz-Calcium-Imaging wurden in verschiedenen Primärtumoren funktionelle Veränderungen in der *transient receptor potential* (TRP) - Kanalexpression nachgewiesen. TRP-Kanäle sind zumeist calciumpermeabel und an der Calciumhomöostase beteiligt. Dabei integrieren sie eine Vielzahl verschiedenartiger Stimuli.

FRAGESTELLUNG: Mergler et al. konnten zeigen, dass sich in mehreren UM Zelllinien im Gegensatz zur gesunden humanen Uvea (Aderhaut) eine erhöhte funktionelle TRP melastatin 8 (TRPM8) Kanalexpression andeutet. In dieser Arbeit wurde hierauf basierend untersucht, ob der TRP vanilloid 4 (TRPV4)-Kanal ebenfalls funktionell in den Zellen einer UM-Zelllinie exprimiert ist und ob eine Interaktion zwischen den Wachstumsfaktoren VEGF bzw. FGF-2 und den TRP Kanälen existiert.

METHODEN: Die Untersuchungen wurden an der etablierten UM-Zelllinie 92.1 durchgeführt. Messungen erfolgten mittels Fluoreszenz Calcium-Imaging und mittels planarer PatchClamp-Technik. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot und GraphPadPrism Software.

ERGEBNISSE: Extrazelluläre Applikation des hochspezifischen TRPV4 Agonisten GSK 101679A (10 μ M) erhöhte den Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} , welcher proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) ist. Außerdem erhöhten sich die Ganzzellströme. Dieser Effekt konnte durch den spezifischen TRPV4 Blocker GSK 2193874 (10 μ M) unterdrückt werden. Die extrazelluläre Applikation von FGF-2 (10 ng/ml) oder VEGF (20 ng/ml) führte zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und der Ganzzellströme. Beide Effekte konnten durch den TRP vanilloid 1 (TRPV1) Antagonisten Capsazepin (CPZ) unterdrückt werden. Die FGF-2 induzierten

Stromantworten konnten zusätzlich durch GSK 2193874 unterdrückt werden, die VEGF induzierten nicht. Schließlich wurde eine Inhibition der TRPV1 Kanäle durch TRPM8 Aktivierung nachgewiesen: Die durch extrazelluläre Applikation von VEGF induzierte Calciumantwort konnte in Gegenwart des Schilddrüsenhormonderivats 3-Iodothyronamin (T₁AM) unterdrückt werden, welches als TRPM8 Modulator gilt.

SCHLUSSFOLGERUNG: Eine funktionelle TRPV4 Expression in UM konnte erstmalig gezeigt werden. Die Funktion und Beteiligung von TRPV4 an der Tumorprogression bleibt in Folgearbeiten zu evaluieren. Die Wechselwirkung zwischen TRPV1 und TRPM8 ist im Hinblick auf die Entwicklung spezifischer Tumorthérapien interessant, da im Gegensatz zu TRPV1 im UM eine erhöhte Expression von TRPM8 vorliegt. Somit wäre eine zielgerichtete Medikation an entarteten Zellen mit TRPM8 Expression denkbar, wobei gesunde Zellen eher verschont würden. Ein Ausfall der Wirkungen des TRPM8 auf die Kältewahrnehmung dürfte in Anbetracht der Schwere des UM dabei eher gut zu verkraften sein.

LIMITATIONEN: Voraussetzung für solche derzeit eher spekulativ anzusehenden Einsatzgebiete ist allerdings die systematische Erforschung an Modellen, die teilweise erst etabliert werden müssen. Zu dieser wichtigen Aufgabe soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

Abstract

INTRODUCTION: Uveal (choroid) melanomas (UM) are the most common intraocular malignancy in adults. Despite successful local therapy, the prognosis remains poor due to high rates of metastasis. So far, there is no effective systemic therapeutic approach available. Tumour progression is associated with a shift towards higher concentrations of proangiogenic growth factors like vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2). Upregulation of VEGF was shown to be related to an increased metastatic tumour state. Cell survival, apoptosis and proliferation are regulated by a variety of pathways that include calcium-dependent mechanisms. Changes in functional expression of transient receptor potential channel (TRPs) for different primary malignancies were demonstrated using *in vitro* electrophysiological methods such as patch-clamp and fluorescence-calcium-imaging. TRPs are mostly permeable for calcium and involved in intracellular calcium homeostasis integrating different kinds of stimuli.

AIM OF THE STUDY: Mergler et al. found increased TRPM8 expression in different UM cell lines compared to healthy uveal tissue (choroid). Based on these findings, this study aimed to investigate the expression of TRPV4 in UM and a possible crosstalk between growth factors like VEGF and FGF-2 with TRPs.

METHODS: Recordings were performed using the established UM cell line 92.1. Recordings were made using fluorescence calcium-imaging and the planar patch-clamp-technique. For statistical analysis SigmaPlot und GraphPadPrism software were used.

RESULTS: Extracellular application of the selective TRPV4 channel agonist GSK 1016790A (10 μ M) increased the fluorescence ratio f_{340}/f_{380} , which is proportional to the intracellular Calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). Furthermore, whole-cell currents were increased. This effect was blocked by the selective TRPV4 antagonist GSK 2193874 (10 μ M). Extracelullar application of FGF-2 (10 ng/ml) or VEGF (20 ng/ml) led to increased $[Ca^{2+}]_i$ and whole-cell currents, which were inhibited by the TRP Vanilloid 1 (TRPV1) blocker capsazepin. The FGF-2-induced responses were blocked by GSK 2193874 whereas the VEGF-induced responses remained unchanged. Finally, an inhibitory effect on TRPV1 activity was shown by TRPM8 activation: The effect of extracellular application of VEGF was suppressed in presence of the thyroid hormone derivate 3-Iodothyronamin (T_1AM), which is described as a TRPM8 modulator.

CONCLUSION: For the first time, functional expression of TRPV4 in UM was shown. The function and role in tumour progression of TRPV4 remains to be elucidated. The crosstalk between TRPV1 und TRPM8 is interesting regarding the development of targeted therapies since functional expression of TRPM8 is at higher levels in UM. Therefore, the use of targeted TRPM8 medication affecting only malignant cells may be conceivable while healthy cells would be rather spared.

LIMITATIONS: Although currently, such a therapeutic option appear speculative, systematic investigations on models that have yet to be established are the basis of any progress in this area. This dissertation hopes to contribute to this daunting task.

1. Einleitung

1.1 Uveales Melanom

Das uveale Melanom (UM) (Abbildung 2B) ist mit einer jährlichen Inzidenz von 4,3 : 1 000 000 Einwohnern zwar ein seltener Tumor, aber der häufigste primäre intraokulare maligne Tumor im Erwachsenenalter mit einem Altersgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr [1]. Es entsteht wie das kutane Melanom aus entarteten Melanozyten, weist aber andere spezifische Mutationen auf, sodass es sich hierbei um eine eigene Entität handelt.

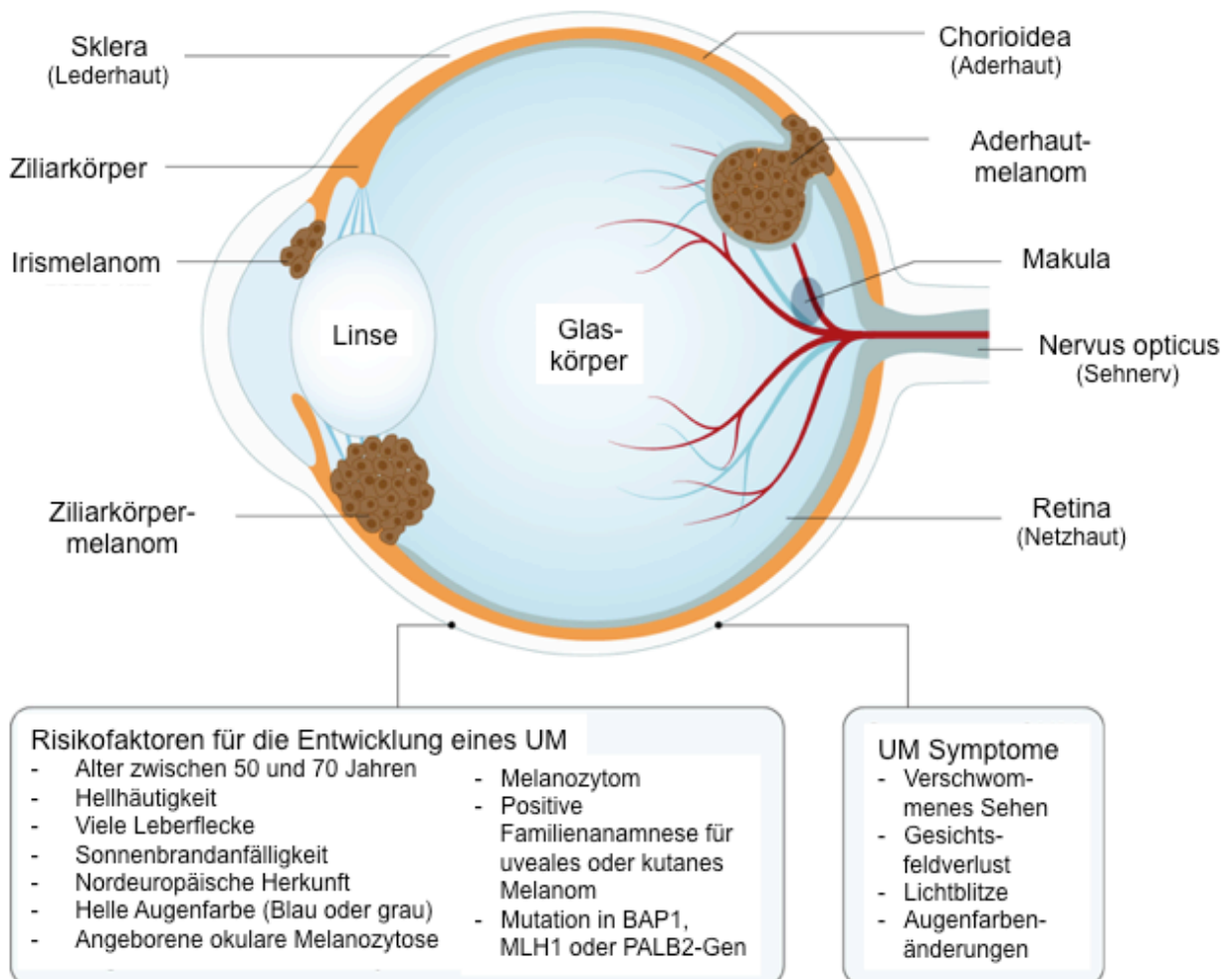


Abbildung 1 Anatomie des Auges mit Darstellung häufiger UM Lokalisationen und Risikofaktoren sowie typischer Symptome. Jager et al., 2020 (Übersetzung C. Budde), Verwendung mit freundlicher Erlaubnis des Verlages [2]

Typischerweise zeigt das UM Mutationen im GNA11 (45 %), GNAQ (42 %), CYSLTR2 (3 %), PLACbeta4 (4 %), BAP1 (43 %), EIF1AX (18 %) oder im SF3B1-Gen (18 %)[1]. Diese Moleküle sind Teil von Zellwachstumssignalkaskaden und tragen somit bei

Überaktivierung als Onkogene zum Tumorwachstum und Progression bei. Zudem tritt gehäuft eine Monosomie des Chromosoms 3 (54 %) und eine Verlängerung des langen Arms von Chromosom 8 (40 %) auf [1, 3].

Das UM entwickelt sich in der Uvea, der sogenannten Gefäßhaut des Auges (Abbildung 1). Diese umfasst die Regenbogenhaut (Iris), den Ziliarkörper (Corpus ciliare) und die Aderhaut (Choroidea) und befindet sich zwischen der Sklera und der Netzhaut und dient der Nährstoffversorgung. Das UM betrifft dabei zumeist die Choroidea (90 % der UM), seltener den Corpus ciliare (7 %) oder die Iris (3 %) (Abbildung 2A) [4]. Es tritt in der Regel einseitig auf und wird oft als Zufallsbefund diagnostiziert, da es sich erst spät symptomatisch mittels Komplikationen manifestiert. Typische Symptome sind dann eine Netzhautablösung, Akkommodations- und Refraktionsänderungen, sowie ein Sekundärglaukom. Bekannte Risikofaktoren sind das männliche Geschlecht, hohes Lebensalter, Hellhäutigkeit, blonde Haare, helle Augenfarbe und okuläre Nävi [3].

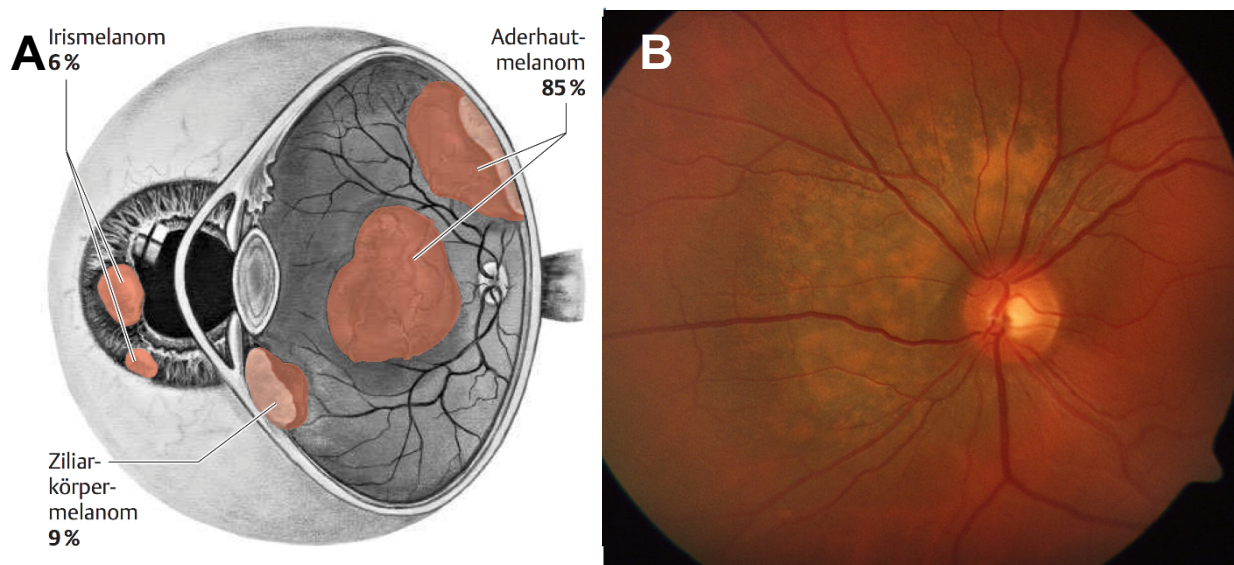


Abbildung 2 A Schematische Darstellung des Auges. Das uveale Melanom betrifft zumeist die Choroidea [5]. **B** Funduskopische Darstellung eines UM. Der Tumor zeichnet sich deutlich dunkler vom gesunden Augenhintergrund ab und ist dabei in charakteristischer Weise unscharf begrenzt und irregulär [6].

Die Diagnostik erfolgt mittels Diaphanoskopie, Ultraschall, optischer Kohärenztomographie (OCT) und Fluoreszenzangiographie (Abbildung 2B). Anhand von Genexpressionsuntersuchungen aus Biopsiematerial kann eine Hochrisiko- (BAP1-Mutationen, 72 % 5 Jahresmetastasierungsrate) und einer Niedrigrisikoform (SF3B1 und EIF1AX Mutationen, 2 % bzw. 21 % 5 Jahresmetastasierungsrate) unterschieden

werden [3]. Weitere prognostische Faktoren sind Tumorlokalisierung (Ziliarkörpermelanome haben eine ungünstige Prognose), Tumorgöße, Zelltyp, mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Architektur und Lymphozytenanzahl im Tumorgewebe (Abbildung 1) [4]. Das UM ist ein langsam wachsender Tumor und metastasiert hämatogen, wobei am häufigsten die Leber betroffen ist. Die 5 Jahresüberlebensrate beträgt 81,4 % in Europa [1].

Die Behandlung des Primärtumors erfolgt mittels Radiotherapie (Protonentherapie Brachytherapie, stereotaktische Radiochirurgie), adjuvanter transpupillärer Thermotherapie (TTT), lokaler Resektion oder Enukleation, wobei bei ähnlichen Langzeitergebnissen (> 90 %iger Therapieerfolg) die konservativen Therapieformen vorzuziehen sind. Trotz erfolgreicher Primärtherapie zeigt das UM weiterhin eine hohe Metastasierungsrate von 25 % bzw. 34 % nach 5 bzw. 10 Jahren [1]. Aufgrund fehlender Wirksamkeit aktuell verfügbarer systemischer Therapien ist die Prognose des metastatierten UM weiterhin ungünstig. Mit einer Lebenserwartung von 4 bis 15 Monaten unbehandelt nach Diagnosestellung [3] konnte auch trotz neuer Therapiekonzepte des Primärtumors keine Prognoseverbesserung erzielt werden, sodass hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

Für die Tumorentstehung konnten entsprechend der Kennzeichen von Krebs von Hanahan et al. 2000 [7] zunächst sechs Eigenschaften ermittelt werden, die bei der Entstehung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielen: Aufrechterhaltung proliferativer Signale, das Vermeiden von wachstumshemmenden Einflüssen, Aktivierung von Zellinvasion und Metastasierungswegen, replikative Unsterblichkeit, Angiogenese und das Verhindern des Zelltodes sowie Apoptosemechanismen. Hinzugekommen sind 2011 als weitere Kerneigenschaften eine Veränderung des Zellmetabolismus und ein Entgehen immuner Detektions- und Zerstörungsmechanismen. Als wesentliche Voraussetzungen sind Tumorzellen hierfür auf eine gewisse Genominstabilität und Mutationen sowie eine tumorfördernde Entzündungsumgebung angewiesen [8]. Derzeit werden in multiplen präklinischen und klinischen Studien Therapiekonzepte mit neuartigen Chemotherapien, Immunmodulatoren und RNA-Molekülen untersucht, die an auf diese Kernmerkmale abzielen. Es konnte jedoch bisher kein durchschlagender Erfolg erzielt werden [3, 9]. Die Prognose ist somit häufig weiterhin von dem Auftreten von Metastasen abhängig,

weshalb es notwendig ist die molekularbiologischen Abläufe des Metastasierungsprozesses besser zu verstehen. Da das UM aufgrund fehlender Lymphgefäße im Auge überwiegend hämatogen metastasiert, ist besonders das Verständnis dieses Metastasierungsweges zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte des UM von großer Bedeutung. Hierbei wird der Einfluss erhöhter Wachstumsfaktorspiegel, wie vascular endothelial growth factor (VEGF) oder fibroblast growth factor-2 (FGF-2) diskutiert. Dies entspricht gemäß der Kennzeichen für Krebs zwei der acht wesentlichen Kerneigenschaften: einerseits dem Aufrechterhalten eines proliferativen Milieus, sowie andererseits der Angiogeneseinduktion. In diesem Zusammenhang konnten bereits mehrfach in Studien höhere VEGF-Spiegel bei UM-Patienten nachgewiesen werden, wobei die VEGF Spiegel einer großen interpersonellen Varianz unterliegen, aber tendenziell im metastasierten Zustand ansteigen [10-12]. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Höhe der VEGF-A Konzentration gezeigt werden [13]. Dabei wird vermutet, dass VEGF durch erhöhte Gefäßbildung und damit zusammenhängende bessere Nährstoffversorgung das Tumorwachstum begünstigt. Dies wird als ein zentrales Kennzeichen von Krebs gedeutet, da insbesondere für solide Tumore Angiogenese als essenzieller Bestandteil der Tumorprogression angesehen wird. Dabei greift der Tumor in der Entstehungsphase zunächst auf bereits bestehende Gefäße zurück, mit zunehmender Größe ist er jedoch auf Angiogenese und damit Wachstumsfaktorsekretion bei begrenzter Diffusionsstrecke angewiesen [14]. Gleichzeitig konnte auch das Auftreten von vaskulärer Mimikry mit Bildung von flüssigkeitsleitenden Strukturen im extrazellulären Raum ohne Endothelauskleidung nachgewiesen und mit schlechter Prognose assoziiert werden [15, 16]. Ein autokriner wachstumsfördernder Effekt des VEGFs auf die UM Zellen konnte ebenfalls im UM Zellmodell gezeigt werden [17].

Interessanterweise zeigen sich auch nach Primärtherapie mittels TTT häufig erhöhte VEGF- Spiegel als Antwort auf die Therapie induzierte Ischämie [18, 19]. Inwieweit dies jedoch die Tumorprogression begünstigt, ist indes unklar. Durch die TTT mit Temperaturen > 43 – 52 °C werden Thermorezeptoren wie TRPV1 und TRPV2 aktiviert, wodurch in Nachbargeweben wie dem retinalen Pigmentepithel (RPE) über TRPV2 vermehrt VEGF-Freisetzung initiiert werden kann [20, 21]. Allerdings konnten Therapie bedingte Komplikationen wie Neovaskularisationen und dadurch bedingte Netzhautablösungen und -blutungen erfolgreich mit VEGF-Antikörpern behandelt

werden, wobei diese Therapie keine Vorteile für das Gesamtüberleben zeigte [19]. Hingegen konnte ein protektiver Effekt gegenüber oxidativem Stress von Bevacizumab [22, 23] auf Tumorzellen gezeigt werden, sodass paradoxerweise das Tumorwachstum durch die Antikörpertherapie gefördert statt wie erwartet gehemmt wurde [24]. Zudem wurde eine durch die Bevacizumabtherapie hervorgerufene Pseudohypoxie mit konsekutiv erhöhter VEGF-A Konzentration *in vivo* in Mäusen und *in vitro* in UM Zelllinien beobachtet [19]. In einer Arbeit von Yang et al. zeigte sich hingegen eine Reduktion des Tumorwachstums und von Mikrometastasen durch insbesondere frühzeitige Bevacizumabtherapie im Mausmodell. Auch zeigten sich *in vitro* geringere Zellproliferation und VEGF-Spiegel bei Bevacizumabinkubation [25]. In einer neuen Phase II Studie wurde die Überlebenszeit der Patienten mit metastasiertem UM durch Cabozantinib (einem Tyrosinkinase Inhibitor mit Wirkung an VEGF, MET und AXL-Rezeptoren) Therapie von 3,6 Monaten auf 12,6 Monate gesteigert [26].

1.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind eine inhomogene Gruppe von Botenstoffen, die zumeist Rezeptor vermittelt über intrazelluläre Signalkaskaden genregulatorisch wirken und hierdurch Zellwachstum, -teilung und Gewebedifferenzierung beeinflussen. Physiologisch steuern sie so Wachstums- und Reparaturprozesse, Gewebeerneuerung, Blutbildung und Gefäßausreifung. Allerdings können veränderte Wachstumsfaktorkonzentrationen auch zur Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen beitragen. So kann beispielweise ein erhöhter VEGF-Spiegel die Neovaskularisierung im Auge fördern und so zur diabetischen Retinopathie beitragen [22, 27, 28]. Auch wird ein Zusammenhang zwischen erhöhten VEGF-Spiegeln und Tumorprogression und Metastasierung diskutiert [10, 29]. Die einzelnen Wirkmechanismen sind dabei noch nicht vollständig verstanden, wobei davon ausgegangen wird, dass proangiogenetische Faktoren das Tumorwachstum durch eine verbesserte Vaskularisierung fördern und zugleich die Metastasierung hierüber begünstigen.

Für das UM konnten schon erhöhte FGF-2- und VEGF-Konzentrationen im Tumorgewebe und der Umgebung sowie dessen wachstumsfördernde Wirkung auf Endothelzellen nachgewiesen werden [30].

1.2.1 Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

Der Bindegewebswachstumsfaktor FGF-2 oder auch basic FGF (bFGF) ist ein potenter proangiogenetischer Faktor, der wie VEGF-A Gefäßneubildung fördert. Er gehört zu der 22 Mitglieder umfassenden FGF Familie [31], der am FGF Rezeptor (FGFR1 - 4) bindet [31]. Die Bindegewebswachstumsfaktoren modulieren multiple zellbiologische Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Zellmotilität und Differenzierung und Angiogenese. In der Embryogenese kommt FGF-2 eine Schlüsselrolle zu, aber auch bei Erwachsenen ist FGF-2 an der Homöostaseregulation und Regenerationsprozessen beteiligt [31].

FGF liegt gebunden an Heparin in der extrazellulären Matrix vor und wird durch Heparinasen aktiviert, sodass es dann an den Rezeptor binden kann [32]. Es existieren vier FGF-Rezeptoren (FGFR1 - 4). Diese Rezeptoren sind Rezeptortyrosinkinasen und Dimerisieren nach Ligandenaktivierung. Die FGF Bindung erfolgt heparinabhängig [31]. Die FGF Effekte werden dann durch intrazelluläre Signaltransduktion über den MAPK-Weg sowie den AKT-Weg vermittelt hervorgerufen. Dabei variiert der Signalweg in Anhängigkeit vom Zell- und Rezeptortyp. Zusätzlich existiert noch ein fünfter FGFR5, jedoch ohne intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Ihm werden negative regulatorische Feedbackfunktionen zugeschrieben. FGFR werden in vielen humanen Zellen exprimiert und steuert Zellproliferation, -differenzierung und -überleben [32].

In UM Zellen wirkt FGF-2 hauptsächlich über Bindung an den FGF-1 Rezeptor, was eine Rezeptordimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase bewirkt. Dies wiederum aktiviert die Phospholipase C gamma (PLC gamma) Bindungsstelle. Diese katalysiert dann die Phosphorylierung von PIP_2 zu DAG und IP_3 . IP_3 vermittelt dann unter anderem Ca^{2+} Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und eine „stromal interaction molecule“ (STIM)-Aktivierung. STIM wird daraufhin in die Plasmamembran bewegt, wo es einen Calcium release – activated calcium ion channel (ORAI) induzierten Calciueinstrom hervorruft. Dieser Prozess wird als Speicher induzierter

Calciumstrom (SOCE) bezeichnet [33]. Ein FGF-1-induzierter Anstieg der Proliferation von Tumorzellen konnte auch durch Calciumkanalantagonisten (z.B. Verapamil) unterdrückt werden, was auf eine Involvierung von Calciumkanälen hindeutet [34]. Eine Wachstumsfaktor-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die mit einer Erhöhten Calciumkanalaktivierung korreliert, konnte auch in neuroendokrinen Tumorzellen beobachtet werden [35].

FGF-2 wirkt auto- sowie parakrin und wachstumsfördernd auf Endothelzellen. Es wird physiologisch von Fibroblasten und Keratinozyten gebildet und wirkt wachstumsfördernd auf Melanozyten. Zudem wird eine angiogenesefördernde Interaktion von FGFR und VEGFR vermutet [32].

Im UM konnten erhöhte FGF-2-Spiegel und eine erhöhte FGF-2-Rezeptorexpression im Vergleich zu normalen uvealen Melanozyten nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass FGF-2 das Tumorstadium begünstigt [10, 29, 36, 37]. Dieser Zusammenhang konnte auch für Brust-, Lungen-, Prostata- und Blasenkarzinome gezeigt werden [32, 38-40]. Die erhöhte FGFR und FGF Expression zeigte sich gehäuft bei Tumoren mit Chromosom 3 Monosomie und BAP1 Mutation, welche mit ungünstiger Prognose assoziiert sind. FGF/FGFR ist an Zellproliferations- Migrations- und Überlebensmechanismen *in vitro* in UM Zellen beteiligt [37]. Zudem konnte eine Assoziation zwischen Tumorstadium und Metastasierung und FGF-2 Expression im UM nachgewiesen werden. Dabei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass FGF-2 zu erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen durch SOCE-Aktivierung führt und die Zellmotilität erhöht und dadurch die Metastasierung begünstigt. In einem Mausmodell konnten diese Effekte durch SOCE Hemmung *in vivo* unterbunden werden [33]. In einer weiteren Studie von Stanisz et al führte jedoch die SOCE Deaktivierung zu erhöhter Tumorpheriferation in kutanen Melanomzellen, während die Invasivität reduziert wurde [41]. In einer anderen Studie konnte ein autokriner FGF-2 Loop Mechanismus in UM Zellen nachgewiesen werden, der die Zellproliferation begünstigte. Durch Blockade des FGFR konnte dieser Loop nur teilweise unterbunden werden [42]. Dies bedeutet das möglicherweise noch andere Signalwege am Tumorstadium beteiligt sind.

1.2.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF ist eine Familie von Wachstumsfaktoren bestehend aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und dem viralen VEGF-E-Protein, sowie dem Plazentawachstumsfaktor PIGF). Sie wirken über Bindung an spezifische Tyrosinkinaserzeptoren und steuern Zellproliferation, Migration, Überleben und Gefäßpermeabilität während der Vaskulo- und Angiogenese [43] (Abbildung 3).

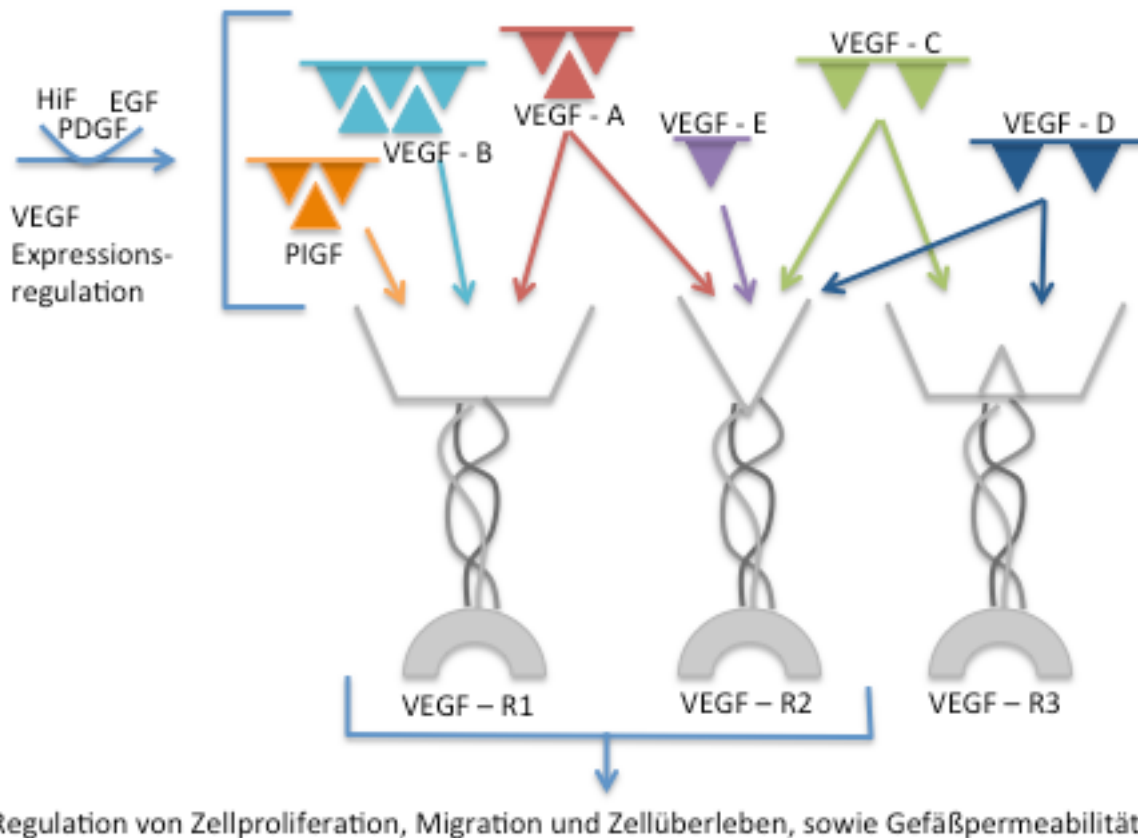


Abbildung 3 Schematische Darstellung der VEGF-Proteine und ihrer Rezeptoren. VEGF-A ist hauptsächlich an der Angiogenese in Tumoren beteiligt und wirkt über Bindung an VEGFR1 und VEGFR2. HiF = Hypoxie induzierter Faktor, PDGF = Platelet derived growth factor, EGF = epidermal growth factor Grafik von C.Budde auf Basis von Apte, R 2019 [43].

VEGF-C und D binden VEGF-R3 und steuern darüber vor allem Lymphangiogenese. VEGF-A kann auch mit Neuropilin Co-Rezeptoren interagieren (NRP1 und NRP2) und hierüber VEGF-R2 Signale beeinflussen [44] (Abbildung 3).

Der Gefäßwachstumsfaktor VEGF-A ist der Schlüsselfaktor für Gefäßwachstum und Neubildung im menschlichen Organismus. VEGF-A ist ein 45 kDa heparinbindendes Protein. Durch alternatives Splicing der Exone 6 und 7 entstehen die Isoformen VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆, wovon VEGF-A₁₆₅ die häufigste Isoform

darstellt. VEGF-A ist auch der wichtigste Mediator der tumorinduzierten Angiogenese. Es erhöht die Gefäßpermeabilität, fördert Endothelzellwachstum, Angiogenese und Monozytenaktivierung. Physiologisch wird die VEGF Expression durch Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), Hypoxie und Ischämie reguliert. VEGF-A wirkt über Bindung an den VEGF-R1 (Flt-1) und VEGF-R2 (KDR). Diese Rezeptoren sind jeweils transmembrane Tyrosinkinaserzeptoren, die durch Ligandenbindung aktiviert werden und Signalkaskaden aktivieren. Dabei hat VEGF-R1 eine ca. 10 mal höhere Affinität zu VEGF-A aber eine deutliche schwächere Signaltransduktion, sodass von einer regulatorischen Funktion der VEGF-R1 ausgegangen wird. Die VEGF-A Effekte werden größtenteils über VEGF-R2 vermittelt. Die Ligandenbindung führt zu einer Rezeptordimerisierung und konsekutiven Autophosphorylierung wodurch verschiedene Downstreamkaskaden aktiviert werden (unter anderen der MAPK-Kinaseweg). Die Rezeptoren finden sich auf Endothelzellen, Tumorzellen und Immunzellen [44-46].

In der Embryogenese trägt VEGF entscheidend zur Ausbildung des Gefäßsystems bei, wobei VEGF Hypoxie-induziert freigesetzt wird. Auch können verschiedene Immunzellen VEGF-A bilden und so zur Gefäßbildung beitragen, so kommt es oft bei chronischen Entzündungsprozessen zur Gefäßneubildung in den jeweiligen Regionen. Auch Tumorwachstum ist von einer ausreichenden Gefäßversorgung abhängig, in diesem Zusammenhang konnten auch bereits erhöhte VEGF-A Spiegel im Serum und in Tumornähe nachgewiesen werden sowie ein Zusammenhang zwischen Höhe der Serum VEGF-A Konzentration und Mikrometastasen hergestellt werden [10, 29, 47, 48]. Dabei ist oxidativer Stress durch den veränderten Tumormetabolismus, der zu erhöhten H_2O_2 und Superoxidkonzentrationen führt, oftmals ein Trigger für erhöhte VEGF Ausschüttung. Das freigesetzte VEGF führt dann über Aktivierung der MAPK-ERK-1/2 Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2, der wiederum die Freisetzung antioxidativer Enzyme erhöht [24]. Parallel dazu wird die Angiogenese begünstigt. Angiogenese ist ein Schlüsselfaktor der Tumorprogression. Hierdurch wird die ausreichende Nährstoffversorgung sichergestellt. Gleichzeitig erfolgt die Metastasierung hämatogen über diese Gefäße als Eintrittspforte in die Zirkulation. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tumore mit hoher Vaskularisierung mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind [49, 50]. Erhöhte VEGF mRNA Expression konnte in den meisten humanen Tumoren nachgewiesen werden und ist mit erhöhter

Invasivität, Gefäßdichte, Metastasierungsrate, Rezidiven und schlechter Prognose assoziiert. [45]. Dabei wird ein immunmodulierender Effekt von VEGF als Grundlage dieser Effekte vermutet, wodurch regulatorische T-Zellen und die Differenzierung zu Endothelzellen begünstigt wird und die Funktion von T-Effektorzellen inhibiert wird [43, 51, 52]. Hierauf basierend wurden neue Therapieansätze mit VEGF-Antagonisten entwickelt und in Studien getestet, wobei bisher kein durchschlagender Erfolg erzielt werden konnte. Deshalb ist ein besseres Verständnis der Effektor-Kaskaden vonnöten [44].

Das VEGF-Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert. Mutationen in dieser Region konnten in UM Zelllinien nachgewiesen werden [15]. Zudem konnte für verschiedene UM Zelllinien eine VEGF-A Produktion Ischämie-induziert über den HIF nachgewiesen werden [47]. Ob und wie das VEGF-A dabei auf die UM Zellen wirkt, wurde bisher noch nicht untersucht und soll Thema dieser Arbeit sein.

1.3 Calciumhomöostase

Calcium ist neben Natrium und Kalium eines der wichtigsten Kationen im menschlichen Organismus. Es ist als Botenstoff an der intrazellulären Signaltransduktion bis hin zur Genexpression beteiligt, ebenso wie an der Herzmuskelkontraktion, an Vesikelsekretion und an Zellproliferations-, Migrations- und Apoptosemechanismen [53, 54].

Die intrazelluläre freie Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) liegt bei ca. 100 nM in ruhenden Zellen, während die extrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_e$) bei 1 - 2 mM und damit um den Faktor 1 : 10 000 höher liegt. Dies bedeutet, dass in lebenden Zellen eine große elektrochemische Kraft für einwärtsgerichtete Calciumströme vorliegt [55-57]. Dieser Konzentrationsgradient wird durch verschiedene Ionenkanäle und Pumpen aufrechterhalten, die Calciumionen in intrazelluläre Calciumspeicher oder nach extrazellulär sequestrieren (Abbildung 4). Dieser Transport erfolgt über Ca^{2+} -ATPasen und das $3 Na^+ / Ca^{2+}$ Gegentransportsystem. Gleichzeitig verfügen die Zellen über verschiedene Ca^{2+} -Ionenkanäle, die durch spezifische Aktivierung einen regulierten Calciumeinstrom hervorrufen und dadurch ihre jeweilige Funktion bewirken (Abbildung 4)

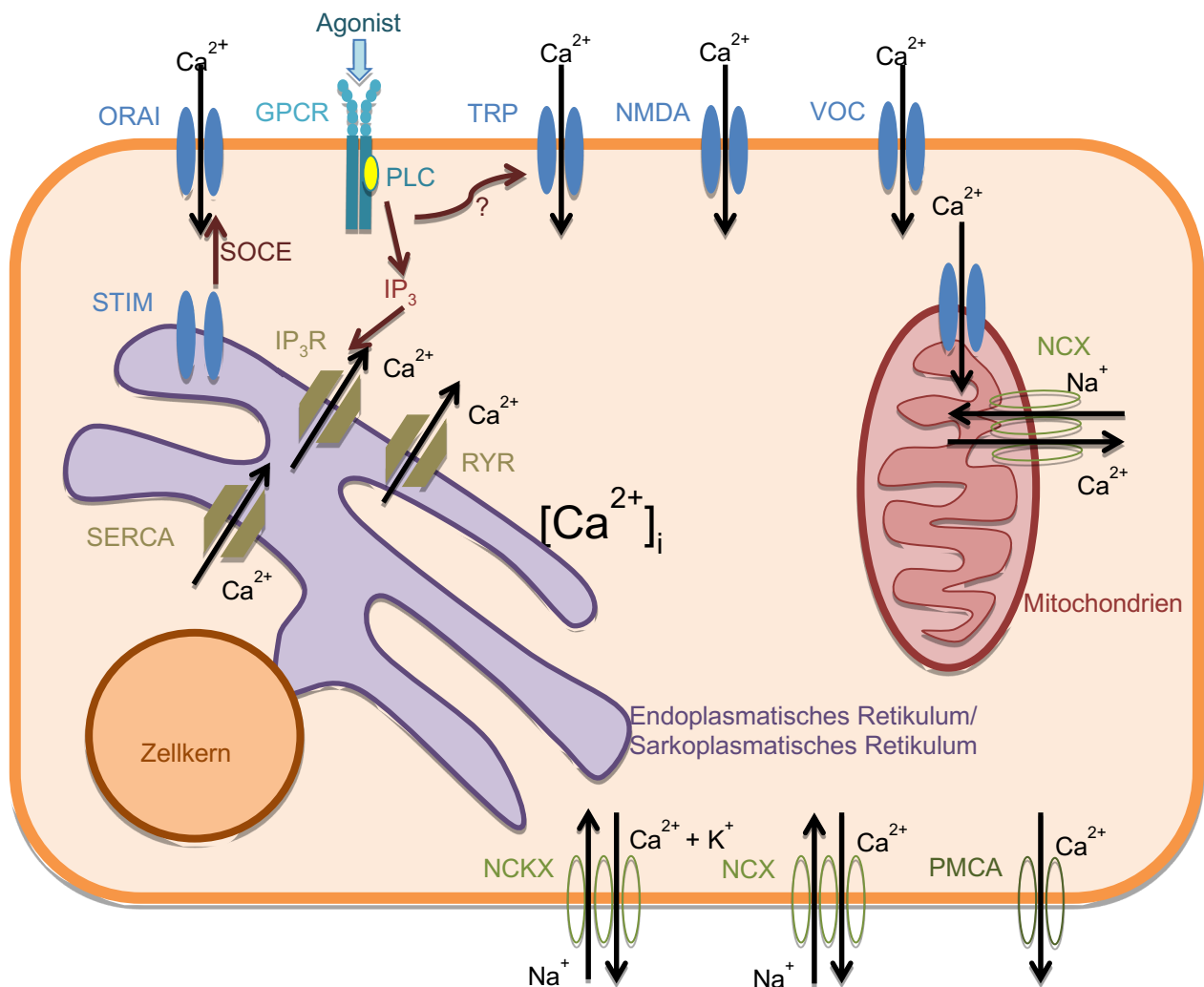


Abbildung 4 Übersicht über zelluläre Calciumhomöostasemechnismen. GPCR Aktivierung durch die Agonisten bewirkt eine Konfigurationsänderung der intrazellulären Domäne, wodurch die PLC aktiviert wird, die die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) katalysiert. IP₃ bewirkt eine Ca²⁺ Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies wird von STIM registriert. Dies führt zu einer STIM Polymerisierung und Relokalisierung an die Plasmamembran, wo ORAI aktiviert. Dieser Mechanismus wird spannerabhängiger Calciumeinstrom (SOCE) genannt. VOC = spannungsabhängiger Ionenkanal, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor) = Glutamatrezeptor, RYR = Ryanodin Rezeptor, SERCA (sarcoplasmic/ergoplasmic reticulum calcium ATPase) Calciumpumpe zur Aufnahme von Ca²⁺ in das endoplasmatische/ sarkoplasmatische Retikulum, NCKX = Na⁺/ Ca²⁺/K⁺ Austauschtransporter, NCX = Na⁺/ Ca²⁺ Austauschtransporter, PMCA = Plasmamembran Calcium ATPase, Calciumpumpe zum Efflux von Ca²⁺ aus der Zelle. Grafik von C. Budde

Änderungen der [Ca²⁺]_i dienen als Signale durch die in Abhängigkeit von der Amplitude, den zeitlichen und örtlichen Eigenschaften den Zellzyklus und damit Differenzierung, Apoptose, Proliferation und Genexpression regulieren. Da dies entsprechend der Kennzeichen von Krebs Schlüsselprozesse in der Entartung von Zellen darstellen, ist eine veränderte Funktionsweise der [Ca²⁺]_i Regulation ein wesentlicher Meilenstein in der Kanzerogenese. Dabei wurden Mutationen und veränderte Expressionsmuster wesentlicher Calciumkanäle in Tumoren beobachtet [53, 57, 58]. Eine veränderte Regulation des SOCE konnte bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden,

wobei vermutet wird, dass hierüber die Zellmotilität erhöht und die Metastasierung begünstigt wird [53, 58-60].

1.4 Transient Rezeptor Potenzial (TRP)-Kanäle

Transient Rezeptor Potential (TRP-) Kanäle sind eine große Gruppe von nicht-selektiven Ionenkanälen, die durch vielfältige Stimuli aktiviert werden können. Typische Aktivierungsmechanismen sind hierbei intra- oder extrazelluläre Ligandenbindung, Temperaturänderungen, chemische oder mechanische Zellstimulation, sowie osmotische Veränderungen. Die Aktivierung führt zu einer Konfigurationsänderung des Kanalproteins bzw. erhöhten Offenwahrscheinlichkeit (P_0) und wird damit durchlässig für Kationen. In Neuronen kommt es nach einem Ioneneinfluss zu einer Verschiebung des Membranpotenzials (Depolarisation), das ab einem bestimmten Schwellenwert zu einer Aktivierung des Aktionspotenzials führt. In nicht neuronalen Zellen können über Aktivierung von TRP Kanälen (TRPs) proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, die wiederum Entzündungsprozesse auslösen können [61].

TRP-Kanäle sind überwiegend permeabel für Calcium und Natrium mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5, welche nur für monovalente Kationen permeabel sind. TRP-Kanäle sind substantiell an der intrazellulären Calciumhomöostase beteiligt und beeinflussen somit verschiedene Zellprozesse von Genregulation bis Zelltod. TRP-Kanäle sind auf der Zellmembran sowie in verschiedenen Zellorganellen exprimiert. Die meisten TRP-Kanäle haben eine Selektivität für Natrium und Calcium ($P_{Ca}/P_{Na} < 100$), mit Ausnahme von TRPV5 und TRPV6 mit hoher Selektivität ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$) [62].

Die einzelnen TRP-Kanäle setzen sich jeweils aus sechs transmembranspannenden Segmenten (S1 - 6) und den intrazellulär gelegenen NH₂- und COOH-Enden zusammen. Die Segmente S5 und S6 bilden eine porenförmige Schleife (Abbildung 5A). Die Bildung von Homo- oder Heterotetrameren der Untereinheiten führt schließlich zur Bildung der Kationen permeablen Kanäle [63](Abbildung 5B).

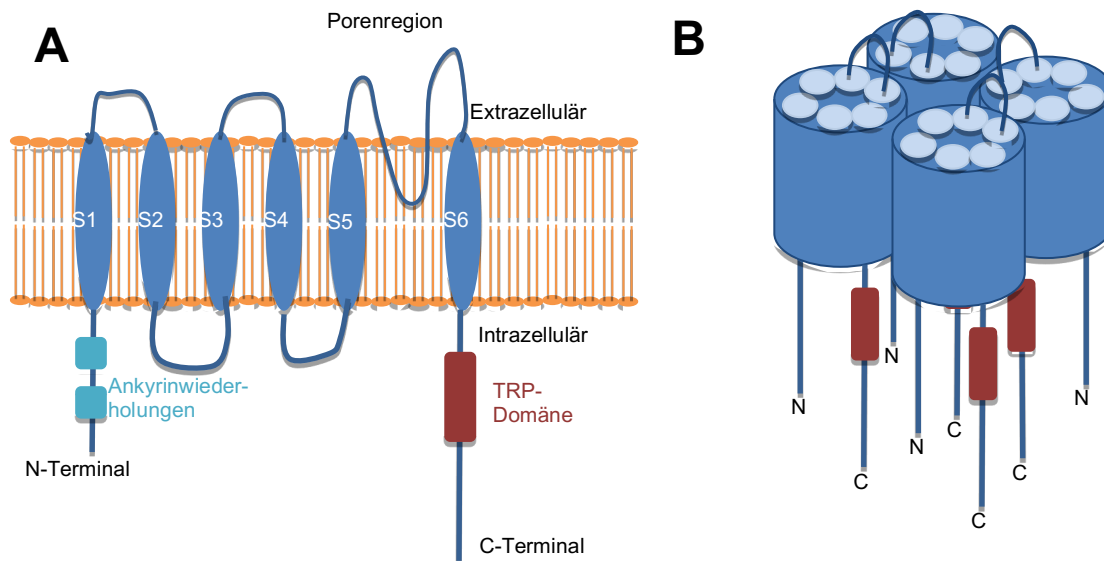


Abbildung 5 A Schematische Darstellung eines TRP Kanals, die einzelnen Subtypen unterscheiden sich in der Anzahl der Ankyrinwiederholungen. B TRP Kanaltetramer Grafik von C.Budde orientiert an Takahashi 2012 [64].

Durch TRP-Kanalaktivierung wird die Membrandurchlässigkeit für die Kationen erhöht, wodurch wiederum weitere intrazelluläre Signaltransduktionaskaden aktiviert werden. Ebenso findet teilweise eine Transaktivierung oder -inhibierung anderer Rezeptoren statt [65] sowie eine Triggerung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [66].

Anhand der Aminosäurezusammensetzung kann die TRP Superfamilie in sieben Subgruppen unterteilt werden (TRP canonical, TRP melastatin, TRP vanilloid, TRP ankyrin, TRP polycystin, TRP mucolipin, TRP NOMP (= no mechanoreceptor potential), wobei diese wiederum jeweils Subtypen umfassen (Abbildung 6).

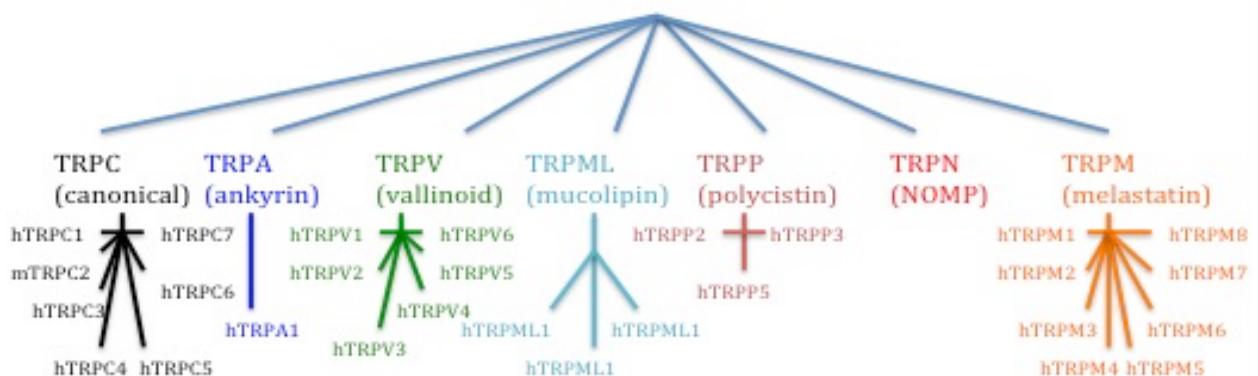


Abbildung 6 Die TRP-Kanal Familie. Überblick über die bekannten Subtypen. Bisher konnte in UM Zellen die TRPM8 und TRPV1 Expression nachgewiesen werden. Grafik von C.Budde.

TRP-Kanäle funktionieren als Thermo- und Schmerzsensoren und werden in neuronalem Gewebe exprimiert. Allerdings konnte ihre Expression auch in anderen

gesunden Geweben sowie in Tumoren nachgewiesen werden. Neben dieser klassischen Rolle der TRPs in Neuronen spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Calciumhomöostase von nicht erregbaren (gesunden) Augenzellen und in malignen und benignen Augentumorzellen [65]. Sie ermöglichen transzellulären Calciumtransport und sind an der Regulation und Funktion von Zellorganellen beteiligt. In UM Zellen konnte eine TRPV1 und TRPM8 Genexpression nachgewiesen werden, sowie eine TRPA1 Expression in manchen UM Zelllinien, während eine TRPA1 Expression in gesunden UM Zelllinien stets vorhanden ist [65, 67]. Ebenso konnte in weiteren Zelltypen eine funktionelle TRP Expression gezeigt werden, wobei die biologische Funktion noch nicht vollständig verstanden ist. Es wird eine Aktivierung über GPCR diskutiert, sowie wie eine Beteiligung an verschiedenen Pathologien des Auges [65, 68, 69]. So sind TRPM8 Kanäle in Nervenfasern der Hornhaut beispielsweise bei der Regulierung der Feuchtigkeit der Augenoberfläche involviert [65, 70-72]. In kornealen Epithelzellen konnte eine TRPC4 und TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 und TRPM8 Expression nachgewiesen werden [73-75]. In kornealen Endothelzellen hingegen wird TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4 funktionell exprimiert [76-80]. Ebenso konnte in kornealen Fibroblasten eine TRPV1 Expression gezeigt werden [81]. Retinale Pigmentepithelzellen (RPE) exprimieren TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4, Kanäle, wobei eine funktionelle Expression nur für TRPV2 nachgewiesen werden konnte [20]. In Retinoblastomzellen konnte TRPV1, TRPM8 und TRPA1 nachgewiesen werden, wobei in einer spezifischen Retinoblastomzelllinie TRPA1 nicht exprimiert wurde, die resistent gegenüber der Etoposidchemotherapie ist [65, 82, 83]. Ebenso exprimieren konjunktivale Epithelzellen und benigne Tumorzellen (Ptygerium) TRPV1, -2, -3, und -4 und TRPM8, wobei in Ptygeriumzellen die TRPV1 Expression erhöht war. Auch hier konnte eine Interaktion zwischen TRPM8 und TRPV1 gezeigt werden [65, 84].

Generell können Ionenkanäle auf verschiedene Arten an der Pathogenese und Aufrechterhaltung von Krankheiten beteiligt sein. Dis- oder Nonsensemutationen in den codierenden Genen können zu Funktionsverlust der Proteine führen und somit Erkrankungen auslösen. Beispielsweise führen Mutationen in Kaliumkanälen der KCNQ-Familie zu Repolarisationsverzögerungen im Herzen. Sie rufen dadurch das sogenannte Long-QT-Syndrom hervor. Ebenso konnten Mutationen im TRPV4 Gen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der scapulooperonealen spinalen Muskelatrophie und der Charcot-Marie-Tooth Typ 2C Erkrankung nachgewiesen werden. Der genaue

Pathomechanismus, wie Mutationen im selben Gen unterschiedliche klinische Symptome hervorrufen können, ist aktuell weiter Gegenstand von Untersuchungen [85]. Meistens können solche Funktionsverluste einzelner Isoformen durch verwandte Untereinheiten der Kanalfamilie (teilweise) jedoch kompensiert werden, sodass Kanalkrankheiten insgesamt eher eine niedrige Prävalenz aufweisen. Weitaus häufiger werden durch Überaktivierung oder Überexpression eines Kanals durch epigenetische Mechanismen, Funktionsgewinnmutationen oder permanente Stimulation bei erhöhter Agonistenkonzentration Krankheiten hervorgerufen. Überexpression von TRP-Kanälen ist regelmäßig in diversen Tumoren zu beobachten [86]. Gleichzeitig dienen verschiedene Rezeptoren und Ionenkanäle oftmals als pharmakologische Angriffspunkte und diagnostische Parameter (z.B. TRPM8) [87].

Im Kontext von malignen Erkrankungen, die häufig mit erhöhten Wachstumsfaktorkonzentrationen einhergehen, ist das Verständnis der tumorproliferativen Wirkmechanismen der Wachstumsfaktoren wegweisend, um mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren [86]. TRP-Kanäle als Ca^{2+} -permeable Kanäle können hierbei an Zellwachstums- und Apoptosemechanismen und somit entsprechend der Kennzeichen von Krebs an der Tumorentstehung beteiligt sein, weshalb ihre Regulation und Funktion aktuell Gegenstand der Forschung verschiedener Arbeitsgruppen ist. So kann eine TRP-Kanal Überaktivität zu unphysiologisch hohen intrazellulären Calciumkonzentrationen führen und hierdurch Apoptose induziert werden [88]. Gleichzeitig können TRP-Kanäle auch wachstumsfördernd sein [89]. So wird derzeit das Expressionsmuster von TRP-Kanälen in verschiedenen Tumortypen analysiert. Diesbezüglich konnte die Hochregulation einzelner Isoformen bzw. deren Aktivierung durch tumorinduzierte Botenstoffe in Studien nachgewiesen werden [89-91].

1.4.1 TRPV-Kanäle

Es sind sechs TRPV Subtypen (Vanilloidrezeptoren) (TRPV1 - V6) in Säugetieren bisher bekannt. TRPV1-TRPV4 sind nicht-selektive Kationenkanäle, die durch Hitze und verschiedene endogene und synthetische Liganden aktiviert werden können. Dabei zeigen verschiedene simultan auftretende Stimuli additive Effekte, sodass die Rezeptoren verschiedene Signale integrieren können. TRPV5 und TRPV6 hingegen

sind hochselektive Calciumkanäle mit einer hohen Ca^{2+} Permeabilität und zeigen nur eine geringe Temperatursensitivität [62, 92, 93].

1.4.1.1 TRPV1

Der TRPV1 auch bekannt als Capsaicinrezeptor ist der bislang meistuntersuchte TRPV-Kanal [94]. TRPV1-Kanäle werden pharmakologisch durch Capsaicin, physikalisch durch Hitze $> 43\text{ °C}$ und erhöhte Osmolarität [95, 96] sowie durch niedrige pH-Werte ($< 5,9$), Depolarisation, Vanilloide und Leukotrien B₄ aktiviert [94]. Dabei scheinen Desensibilisierungseffekte bei prolongierter Exposition aufzutreten [94] und additive Effekte der einzelnen Agonisten möglich zu sein [97]. Es konnte zudem eine Expression in Schmerzfasern gezeigt werden, wobei insbesondere auch Tumorschmerzen TRPV1-vermittelt wahrgenommen werden [86, 98, 99].

In kornealen Epithelzellen konnte eine Aktivierung des *Mitogen activated Phosphokinase* (MAPK)-Weges und Interleukin (IL)-6 und IL-8 Freisetzung in Folge einer TRPV1 Aktivierung gezeigt werden [61]. TRPV1 vermittelte Calciumantworten konnten durch Cannabinoidrezeptor 1 (CB1)-Aktivierung oder TRPM8 Aktivierung supprimiert werden, sodass Interaktionen mit anderen Rezeptoren die Funktion neben der Ligandenbindung zu beeinflussen scheinen [65, 100].

Erhöhte TRPV1-Expression konnte in Prostata-, Kolon- und Pankreastumoren gezeigt werden, während in Blasentumoren erniedrigte TRPV1 - Expression gefunden wurde [86]. Im Retinoblastom konnte eine hohe TRPV1 Expression gezeigt werden, wobei die TRPV1 Antwort über CR und TRPA1 Aktivierung moduliert werden kann [82, 83]. In UM Zellen konnte die TRPV1 Expression ebenso wie in gesunden Melanozyten von Mergler et al. erstmals 2014 nachgewiesen werden [67].

1.4.1.2 TRPV4

TRPV4-Kanalaktivierung erfolgt pharmakologisch durch Phorbol ester 4 alpha-PDD oder GSK1016790A, physikalisch durch moderate Hitze $> 24\text{ °C}$, verminderte Osmolarität [101], Scheerstress, Zellschwellung oder ansonsten über Proteinkinase C,

Arachnidonsäure, Anandamide, 5,6 - EET (5,6-Epoxyeicosatriensäure) und Cisandrographolid A [102-104]. TRPV4 Kanäle sind an Zellmigrationsprozessen, Nozizeption, Osteogenese und Osteoklastenfunktion beteiligt. Aufgrund der Aktivierung bei moderater Wärme wird eine partielle Grundaktivität bei Körpertemperatur vermutet, wobei eine partielle Desensitivierung durch Hitzestimulation postuliert wird [104]. Dysfunktionen treten insbesondere im Kontext von neurodegenerativen und Knochenerkrankungen auf [63].

TRPV4 Aktivierung durch Scheerstress erfolgt durch Phospholipase A2 (PLA2) vermittelte Arachnidonsäurefreisetzung aus Zellmembranbestandteilen. Ebenso kann die Kanalöffnung durch GPCR vermittelte Phospholipase C (PLC) Aktivierung erfolgen. Durch PLC katalysiertes DAG aktiviert wiederum die Proteinkinase C, welche TRPV4 Kanäle phosphoryliert und dadurch die TRPV4 Sensitivität gegenüber EET erhöht. Ebenso erhöht Calmodulin die Kanalöffnungswahrscheinlichkeit [105].

In kornealen Endothel- und Epithelzellen konnte eine funktionelle TRPV4 Expression nachgewiesen werden [73, 78]. Daten zur Expression von TRPV4 in UM Zellen liegen bisher nicht vor. In Brustkrebs- und Nierenzelltumorendothelzellen, sowie im hepatozellulären und Ösophaguskarzinom konnte eine erhöhte TRPV4 Expression in Relation zum normalen Gewebe nachgewiesen und mit erhöhter Zellmotilität assoziiert werden [90, 106-110]. In einem Mausmodell zeigte sich durch TRPV4 Inhibierung hingegen eine erhöhte Angiogeneseaktivität [105, 111]. In kutanen Melanomzellen A375 wurde ebenfalls eine TRPV4 Überexpression gezeigt, durch TRPV4 Aktivierung konnte das Zellwachstum in dieser Zelllinie reduziert und Apoptose über erhöhte AKT Phosphorylierung induziert werden [88]. Ebenso wird eine erhöhte Invasivität und Metastasierungspotential durch TRPV4 Aktivierung für Brustkrebszellen und gastrische Tumore berichtet [90, 106]. Jedoch kann TRPV4 vermittelt auch Apoptose in Tumorzellen ausgelöst werden, sodass das Aktivitätslevel und die Calciumkonzentration auch im Zusammenspiel mit anderen calciumpermeablen Ionenkanälen entscheidend für die proliferative oder apoptische Antwort zu sein scheint [105].

1.4.2 TRPM

Die TRPM Kanäle lassen sich in vier Subfamilien (TRPV1/3; TRPM2/8; TRPM4/5; und TRPM6/7) unterteilen die sich hinsichtlich ihrer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Leitfähigkeit unterscheiden. TRPM4/5 sind dabei Ca^{2+} -impermeabel, während TRPM6/7 die höchste Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Leitfähigkeit aufweisen. TRPM2/6/7 weisen zudem eine C-terminale enzymatische Domäne mit Kinase- (TRPM6/7) bzw. hydrolytischer ADP-Spaltungsaktivität (TRPM2) auf [112]. Interessant ist, dass in Retinoblastomzellen eine erhöhte TRPM7 Genexpression detektiert werden konnte, während die TRPM8 Genexpression eher niedrig ist [83].

1.4.2.1 TRPM8

Der TRPM8 Kanal, auch als Kälte- oder Mentholrezeptor bekannt, wird durch moderate Kühlung ($< 28\text{ }^{\circ}\text{C}$), kühlende Chemikalien, wie Icilin, oder Menthol oder Eucalyptol aktiviert. Durch niedrige pH-Werte werden TRPM8 Kanäle inhibiert [97]. Auch eine erhöhte extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration aktiviert TRPM8 [113, 114]. Eine Interaktion zwischen TRPM8 und TRPA1 wurde in verschiedenen Zusammenhängen bereits beobachtet. So kann durch Menthol (einem TRPM8 Agonisten) Hitze induzierte Hyperalgesie (durch TRPA1 Aktivierung hervorgerufen) behandelt werden [115]. Es existieren 11 Isoformen des 1104 aa großen Proteins. Es findet sich zudem eine PIP2 Bindungsstelle am C-terminalen Ende.

TRPM8 wird als Kälterezeptor hauptsächlich in somatosensorischem Gewebe exprimiert [114], wurde jedoch auch in der Prostata, Blase, glatten Muskelzellen, in der Leber, Lunge und Odontoblasten nachgewiesen [86, 116-120]. In gesunden uvealen Melanozyten konnte TRPM8 bisher noch nicht klar nachgewiesen werden, wobei eine Expression nicht ausgeschlossen werden kann. In UM Zellen ist dieser Kanal jedoch deutlich exprimiert [68]. Auch wurde für andere Tumore, wie z.B. Prostata-, Blasen-, Pankreas- und Mammakarzinomen erhöhte TRPM8- Expression gezeigt [91, 121, 122]. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter TRPM8 Expression und Tumorproliferation und –invasion gezeigt werden, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch Gegenstand der Forschung sind [91, 121, 122]. Auch in Melanomen scheint TRPM8 an der Zellzyklusregulation beteiligt zu sein [123]. Dabei konnte insbesondere in Prostatazellen der TRPM8 –Kanal nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in ER-Membranen nachgewiesen werden. Dies bedingt

niedrigere Ca^{2+} -Konzentrationen im endoplasmatischen Retikulum und erhöht dadurch die Apoptoseresistenz der Karzinomzellen [123-126]. Es konnte zudem für Prostata- und Mammakarzinome eine Androgen-abhängige Regulation von TRPM8 gezeigt werden. Der Einfluss anderer Wachstumsfaktoren und Hormone ist indes noch unklar [91].

1.5 Thyronamine (3-T₁AM)

Thyronamine sind Derivate der Schilddrüsenhormone. Sie entstehen durch Decarboxylierung der Schilddrüsenhormone. 3-Iodothyronamin (3-T₁AM) ist ein solches mit noch einer Iodidgruppe und konnte in sehr geringen Konzentrationen im menschlichen Serum nachgewiesen werden. Seine Konzentration liegt dabei im Nanomolarbereich bei ca. 60 nM im Serum [127]. In Ratten konnte eine ähnlich niedrige Konzentration im Serum nachgewiesen werden, während die Konzentration in einzelnen Organen deutlich höher lag. Somit scheint 3-T₁AM dort produziert zu werden (intrakrine Wirkung) bzw. gut gewebebegänglich zu sein und verstärkt organspezifisch zu wirken. Dabei scheint 3-T₁AM auch in die Zellen aufgenommen zu werden und dort an intrazelluläre Rezeptoren zu binden [128]. Es hat eine lange Halbwertszeit und ist meist an Apolipoprotein B100 gebunden im Serum. Zudem wird eine Apolipoprotein B abhängige Aufnahme in die Zellen über LDL Rezeptoren diskutiert [129]. Zusätzlich konnte als Multiligand auch eine Wirkung über „Trace amine-associated Rezeptoren“ (TAAR)[130], adrenerge Rezeptoren (ADRA2A und ADRB2), den muscarinergen Rezeptor M3 und Serotonin 1b Rezeptor gezeigt werden [131, 132]. Es konnte ein 3-T₁AM vermittelter reversibler Körpertemperaturabfall in Mäusen über TAAR1-Aktivierung, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, nachgewiesen werden. Der Abfall trat dabei ca. eine Stunde nach Injektion auf und bildete sich in Abhängigkeit der Dosis nach sechs bis acht Stunden wieder zurück. Auch zeigte sich eine Bradykardie und Reduktion der Ejektionsfraktion nach 3-T₁AM Exposition [130]. In anderen Studien konnte ein protektiver Effekt der Temperatursenkung auf den ischämischen Gehirnschaden bei Schlaganfällen gezeigt werden [69, 133]. Ein kardioprotektiver Effekt wird ebenfalls diskutiert und eine Beeinflussung des Glukkostoffwechsels gezeigt [131, 132].

3-T₁AM ist auch ein möglicher endogener TRPM8 Modulator [69, 132, 134]. In humanen konjunktivalen Epithelzellen konnte bereits eine TRPM8 Aktivierung durch 3-T₁AM gezeigt werden [135]. Auch konnte eine Suppression der TRPV1 Aktivierung durch 3-T₁AM vermittelte TRPM8 Aktivierung in Hornhautepithelzellen nachgewiesen werden [136, 137]. Insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass eine funktionale Überexpression von TRPM8 in UM Zellen im Vergleich zu gesunden Melanozyten nachgewiesen werden konnte, ist es wichtig zu untersuchen, ob dieser gefundene Mechanismus auch in UM Zellen zu beobachten ist.

Interessanterweise konnte *in vitro* ein wachstumshemmender Effekt von 3-T₁AM auf Brustkrebs- und Leberkrebszellen gezeigt werden, der in gesunden Geweben erst bei deutlich höherer 3-T₁AM Konzentration auftrat. Dabei schien die 3-T₁AM Wirkung hauptsächlich über Wirkung an den Mitochondrien zu erfolgen [138]. Auch konnte die Zellmigration von Brustkrebszellen durch 3-T₁AM reduziert werden [139]. Ähnliche wachstumshemmende und Apoptose induzierende Effekte von 3-T₁AM konnten auch *in vitro* für Ovarialkarzinome gemacht werden [140].

2. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll das Zusammenspiel wichtiger Wachstumsfaktoren, wie VEGF und FGF-2 auf die Öffnungswahrscheinlichkeit von TRP-Kanälen UM Zellen näher untersucht werden. Ionenkanäle, insbesondere Calciumkanäle, sind als Eingangspforten in die Zelle an der Regulation der intrazellulären Homöostase und damit entscheidend am Zellüberleben und –tod beteiligt. Da ebendiese Mechanismen in malignen entarteten Zellen oft fehlreguliert sind, ist es wichtig, die veränderten Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene zu verstehen, um hierdurch spezifische Angriffspunkte für neuartige spezifische Krebstherapien aufzudecken. Insbesondere in Anbetracht der begrenzten aktuellen Therapieoptionen des UM und der damit verbundenen schlechten Prognose ist es wichtig die Calciumregulation näher zu untersuchen. Ionenkanäle sind in diesem Zusammenhang durch die hohe Vielfalt an Stimuli, die zu verarbeiten sie imstande sind, pharmakologisch gut ansprechbare Angriffspunkte.

Mergler et al. und A. Böhm konnten bereits eine veränderte TRP-Kanalexpression im UM zeigen [67, 141]. TRPV1 scheint stärker exprimiert zu sein und auch TRPM8 im Gegensatz zu gesunden Melanozyten wird exprimiert [141]. Unklar ist jedoch weiterhin die Auswirkung der veränderten Kanalproteinexpression und ob noch weitere TRP Kanäle in UM Zellen exprimiert werden.

Da Wachstumsfaktoren für Tumorwachstum gerade in Anbetracht des veränderten Zellstoffwechsels essenzielle Botenstoffe darstellen, jedoch gleichzeitig auch an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind, soll in dieser Arbeit untersucht werden, wie sie auf spezifische TRP Kanäle wirken und wie diese Antworten unterdrückt werden können. Hieraus können dann möglicherweise in Zukunft neue gezielte Therapien entwickelt werden, die die Wachstumsfaktorwirkung auf maligne Zellen hemmen, ohne dabei die physiologischen Prozesse zu stören und hiermit nebenwirkungsärmer als bisher bekannte Therapien sind.

Die Ziele der durchgeführten Untersuchungen sind daher:

- 1) Die in vitro fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Untersuchung von TRPV4 in uvealen Melanomzellen unter Verwendung der etablierten Aderhautmelanomzelllinie UM 92.1.
- 2) Die in vitro fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Charakterisierung der VEGF/ und FGF-2 induzierten Stromantwortmuster im Hinblick auf eine TRP Beteiligung.
- 3) Die Wirkung von Thyronamin (3-T₁AM) auf die VEGF induzierten TRP-Antwortmuster.

Die Fragestellungen wurden mithilfe zweier gut etablierter Methoden der Ionenkanalforschung funktionell untersucht. Zunächst erfolgte die fluoreszenzoptische Untersuchung mittels Calcium-Imaging, wobei Fura2/AM als Farbstoff verwendet wurde. Zur Validierung der Ergebnisse und Charakterisierung der Strommuster folgte darauf die Untersuchung mittels planarer Patch-Clamp Technik.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Zellmodell

Als Modell zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Wachstumsfaktoren auf das UM wurde die in Leiden von der Arbeitsgruppe Jager et al. etablierte Ziellinie 92.1 verwendet [142]. Die Zelllinie wurde aus einem großen Primärtumor einer Patientin etabliert, die zweieinhalb Jahre nach der Diagnose vermutlich an den Metastasen des Tumors verstarb. Die Zelllinie wurde aus dem operativ entfernten Tumor generiert indem die entnommenen Zellen in Petrischalen mit einer Mausfibroblastenschicht aus 3T3 Zellen in RPMI Medium angezüchtet wurde. Lichtmikroskopisch präsentiert sich die Zelllinie pleiotroph mit großen Nucleoli entsprechend dem Bild des Primärtumors. Der Tumor zeigt eine Chromosom 3 Disomie, sowie eine BAP1Expression und eine 8q Addition. Diese sind weniger typisch für hohes Metastasierungsrisiko allerdings zeigten sich viele Mitosen, was wiederum klassisch für eine aggressive Tumorvariante ist. Zudem wurde *EIF1AX* nachgewiesen, was mit höherer Metastasierungsrate assoziiert wurde [200]. 2016 hat die Arbeitsgruppe verschiedene UM Zellmodelle nochmals überprüft und konnte dieselben Mutationen in den 92.1 Zellen und im Primärtumor zeigen und die Stabilität der Zelllinie nachweisen [150]. Insgesamt wurden typische immunologische und genetische Merkmale von UM in dieser Zelllinie nachgewiesen, weshalb sie ein gutes Modell darstellt. Allerdings ist es insgesamt eher schwierig Zellkulturmodelle von UM zu etablieren und die meisten etablierten Modelle stammen von untypischen Tumoren (bereits metastasiert oder Gewebe nach Strahlentherapie gewonnen und keine Chromosom 3 Monosomie), sodass die Ergebnisse mit diesem Modell nicht zwangsläufig auf alle UM zutreffen müssen.

3.1.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien:

Accutase	PAA GmbH, Pasching, Österreich
AMTB	TOCRIS Bioscience, Bristol, Großbritannien
BCTC	TOCRIS Bioscience, Bristol, Großbritannien
CAP	Cayman Chemical Company, Michigan, USA

CPZ	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Fetales Kalbserum (FKS)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
FGF – 2	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Fura-2AM	TOCRIS Bioscience, Bristol, Großbritannien
GSK 1016790A	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
GSK 2193874	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Lanthanum-III-chlorid	Sigma-Aldrich
L – Gluatmin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Gibco Invitrogen, Deutschland
RN Sigma 1734	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
RPMI-1640 Kulturmedium	Life Technologias Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
VEGF-165	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA

Die Rezeptorantagonisten und -agonisten wurden, wenn nicht anders angegeben in der Konzentration von 10 μ M verwendet. FGF-2 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml und VEGF in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Verwendete Lösungen:

Intrazelluläre Lösung	Nanion Technologies, München, Deutschland
50 mM CsCl	
10 mM NaCl	
60 mM CsF	
20 mM EGTA	
10 mM HEPES/ pH 7.2 mit KOH	
Extrazelluläre Lösung	Nanion Technologies, München, Deutschland
140 mM NaCl	
4 mM KCl	
1 mM MgCl ₂	
2 mM CaCl ₂	
5 mM D-Glucose monohydrate	
10 mM Hepes /NaOH pH 7.4	
Osmolarity: 298 mOsmol	
Seal-Enhancer Lösung	Nanion Technologies, München, Deutschland

PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM PO₄³⁻)

Ringer-ähnliche Lösung (150 mM NaCl, 6 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM Glukose und 10 mM HEPES (pH eingestellt auf 7.4))

Alle weiteren Chemikalien wurden von Sigma- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland erworben.

3.1.3 Geräte

Calcium Imaging

Für die Calcium- Imaging Versuche wurden zwei verschiedene Setups verwendet bestehend aus

Setup A: Photomultiplier (Hamamatsu, Japan) in Verbindung mit einer Fluoreszenzdetektionseinheit (TILL-Photonics, München, Deutschland) und der TIDA v 5.0 phe (HEKA, Lamprecht, Deutschland) und T.I.L.L., Photonics, München, Deutschland

Setup B: Mikroskop Olympus BW50WI (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einer hochauflösenden Digitalkamera (Olympus XM-10) als Detektionseinheit, cellSens Software (Olympus, Hamburg, Deutschland)

Patch-Clamp Setup

Es wurde ein planares Patch-Camp Setup Port-a-Patch von Nanion® (München, Deutschland), in Verbindung mit einem EPC-10 Patch-Clamp Verstärker (HEKA, Lamprecht, Deutschland) und der PatchMaster Software (Version 2.6; HEKA, Lamprecht, Deutschland) verwendet.

3.2 Zellkultur

Für alle Versuche wurde die Aderhautmelanomzelllinie UM 92.1 [142] verwendet. Diese wurde freundlicherweise von Martine Jager und Kollegen der Universität Leiden zur Verfügung gestellt. Die ursprünglichen Zellen stammen von einem primären Aderhautmelanom. Die Zelllinie ist gut etabliert und charakterisiert und wurde bereits in mehreren Studien verwendet [4].

Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium angereichert mit 10% FKS (fötales Kälberserum), 4 mM L-glutamine und Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ bei 80-prozentiger Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Zellmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung sicherzustellen. Bei einer Zelldichte von über 80% wurden die Zellen geteilt. Hierfür wurde zunächst das Medium, PBS und Accutase auf 37 °C erwärmt und anschließend die Zellkulturflaschen aus dem Inkubator entnommen. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Zu Beginn wurde das alte Nährmedium entfernt und die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml PBS - Waschlösung gespült, um tote Zellen und Reste des alten Mediums zu entfernen. Nach Entfernung der PBS-Lösung erfolgte die Fütterung der Zellen mit 5 ml frischem RPMI-Medium bzw. die Zugabe von 1 ml Accutase bei vorhergesehener Teilung. Nach 5-minütiger Inkubationszeit der Accutase bei 37 °C und lichtmikroskopischer Sichtung wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 4 ml serumhaltigen Nährmedium gestoppt und die Zellen in ein Reagenzglas pipettiert um anschließend für 5 min bei 100 g zentrifugiert zu werden. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das überschüssige Medium entfernt und die Zellen erneut in Lösung mit 2 ml RPMI-1640 – Medium resuspendiert, wovon jeweils 5 Tropfen Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen mit 5 ml frischem Medium ausgesät wurden. Die Flaschen wurden jeweils mit Zelllinie, Passage, Datum und verwendetem Medium beschriftet. Für die Fluoreszenzoptischen Messungen wurden zusätzlich Zellen auf Deckgläschen in 1 ml Medium ausgesät. Die Messungen fanden jeweils 1 - 3 Tage nach der Aussaat bei gutem Anwachsen statt.

3.3 Fluoreszenzoptische Messungen (Calcium – Imaging)

Fluoreszenzoptische Messungen sind eine sensitive, viel genutzte Methode zur Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationsänderungen mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes. Hierfür wurden die UM 92.1 Zellen auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 15 mm in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen kultiviert. Vor Beginn der Messungen wurden die Zellen mit 1 µM Fura-2/AM [143], sowie gegebenenfalls mit einem Blocker für 20 - 60 min präinkubiert. In dieser Zeit diffundiert Fura-2/AM in die Zellen, wo die Acetoxymethylesterereinheit enzymatisch abgespalten wird, sodass der Farbstoff die Zelle nicht wieder verlassen kann. Der Farbstoff bildet

intrazellulär Chelatkomplexe mit freien Ca^{2+} -Ionen, die ein konträres Fluoreszenzverhalten zu dem freien Farbstoff zeigen, was den beiden Anregungswellenlängen entspricht.

Dabei ist das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale (f_{340}/f_{380}) proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Nach der Präinkubationszeit wurde die Färbung durch Waschen in einer Ringer- ähnlichen Lösung gestoppt, wobei gleichzeitig Verunreinigungen und Zellschutt entfernt wurden. Nach 5 min Adaptionszeit wurden die Zellen in die Badkammer des Mikroskops (Abbildung 8)(Olympus BW50WI, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) mit der Ringer-ähnlichen Messlösung eingebracht, eine passende Zellgruppe (Abbildung 7) im Mikroskop eingestellt und die softwaregesteuerte (TIDA v 5.0, HEKA, Lamprecht, Deutschland und T.I.L.L., Photonics, München, Deutschland bzw. cellSens, Olympus, Hamburg, Deutschland) Messung gestartet.

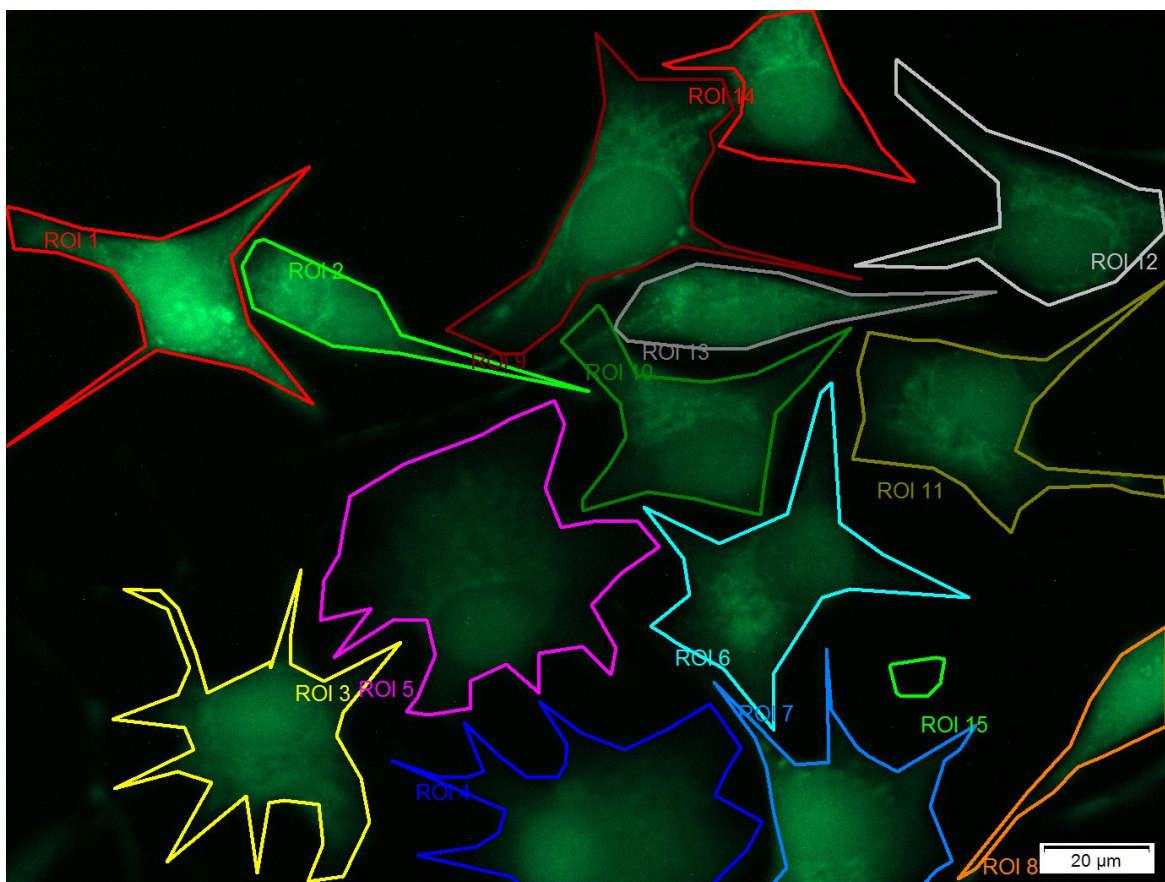


Abbildung 7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Fura-2AM gefärbten UM Zellen. Die entsprechende Emissionswellenlänge betrug 510 nm (grünes Fluoreszenzsignal). Für die Messungen wurden die Messbereiche mit Zellen (ROI = region of interest) ausgewählt, sowie ein Negativkontrollbereich (= ROI 15) markiert (Hintergrundfluoreszenz). Skalierungsbalken 20 μm . (Aufnahme Mythili Manirajah“)

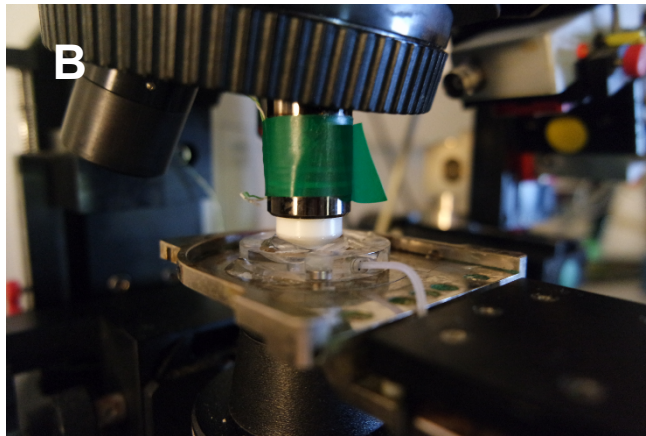
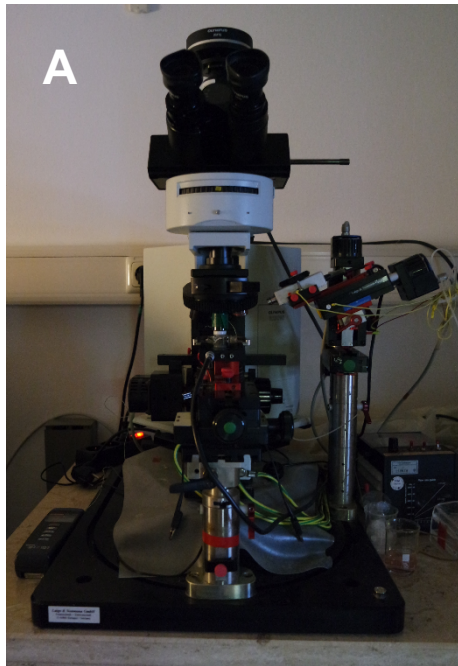


Abbildung 8 **A** Aufnahme des Calcium-Imaging Mikroskops und der Detektionseinheit im Messlabor. **B** Nahaufnahme der Badkammer während einer Messung. Der Deckglaschen mit den Zellen befindet sich auf dem Kammerboden, die Kammer ist mit Ringer ähnlicher Lösung gefüllt. (Fotos C. Budde)

Durch Austausch von Kalium gegen Cäsium in der Ringer-ähnlichen Lösung wurden Kaliumströme unterdrückt. Etwaige Natriumkanalströme sind ebenfalls aufgrund des Ruhemembranpotentials (RP) der UM-Zellen von über ca. -50 mV vernachlässigbar, da die Natriumkanäle erst bei deutlich niedrigeren Membranpotentialen aktiv werden. Die Messdauer betrug 5 bzw. 10 Minuten. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren/ Agonisten erfolgte jeweils nach 2 bzw. 4 Minuten. Bei Verwendung eines Inhibitors wurden die Zellen mit diesem für ca. 15 – 30 min präinkubiert und alle Lösungen mit diesem versetzt, um die Offenwahrscheinlichkeit der betreffenden Ionenkanäle niedrig zu halten. Es wurden regelmäßig Kontrollmessungen zur Überprüfung der Calciumhomöostase ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren/ Agonisten durchgeführt (Basismessungen). Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) statt.

Fura-2/AM ist ein Farbstoff mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm). So ergeben sich zwei Fluoreszenzantworten bei jeweils 510 nm, die auf Calciumänderungen gegensätzlich reagieren. Nach abwechselnder Stimulation der angefärbten Zellen für kurze definierte Zeitintervalle von 1 – 3 Sekunden mit 340 bzw. 380 nm wird Fluoreszenzlicht mit einer größeren Wellenlänge (510 nm) emittiert. Dieses Licht wurde dann mittels einer hochauflösenden Digitalkamera (Olympus XM-10)

aufgenommen und über die Bildauswertesoftware cellSens (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet. In einem anderen Setup wurde ein Photomultiplier (Hamamatsu, Japan) in Verbindung mit einer Fluoreszenzdetektionseinheit (TILL-Photonics, München, Deutschland) ebenfalls für die Aufzeichnung von Fluoreszenzsignalen verwendet. Dabei verhalten sich die beiden Anregungswellenlängen von Fura-2/AM gegensätzlich: Während die Fluoreszenzintensität bei 340 nm mit zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ ansteigt, verhält sich die Fluoreszenzintensität bei 380 nm antiproportional zur $[Ca^{2+}]_i$, sodass der Quotient der beiden Intensitäten f_{340}/f_{380} es erlaubt sehr geringe Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ darzustellen.

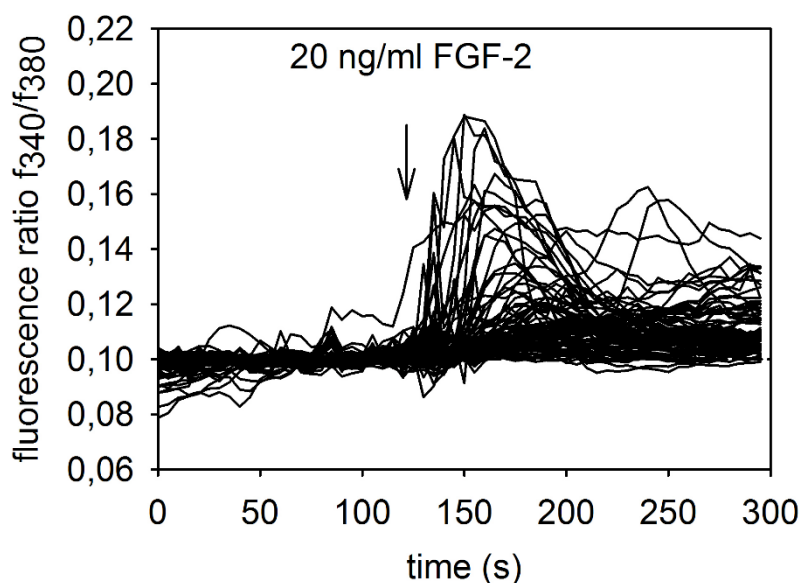


Abbildung 9 Beispiel einer fluoreszenzoptischen Messung (f_{340}/f_{380}) mit vielen Einzelkurven ($n = 101$). FGF-2 löst in vielen Zellen eine Calciumantwort aus. Die Kontrollwerte vor Zugabe von FGF-2 wurden auf den f_{340}/f_{380} Wert von 0,1 normiert. Die Calciumantworten zeigen eine typische Streuweite der einzelnen Messergebnisse, wobei insgesamt eine deutliche Signalzunahme nach Zugabe von 20 ng/ml FGF-2 erkennbar ist.

Der Quotient f_{340}/f_{380} verhält sich dabei proportional zur $[Ca^{2+}]_i$ (Beispiel in Abbildung 9). Mögliche Artefakte, wie unterschiedliche Zelldichte und verschiedene intrazelluläre Fura-2/AM-Konzentration, werden durch Bildung des Quotienten eliminiert. Da in dieser Arbeit diese Methode nur für qualitative und keine quantitativen Aussagen genutzt wurde, wurden anschließend alle primären Daten mittels der Basismessungen normiert.

3.4 Planare Patch-Clamp Technik

Die Patch-Clamp Technik ist eine hochempfindliche Methode, um kleinste Ionenkanalströme über die Zellmembran zu messen. Das Messprinzip der Patch-Clamping Technik [144] stellt ein spezielles Voltage-Clamp Verfahren dar. Um Änderungen des Membranpotenzials zu verhindern, wird ein Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt. Dabei ist

der Kompensationsstrom entgegengesetzt zum Membranstrom und wird letztendlich über den Patch-Clamp Verstärker softwaregesteuert auf einem Display angezeigt. Über den Reziprokwert des Membranwiderstandes lässt sich auf die Leitfähigkeit der Zellmembran schließen, die u.a. von der Aktivität von Ionenkanälen und Ionen transportern bestimmt wird [145].

Für die jeweiligen Messungen wurden die Zellen zunächst, wie zur Teilung, in der Zellkultur vorbereitet und mittels Accutase aus den Zellkulturflaschen gelöst und anschließend zentrifugiert. Das Medium wurde dann entfernt und die Zellen erneut mit wenig Medium in Lösung gebracht, um eine Einzel-Zell-Suspension herzustellen.

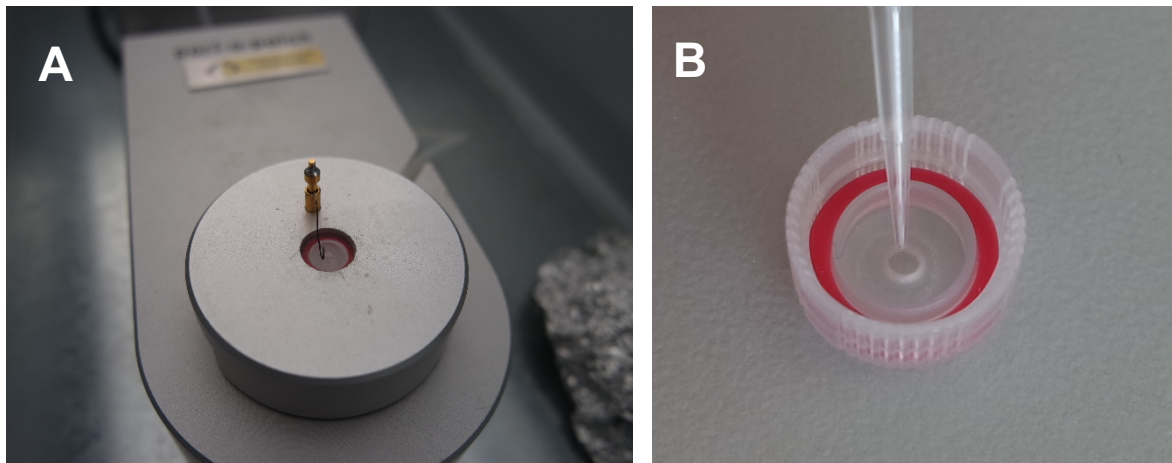


Abbildung 10 **A** Aufbau des planaren Patch-Clamp-Systems mit eingesetztem Mikrochip und angeschlossener Elektrode (Nanion® Port-a-Patch). **B** NPC Mikrochip von unten gezeigt, dabei ist der Bereich erkennbar, in den die intrazelluläre Lösung mit einer Pipette eingesetzt wird. Bei den Experimenten wird der Chip dabei in der Hand gehalten, um eine Beschädigung der Oberseite zu vermeiden. (Fotos C. Budde)

Es wurde ein planares Patch-Clamp Setup (Port-a-Patch; Nanion®, München, Deutschland)(Abbildung 10A) in Verbindung mit einem EPC-10 Patch-Clamp Verstärker (HEKA, Lamprecht, Deutschland) und der PatchMaster Software (Version 2.6; HEKA, Lamprecht, Deutschland) verwendet. Im Gegensatz zur herkömmlichen Patch-Clamp Methode ist die planare Patch-Clamp Technik generell leichter in der Handhabung unter anderem auch durch eine Teilautomatisierung. Sie ist auch weniger störanfällig als die konventionelle Methode bei gleicher Datenqualität. Zudem können stabilere Ganzzellkonfigurationen (Abbildung 11) erreicht werden und es besteht generell ein höherer Datenumsatz [146, 147]. Die Messungen wurden mithilfe von Mikrochips mit einem Widerstand von 2,5 - 3 M Ω entsprechend einer 1 - 3 μ M großen Öffnung durchgeführt. Die Elektroden wurden zur Vorbereitung in Chloridlösung oxidiert.

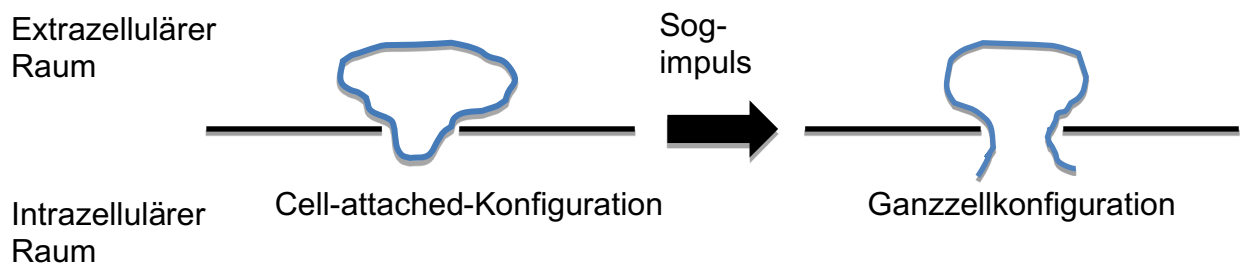


Abbildung 11 Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen; Grafik von C. Budde

Zunächst werden 5 μL intrazelluläre Lösung auf die Innenseite des Chips und 5 μL extrazelluläre Lösung auf die Außenseite des Chips pipettiert (Abbildung 10B), der Chip auf den Chiphalter gesetzt (Abbildung 10A) und das Messprogramm gestartet. Zeigt sich ein typisches Stromantwortmuster nach einer Standardstimulation (*Sweep*) mit dem Chip spezifischen Widerstand, kann die Messung beginnen. Nach Start des in dem PatchMaster vergebenden Patchprotokolls werden 5 μL der Einzelzellsuspension auf die Oberseite des Chips pipettiert. Durch die Software gesteuerte Pumpe wird ein Unterdruck erzeugt, der eine Zelle an die Öffnung ansaugt. Dann entsteht die sogenannte *On-Cell-Konfiguration*. Durch eine weitere Sogerhöhung (im Sinne einer Unterdrucksteigerung) wird anschließend in die Zelle besser mit dem Chip verbunden (*Cell-attached Konfiguration*) (Abbildung 11). Dabei optimiert die softwaregesteuerte Pumpe den Sog, sodass sich die Zelle mit dem Chip besser verbinden kann und zeigt dabei den Sealwiderstand an, was ein Maß für sogenannte Leckströme darstellt. Je höher der Sealwiderstand, desto geringer die Leckströme [148].

Dann wird eine Zelle unter Software-kontrollierten Bedingungen durch einen erneuten kurzen Sogimpuls (eine Steigerung des Unterdrucks) in die Ganz-Zell-Konfiguration (*whole-cell configuration*) (Abbildung 11) gebracht, sodass die Ströme und Kapazitäten mittels Elektroden auf beiden Seiten der Membran über die komplette Zelloberfläche gemessen werden können. Die hier untersuchten UM Zellen sind so fragil, dass in vielen Fällen schon durch einen leichten Unterdruck in die Ganz-Zell-Konfiguration eingebrochen wird.

Es besteht zudem die Möglichkeit die intra- und extrazellulären Lösungen auszutauschen und die daraus resultierenden elektrophysiologischen Veränderungen zu messen, wobei der Austausch der intrazellulären Lösung ein Alleinstellungsmerkmal

der planaren Patch-Clamp Technik ist [148]. Einzelne Ionenkanäle weisen dabei spezifische Stromantwortmuster auf. Die Messungen wurden in einem klimatisierten Raum bei einer konstanten Temperatur von 22 °C durchgeführt. Bei Sealwiderständen über 500 MΩ können sich mehr oder weniger geringe *Leakströme* ergeben. Messungen, welche *Leakströme* deutlich über 100 pA aufweisen, wurden von den Auswertungen grundsätzlich ausgeschlossen. Ansonsten wurden die *Leakströme* per Software kompensiert [144]. Vor Messbeginn wurden die Kapazitätsströme der Mikrochips (schneller Kapazitätsstrom) und die der Zellmembrankapazität (langsamer Kapazitätsstrom) kompensiert (C_{fast} und S_{slow}), sowie das *Liquid-Junction* Potential eingestellt [149]. Außerdem wurden noch die zuvor genannten *Leakströme* und der Zugangswiderstand durch die Software errechnet und mittels Verstärker kompensiert. Überkompensationen wurden manuell korrigiert. Die Ströme wurden über ein Spannungsprotokoll (Spannungsrampe) stufenlos von -60 bis 130 mV für 500 ms induziert und alle 5 s aufgezeichnet. Die so erhaltenen Stromantworten wurden in Bezug auf die Membrankapazität zur besseren Vergleichbarkeit bei verschiedenen Zellgrößen normiert um Stromdichten zu erhalten (pA/pF) [144, 146-148]. Der Mittlere Serienwiderstand R_s der Messungen betrug 3 - 64 MΩ ($n = 7 - 34$) die mittlere Membrankapazität 7 - 18,5 pF ($n = 3 - 25$) (+/- SEM). Entsprechend des Versuchsdesigns wurden nach jeweils 20 Messungen (*Sweeps*) die extrazelluläre Lösung gewechselt, bzw. Wachstumsfaktoren oder Blocker appliziert. Dabei wurde jeweils der Zeitpunkt des Lösungsaustauschs für die spätere Auswertung protokolliert.

3.5 Datenanalyse und Statistik

Die Patch-Clamp Daten wurden normiert und mittels SigmaPlot V12 über ein Elektrophysiologiemodul (Buxton Software) ausgewertet. Mittels dieser Software wurden sowohl Diagramme aus Patch-Clamp und Calcium-Daten erstellt, wobei jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie der Standardfehler (SEM) in beide Richtungen gezeigt werden. Da in dieser Arbeit vor allem qualitative und keine quantitativen Aussagen getroffen werden sollten, wurde für die fluoreszenzoptischen Messungen ein Ausgangswert festgelegt und alle Messungen auf diesen anhand des Basismessbereichs normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der GraphPad Prism Software (Kalifornien, USA), wobei jeweils die Einzelwerte zu

definierten Zeitpunkten zur Signifikanztestung verwendet wurden. Die Signifikanz wurde mithilfe des gepaarten bzw. ungepaarten Student-t-Testes nach Bestätigung der normalverteilten Messdaten (durch den Kolmogorov-Smirnov-Test) errechnet, ansonsten wurden nicht-parametrische Tests verwendet (Wilcoxon bei gepaarten Daten und Mann-Whitney bei ungepaarten Daten). Dabei wurden signifikante Ergebnisse (p-Werte $< 0,05$) mit Sternchen (*) für gepaarte bzw. Rauten (#) für ungepaarte Untersuchungen dargestellt. Ein Sternchen/ eine Raute entspricht einem p-Wert $< 0,05$ und zwei Sternchen/ Rauten einem p-Wert $< 0,01$. Die Anzahl durchgeführter Versuche steht jeweils in Klammern ($n = xx$) neben dem jeweiligen Graph bzw. Balken.

4. Ergebnisse

4.1 Zellkultur und Morphologie der UM 92.1 Zellen

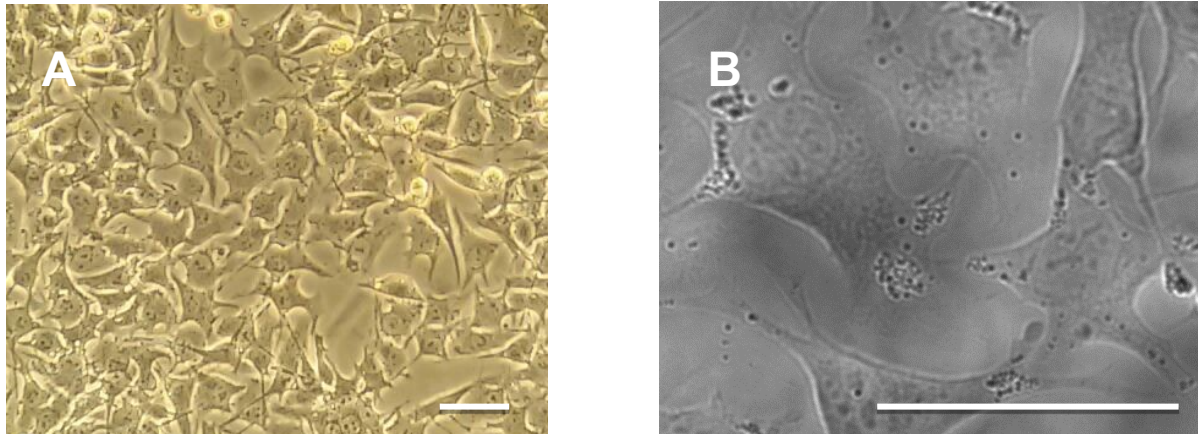


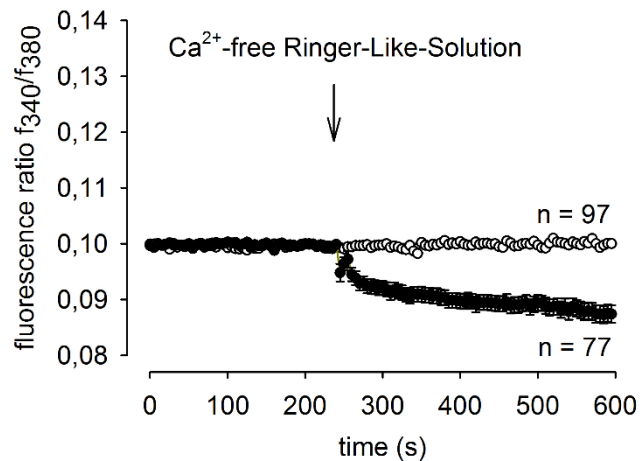
Abbildung 12 **A** Mikroskopische Aufnahmen der UM 92.1 Zelllinie in 40-facher Vergrößerung **B** Mikroskopische Aufnahmen der UM 92.1 Zelllinie in 100-facher Vergrößerung (Fotos S. Mergler) Skalierungsbalken 30 μm

In der Zellkultur zeigen die UM 92.1 Zellen ein pleomorphes Erscheinungsbild (Abbildung 12). Die Zellen verfügen, wie für Tumorzellen typisch, über große prominente Zellkerne mit einem oder mehreren Nucleoli. Es handelt sich um multipolare Zellen mit multiplen dendritischen Zytoplasma-Ausläufern (Abbildung 12B). Die Zellen zeigten ein gutes Wachstumsverhalten in dem verwendeten Nährmedium mit Konfluenz in den Kulturflaschen nach durchschnittlich zwei bis drei Tagen. Auch nach knapp 10 Jahren elektrophysiologischer Forschung mit dem UM 92.1 Zellmodell blieb die Zellmorphologie dieser Zellen unverändert fortbestehen [67].

4.2 Funktionelle Calciumregulation in UM 92.1 Zellen

Zum Nachweis einer funktionierenden Calciumregulation der verwendeten uvealen Melanomzelllinie UM 92.1 wurde der Einfluss der Zugabe von calciumfreier Ringer-ähnlicher Lösung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration untersucht. Dabei zeigte sich nach Zugabe der calciumfreien Lösung ein signifikanter Abfall ($p < 0,0001$) des Fluoreszenzquotienten (f_{340}/f_{380}), der proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ist, und zwar von $0,100 \pm 0,0002$ bei 100 s auf $0,088 \pm 0,001$ bei 590 s (Abbildung 13). Dieser Abfall war signifikant mit $p < 0,0001$ sowohl gegenüber der Basismessung als auch gegenüber des Ausgangswerts bei 100 s derselben Messung ($n = 77$), was auf eine intakte Calciumregulation hindeutet.

Die Messung zeigt, dass bei fehlendem extrazellulärem Calcium kein Ca^{2+} Einfluss passieren kann, d.h. es existieren Ca^{2+} Kanäle, die unter normalen Bedingungen einen Calciumeinstrom ermöglichen.



zytosolisch freie Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde nach extrazellulärer Applikation von Ca^{2+} freier Lösung gemessen (Pfeil). Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 77 – 97 gemessenen Einzelzellen, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verminderte sich stetig in Gegenwart der Ca^{2+} freien Lösung (n = 77; gefüllte Kreise) verglichen mit $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Kontrollbedingungen (n = 97; offene Kreise). Die leeren Kreise stellen die Basismessungen (Kontrolle) ohne Zugabe der Calciumfreien Lösung, die gefüllten Kreise, die eigentlichen Messungen dar.

Abbildung 13 Calciumverminderung in UM 92.1 Zellen nach Zugabe von Ca^{2+} freier Lösung. Die

4.3 Wirkung von Lanthanum auf die Calciumhomöostase in 92.1 Zellen

Zur Validierung von TRP-Kanälen wurde der Effekt des TRP-Kanalblockers Lanthanum-III-Chlorid (La^{3+}) (100 - 500 μM) auf die Fluoreszenzratio f_{340}/f_{380} untersucht, welche proportional zum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist, untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der des Fluoreszenzratio f_{340}/f_{380} und somit des $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die sich im Verlauf nach Zugabe von 100 μM La^{3+} nahezu normalisiert (Abbildung 14A). Nach extrazellulärer Zugabe von 500 μM La^{3+} ab der vierten Minute zeigte sich keine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 14B - C). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei 100 μM La^{3+} eine transiente Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte während dies bei 500 μM nicht zu beobachten war. Es zeigte sich sogar eine sehr marginale Ca^{2+} Erhöhung (Abbildung 14B-C). Die alleinige Blockade der TRP-Kanäle scheint somit keinen dauerhaften Einfluss auf die Calciumhomöostase auszuüben. Somit sollten die in Folgeversuchen sichtbaren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Effekte nicht durch La^{3+} induziert sein.

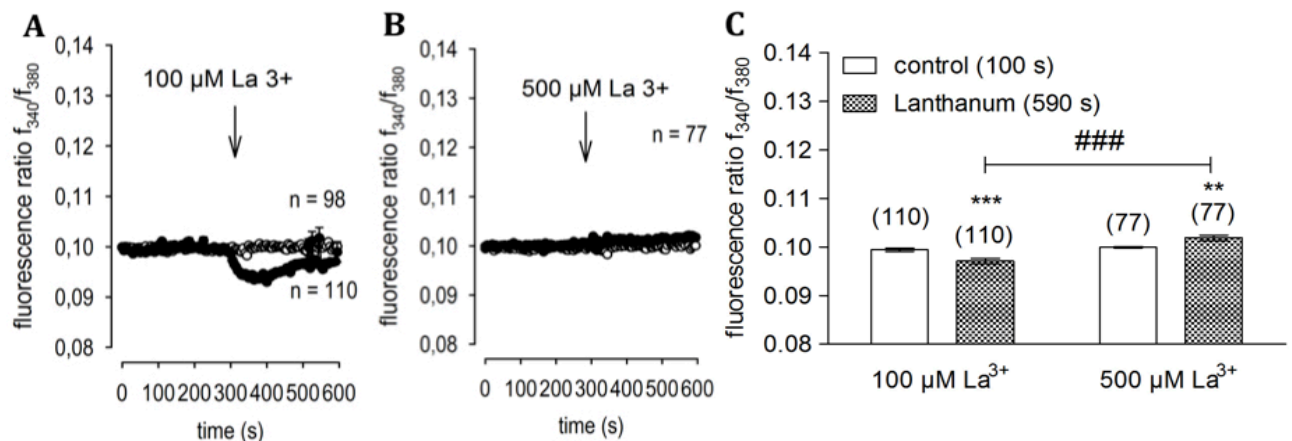


Abbildung 14 Effekt von Lanthanum auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in UM Zellen 92.1, gemessen in Ringer-ähnlicher Lösung mittels Calcium-Imaging mit fura-2/AM gefärbten Zellen. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM, Anzahl der gemessenen Zellen steht in Klammern über der jeweiligen Säule. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ werden als Änderung des Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} auf der Y-Achse dargestellt. Der Zugabezeitpunkt von Lanthanum ist mittels vertikalen Pfeiles markiert. Die offenen Kreise stellen die Basismessungen ohne Zugabe von La^{3+} , die gefüllten Kreise stellen die eigentlichen Messungen dar.

A Zugabe von 100 μM La^{3+} führt zum Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Danach nähert sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder dem Basiswert an. **B** Zugabe von 500 μM La^{3+} bewirkt nur eine minimale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **C** Vergleich und statistische Auswertung der Experimente A und B. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM dar für die verschiedenen Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten. Der erste weiße Balken ist dabei jeweils ein Kontrolldatenpunkt vor der Zugabe von La^{3+} . Signifikante Änderungen sind mit einem Sternchen (*) für gepaarte und mit einer Raute (#) für ungepaarte Student-t-Tests markiert. Die Zugabe von 100 μM La^{3+} verminderte die $\text{Ca}^{2+}]_i$; reversibel während 500 μM La^{3+} nur zu einer marginalen Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte. Der Unterschied zwischen den Endkonzentrationen beider Messungen war zwar marginal, aber dennoch signifikant (n = 77 – 110, ungepaarter t-Test, p < 0,0001).

4.4 Expression von TRPV4 in uvealen Melanomzellen

Nach Zugabe des spezifischen TRPV4 Agonisten GSK 1016790A zeigte sich ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von $0,1 \pm 0,0003$ (100 s) auf $0,11 \pm 0,002$ (590 s) ($n = 68$; $p < 0,0001$) (Abbildung 15A). Dieser Effekt wurde in Anwesenheit des spezifischen TRPV4-Blockers RN 1734 deutlich inhibiert ($p = 0,0003$, vgl. Abbildung 15B). In Anwesenheit des Blockers zeigte sich nur eine geringe Zunahme des Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} von $0,1 \pm 0,0001$ (100 s) auf $0,103 \pm 0,0009$ (590 s) ($n = 41$; $p < 0,01$) (Abbildung 15C). Durch spezifische Aktivierung des TRPV4-Kanals kommt es zu einem photometrisch nachgewiesenem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der in Anwesenheit von den spezifischen Blocker RN Sigma 1734 teilweise inhibiert wurde und somit eine funktionelle Expression von TRPV4 Kanälen in UM Zellen andeutet.

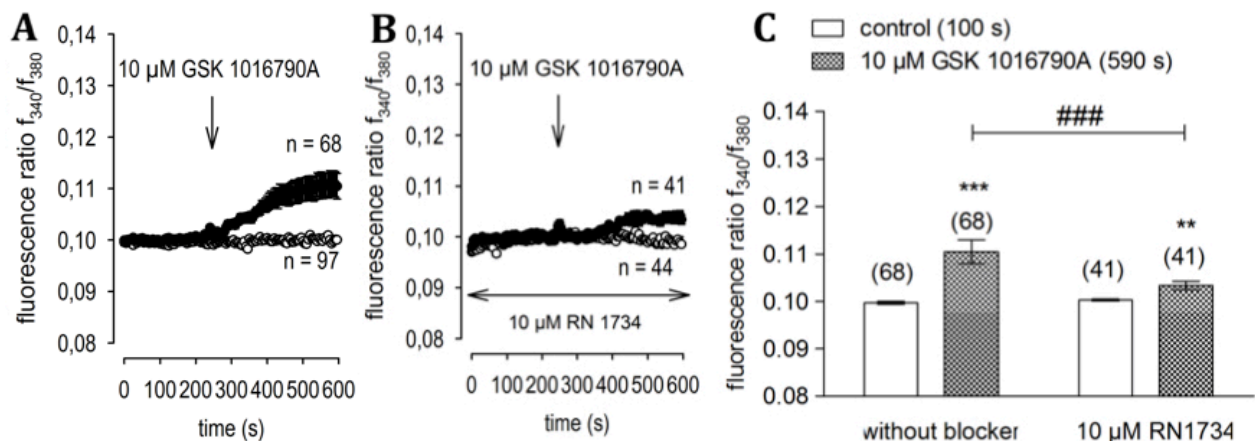


Abbildung 15 Effekt von 10 µM GSK 1016790A in An- und Abwesenheit von 10 µM RN 1734 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in humanen UM Zellen (92.1), gemessen in Ringer-ähnlicher Lösung von mit 3 µM fura-2/AM gefärbten Zellen mittels Calcium-Imaging. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM, Anzahl der gemessenen Zellen steht über der jeweiligen Säule. Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ werden als Änderung des Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} dargestellt. Der Zugabezeitpunkt von 10 µM GSK 1016790A ist mittels vertikalen Pfeiles markiert (ab der vierten Minute). Die Anwesenheit von 10 µM RN 1734 ist mittels eines horizontalen Pfeiles dargestellt.

Die offenen Kreise stellen die Basismessungen ohne Zugabe des Agonisten dar und die gefüllten Kreise stellen die eigentlichen Messungen dar. **A** Nach Zugabe von 10 µM GSK 1016790A (spezifischer TRPV4 Agonist) **B** Wiederholung des Experiments in Anwesenheit von 10 µM RN 1734 (spezifischer TRPV4 Antagonist) in allen Lösungen **C** Vergleich und statistische Auswertung der Experimente in Abschnitt A und B. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM in beide Richtungen für die verschiedenen Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten dar. Der erste weiße Balken ist dabei jeweils ein Kontrolldatenpunkt vor der Zugabe von 10 µM GSK 1016790A bei 100 s. Signifikante Änderungen sind mit Sternchen (*) für gepaarte und mit Rauten (#) für ungepaarte Student-t- Tests markiert. Nach Zugabe von GSK 1016790A zeigte sich deutlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der in Anwesenheit von RN 1734 signifikant inhibiert wurde ($n = 41 - 68$).

Zur Validierung der Expression von TRPV4 Kanälen in der UM Zelllinie wurden die Experimente mit dem Patch-Clamp Verfahren wiederholt. Hier konnte ebenso eine Zunahme der ein- und auswärtsgerichteten Ströme (Abbildung 16) nach Applikation von 10 μM GSK1016790A beobachtet werden. Nach zusätzlicher Addition von 10 μM Ruthenium Red (RuR) zeigte sich diese Stromzunahme reversibel (Abbildung 16A). Die aufgetretenen Stromantworten sind dabei typisch für TRP-Kanäle mit einem Umkehrpotential von ca. 0 mV und auswärtsrektifizierenden Strömen (Abbildung 16B). Somit konnten die Ergebnisse der fluoreszenzoptischen Experimente in den Patch-Clamp Messungen bestätigt werden.

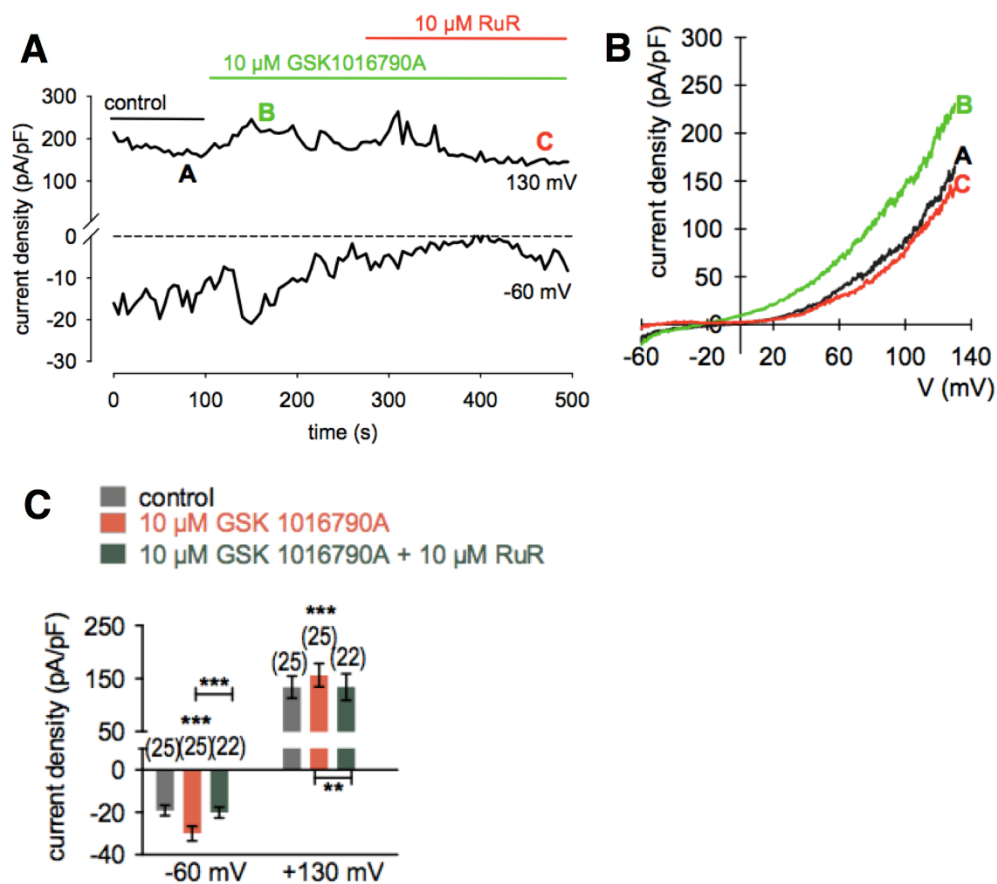


Abbildung 16 RuR inhibiert die GSK1016790A-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. **A** Aufzeichnung der Ganzzellstromzunahme nach 10 μM GSK1016790A Zugabe sowie der Stromreduktion nach Zugabe von 10 μM RuR im Zeitverlauf. **B** Original Daten der GSK1016790A-induzierten Stromantworten auf Spannungsrampen von -60 bis 130 mV. Die Stromdichten sind vor (A), während (B) GSK1016790A-Zugabe und nach zusätzlicher RuR Zugabe (C) dargestellt. Nach Zugabe von 10 μM RuR sinken die Ströme auf das Ausgangsniveau. **C** Zusammenfassung der PatchClamp Experimente mit GSK1016790A und RuR. Die Sternchen (*) symbolisieren die statistisch signifikante Zunahme der ein- und auswärts gerichteten Ströme nach GSK1016790A Zugabe (n = 25; ***p < 0,0005; gepaarter T-Test). Die Rauten (#) symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede der GSK1016790A -induzierten Ein- und Auswärtsströme in An- bzw. Abwesenheit von RuR (n = 25; p < 0,005; ungepaarter t-Test).

4.5 VEGF aktiviert TRPV1 Kanäle aber nicht TRPV4 Kanäle

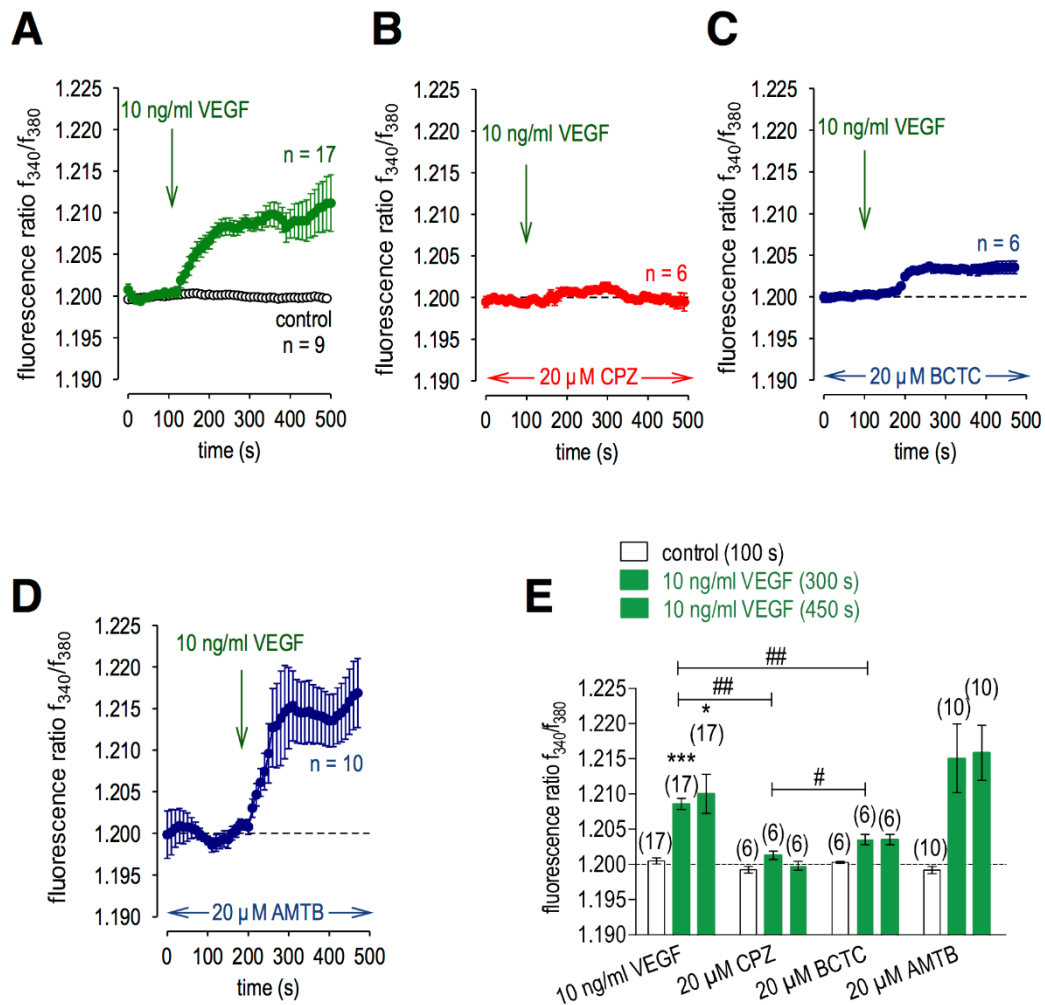


Abbildung 17 VEGF bewirkt eine TRPV1 Antwort in UM 92.1. Zellen. 10 ng/ml VEGF wurde an den durch Pfeile markierten Zeitpunkten hinzugefügt. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von 6 - 17 Versuchen dargestellt. **A** Der VEGF- induzierte Ca^{2+} Einstrom ist als Mittelwert aus 17 Experimenten dargestellt. **B** Wiederholung der Experimente aus **A** in Anwesenheit von 20 μM CPZ. CPZ inhibiert deutlich den VEGF-induzierten Ca^{2+} Einstrom. **C** Wiederholung der Experimente aus **A** in Anwesenheit von 20 μM BCTC. BCTC inhibiert teilweise den VEGF-induzierten Ca^{2+} Einstrom (n = 6). **D** Wiederholung des Experiments aus **A** in Anwesenheit von 20 μM AMTB. AMTB beeinflusst den VEGF induzierten Ca^{2+} Einstrom nicht (n = 10). **E** Zusammenfassung und statistische Auswertung der Experimente aus **A-D** mit VEGF und den verschiedenen TRP Blockern. Die Sternchen zeigen signifikante Ca^{2+} Änderungen als Antwort auf VEGF-Zugabe (n = 17; 300 s; ***p < 0,005; 450 s; *p < 0,05; gepaarter t-Test). Die Rauten (##) symbolisieren statistisch relevante Unterschiede des Fluoreszenzquotienten zwischen VEGF-Zugabe in An- bzw. Abwesenheit der TRP-Blocker (n = 6 -1 7; ## p < 0,01; ungepaarter t-Test). Eine Raute verdeutlicht einen statistisch relevanten Unterschied zwischen CPZ und BCTC induzierten Effekten auf den VEGF-induzierten Ca^{2+} Einstrom nach 300 s (n = 6; ungepaarter T-Test; p < 0,05).[68]

10 ng/ml VEGF induziert einen deutlichen Anstieg des f_{340}/f_{380} von $1,2 \pm 0,0004$ (100 s) auf $1,209 \pm 0,001$ (300 s, n = 17; p < 0,01; Abbildung 17A, E). Aus Voruntersuchungen mit kornealen Fibroblasten und Epithelzellen der Konjunktiva ist bekannt, dass VEGF einen Calciumeinstrom über TRPV1 Kanalaktivierung hervorruft. Da dieser in einer

Vorarbeit auch in UM 92.1. Zellen nachgewiesen werden konnte wurde nun weiter untersucht, ob auch der hier gesehene Calciumeinstrom über TRPV1 vermittelt wird. Hierfür wurden die vorangegangenen Experimente in Anwesenheit von unspezifischen $500 \mu\text{M La}^{3+}$ (Daten nicht gezeigt) und spezifischen TRP-Kanal-Antagonisten $20 \mu\text{M CPZ}$ für TRPV1; $20 \mu\text{M BCTC}$ für TRPM8/TRPV1 und $20 \mu\text{M AMTB}$ für TRPM8 wiederholt (Abbildung 17B - E).

In Anwesenheit von $20 \mu\text{M CPZ}$ kam es zu keinem Anstieg des Fluoreszenzquotienten ($f_{340\text{nm}}/f_{380\text{nm}} = 1,2013 \pm 0.0006$ ($n = 6$; Abbildung 17B) wohingegen mit dem TRPM8 Blocker BCTC ($20 \mu\text{M}$) die Calciumantwort nur teilweise ($1,2030 \pm 0.0005$, $p < 0.01$; $n = 6$, Abbildung 17C) und mit dem hochselektiven TRPM8 Blocker AMTB ($20 \mu\text{M}$) gar nicht supprimiert werden konnte $1,215 \pm 0.005$; $p > 0.05$; $n = 10$, Abbildung 17D). Dies lässt vermuten, dass die VEGF/VEGF-R vermittelten Calciumantworten über eine Aktivierung von TRPV1 induziert werden.

Diese Ergebnisse konnten auch in den Patch-Clamp-Messungen bestätigt werden (Abbildung 18). Die Dichte der Auswärtsströme sank dabei von -100% nach Zugabe von 10 ng/ml VEGF auf $-282,8 \% \pm 26,41 \%$ ($n = 40$, $p < 0,0001$), die Dichte der Einwärtsströme stieg dabei von 100% nach Zugabe von 10 ng/ml VEGF auf $174,9 \% \pm 8,7 \%$ ($n = 40$, $p < 0,0001$). Die Zugabe von $20 \mu\text{M AMTB}$ führte zu keiner Abnahme der Stromdichten in Anwesenheit von VEGF (bei -60 mV $-282,8 \% \pm 26,41 \%$ nur VEGF vs. $-321,5 \% \pm 40,39 \%$ VEGF + AMTB, $n = 12$, $p = 0,1858$, bei 130 mV : $174,9 \% \pm 8,7 \%$ nur VEGF und $164,0 \% \pm 8,9 \%$ VEGF + AMTB, $n = 12$, $p = 0,08428$) wohingegen die VEGF-Antwort durch $20 \mu\text{M CPZ}$ -Zugabe supprimiert werden konnte (bei -60 mV $-282,8 \% \pm 26,41 \%$ nur VEGF vs. $-74,88 \% \pm 17,75 \%$ VEGF + CPZ, $n = 8$, $p < 0,0001$, bei 130 mV : $174,9 \% \pm 8,7 \%$ nur VEGF und $95,71 \% \pm 7,924 \%$, $n = 8$, $p < 0,0001$).

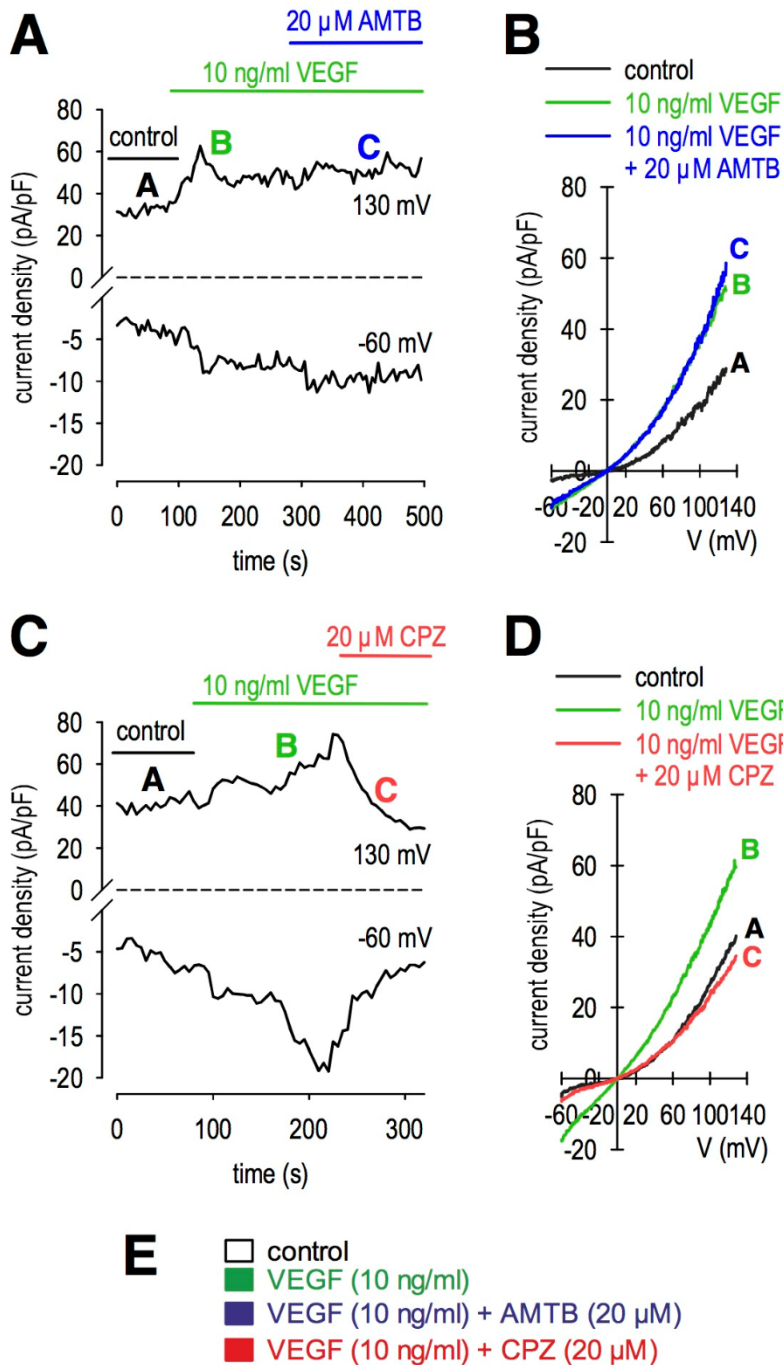


Abbildung 18 Vergleich der Effekte von CPZ und AMTB auf die VEGF-induzierten Ganzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. **A** Aufzeichnung der Ganzellstromzunahme nach 10 ng/ml VEGF Zugabe und Zugabe von 20 μM AMTB im Zeitverlauf. **B** Original Daten der VEGF-induzierten Stromantworten auf Spannungsrampen. Stromdichten vor A, während B VEGF-Zugabe und nach zusätzlicher AMTB Zugabe C sind dargestellt. **C-D** Auswertung der Versuche unter Verwendung von 20 μM CPZ anstelle von AMTB; Versuchsdurchführung identisch der Versuche **A-B**. CPZ bewirkt eine deutliche Reduktion der VEGF-induzierten Ganzellstromzunahmen. **E** Zusammenfassung der Patch-Clamp Experimente mit VEGF, AMTB und CPZ. Die Sternchen symbolisieren statistisch signifikante Änderungen der ein- und auswärts gerichteten Ströme mit VEGF und AMTB $n = 40$; $***p > 0,0005$; gepaarter t-Test). In der Anwesenheit von CPZ hatte VEGF keinen Effekt auf die Ganzellströme [68].

Es wurde weiterhin untersucht, ob 10 ng/ml VEGF neben TRPV1 auch TRPV4 Kanäle aktiviert. Dafür wurden alle Lösungen mit dem spezifischen TRPV4 Blocker RN 1734 versetzt und getestet, ob die VEGF-Antwort wiederum supprimiert werden konnte. In Positivkontrollen zeigte sich nach Zugabe von 10 ng/ml VEGF ein deutlicher Anstieg des f_{340}/f_{380} von $0,096 \pm 0,0008$ (100 s) auf $0,121 \pm 0,003$ (590 s). In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ RN 1734 stieg der Fluoreszenzquotient f_{340}/f_{380} von $0,099 \pm 0,0003$ (100 s) auf $0,13 \pm 0,003$ (590 s) irreversibel an ($p < 0,0001$). Dabei erhöhte sich das Fluoreszenzsignal auf ein ähnliches Niveau wie in Abwesenheit von RN 1734, sodass TRPV4 Kanäle eher nicht an dem VEGF vermitteltem Calciumeinstrom beteiligt zu sein scheinen (Abbildung 19).

Zusammenfassend scheinen die VEGF induzierte Zunahme des intrazellulären Calciums über eine Aktivierung von TRPV1 durch den VEGFR vermittelt zu sein.

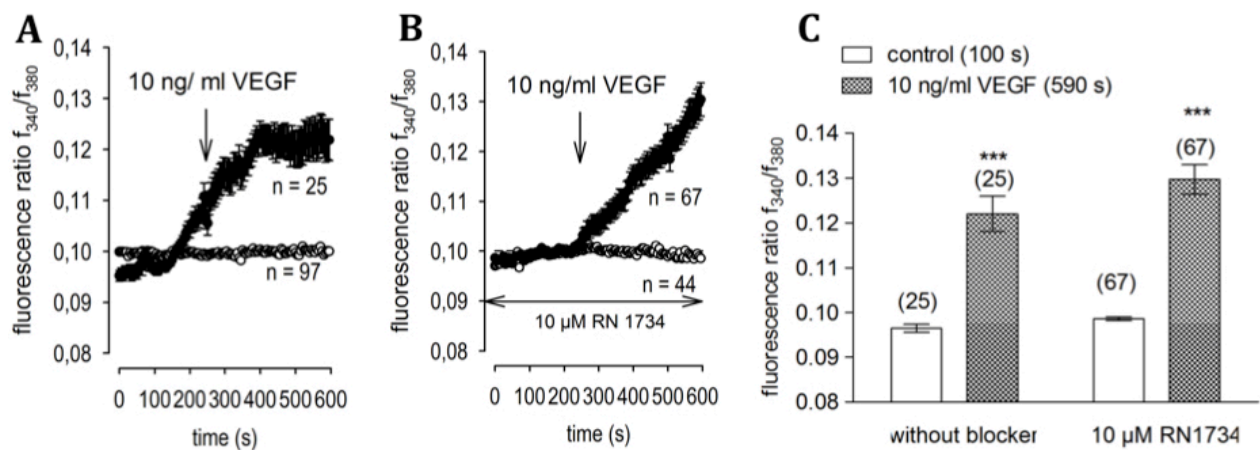


Abbildung 19 Effekt von 10 ng/ml VEGF auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in An- und Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ RN 1734 in mit $3 \mu\text{M}$ fura-2/AM gefärbten humanen uvealen Melanomzellen (92.1) gemessen mittels Calcium-Imaging in Ringer-ähnlicher Lösung. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM, Anzahl der gemessenen Zellen steht über der jeweiligen Säule. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ werden als Änderung des Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} dargestellt. Der Zugabezeitpunkt von 10 ng/ml VEGF ist mit einem Pfeil markiert. Die Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ RN 1734 ist mit einem horizontalen Pfeil dargestellt. Die offenen Kreise stellen die Basismessungen ohne Zugabe von 10 ng/ml VEGF, die gefüllten Kreise die eigentlichen Messungen mit VEGF dar. **A:** Erneute Positivkontrolle mit deutlichem Anstieg des Fluoreszenzquotienten nach VEGF-Zugabe. **B:** Wiederholung des Experiment A in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ RN 1734; es zeigt sich eine ähnliche Zunahme des Fluoreszenzquotienten. **C:** Vergleich und statistische Auswertung der Experimente A und B. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM dar für die verschiedenen Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten. Der erste Balken ist dabei jeweils ein Kontrolldatenpunkt vor der Zugabe von 10 ng/ml VEGF nach 100 s. Signifikante Änderungen sind mit Sternchen (*) für gepaarte und Rauten (#) für ungepaarte Student-t-Teste markiert. Es zeigt sich sowohl in Anwesenheit (gepaarter Student-t-Test, $p < 0,0001$) als auch in Abwesenheit (gepaarter Student-t-Test, $p < 0,0001$) von $10 \mu\text{M}$ RN 1734 ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzquotienten. Dabei zeigt sich in beiden Fällen ein ähnlicher Effekt. Der Unterschied des Fluoreszenzquotienten war bei $t = 590$ s nicht signifikant verschieden (ungepaarter Student-t-Test, $p = 0,4504$).

4.6 FGF-2 aktiviert TRPV1 und TRPV4 Kanäle

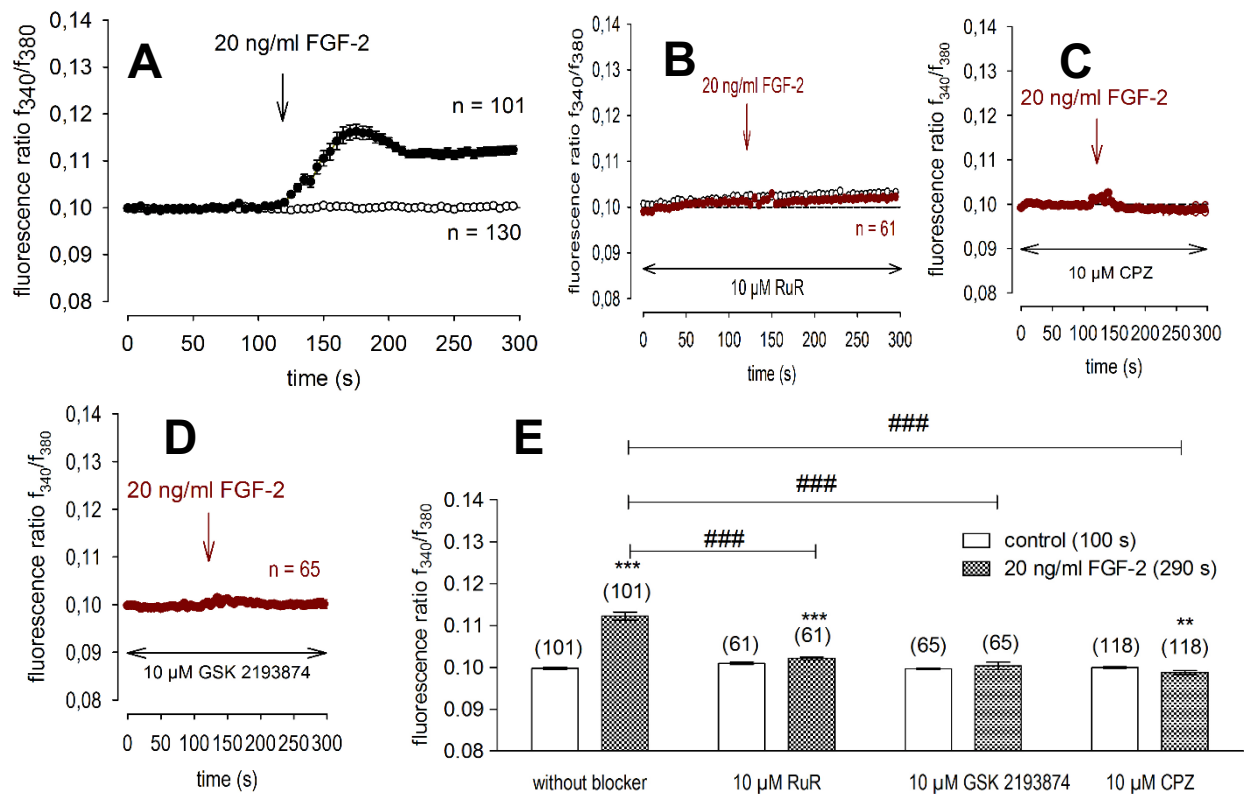


Abbildung 20 Effekt von 20 ng/ml FGF-2 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in humanen uvealen Melanomzellen und Einfluss verschiedener Blocker auf die FGF-2 Wirkung; gemessen in Ringer ähnlicher Lösung mittels fura-2/AM vermitteltem Calcium-Fluoreszenz-Imaging. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM, Anzahl der gemessenen Zellen steht über der jeweiligen Säule. Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ werden als Änderung des Fluoreszenzquotienten f_{340}/f_{380} dargestellt. Der Zugabezeitpunkt von 20 ng/ml FGF-2 ist mit einem vertikalen Pfeil markiert. Die Anwesenheit eines TRP-Antagonisten ist mit einem horizontalen Pfeil dargestellt. Die offenen Kreise stellen die Basismessungen ohne Zugabe von 20 ng/ml FGF-2, die gefüllten Kreise die eigentlichen Messungen mit Zugabe von FGF-2 nach zwei Minuten dar. **A:** Die Zugabe von FGF-2 bewirkt eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. **B:** In Anwesenheit des TRPV-Kanal-Antagonisten RuR zeigt sich keine wesentliche Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. **C:** 20 ng/ml FGF-2 bewirken keine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 10 μ M CPZ. **D:** Ebenfalls zeigt sich keine Änderung des f_{340}/f_{380} nach Zugabe von 20 ng/ml FGF-2 in Anwesenheit von 10 μ M GSK 2193874. **E:** Vergleich und statistische Auswertung der Experimente A bis D. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM für die verschiedenen Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten dar. Der erste Balken ist dabei jeweils ein Kontrolldatenpunkt vor der Zugabe von 20 ng/ml FGF-2 bei 100 s. Signifikante Änderungen sind mittels Sternchen (*) für gepaarte und mittels Rauten (#) für ungepaarte Student-t-Teste markiert. Nach Zugabe von FGF-2 ohne Blocker zeigt sich ein deutlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dieser Anstieg war deutlich inhibiert in Anwesenheit der verwendeten Antagonisten RuR, CPZ und GSK 2193874 (jeweils ungepaarter Student-t-Test, alle $p < 0,0001$).

Nachdem sich so deutliche Antworten nach VEGF-Zugabe zeigten, wurde untersucht ob auch andere Wachstumsfaktoren ähnliche TRP-Kanal vermittelte Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration hervorrufen. Hierfür wurde zunächst der alleinige Einfluss auf den Fluoreszenzquotienten mit Hilfe der Calcium-Imaging-Methode von FGF-2 untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme des f_{340}/f_{380} Quotienten von $0,1 \pm 0,0002$ (100 s) auf $0,11 \pm 0,0009$ (290 s), $n = 101$. Dieser Anstieg war sehr

deutlich (gepaarter Student-t-Test, $p < 0,0001$) (Abbildung A, E). Um zu testen, ob der FGF-2 vermittelte Calciumeinstrom über TRPs gesteuert ist, wurde auch dieses Experiment in Anwesenheit von drei verschiedenen TRP-Kanal-Blockern wiederholt. Dabei zeigte sich, dass sowohl der TRPV-Blocker $10 \mu\text{M}$ RuR ($0,101 \pm 0,0002$ bei 100 s (vor der Zugabe); $0,102 \pm 0,0003$ bei 290 s (nach der Zugabe), $p < 0,0001$, $n = 61$, Abbildung B), wie auch die spezifischen Blocker $10 \mu\text{M}$ CPZ für TRPV1 ($f_{340}/f_{380} = 0,100 \pm 0,0001$ bei 100 s und $f_{340}/f_{380} = 0,100 \pm 0,0009$ bei 290 s , $p < 0,0001$, $n = 118$, Abbildung 20C) und $10 \mu\text{M}$ GSK 2193874 für TRPV4 ($f_{340}/f_{380} = 0,1 \pm 0,0001$ (100 s), $f_{340}/f_{380} = 0,099 \pm 0,0005$ (290 s), $p < 0,0001$, $n = 65$, Abbildung 20D) die durch 20 ng/ml vermittelte FGF-2 Antwort in der verwendeten 92.1- Zelllinie effizient inhibieren konnten (Abbildung 20B - E). Somit scheint die FGF-2 induzierte Calciumantwort sowohl TRPV1 als auch TRPV4 vermittelt zu sein. Diese Ergebnisse ließen sich auch in Patch-Clamp Messungen bestätigen (Abbildung 21).

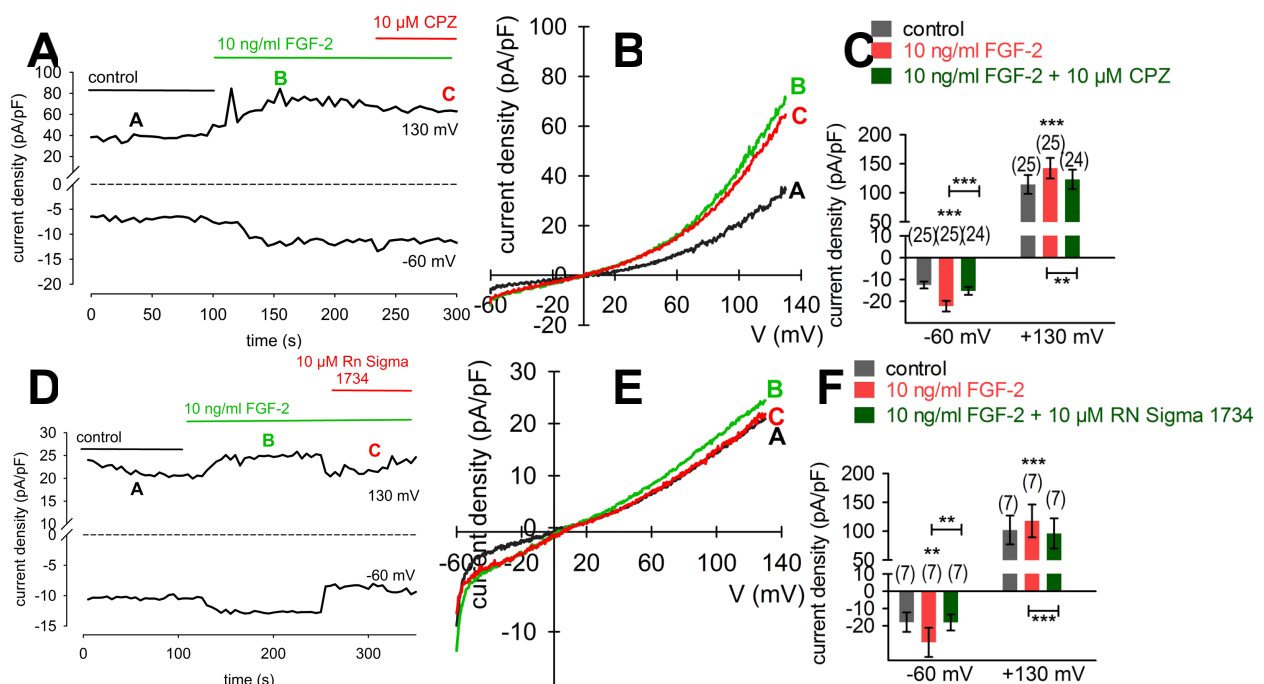


Abbildung 21 Vergleich der Effekte von CPZ und RN Sigma 1734 auf die FGF-2-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. **A** Aufzeichnung der Ganzzellstromzunahme nach 10 ng/ml FGF-2 Zugabe und Zugabe von $10 \mu\text{M}$ CPZ im Zeitverlauf. **B** Originaldaten der FGF-2- induzierten Stromantworten auf Spannungsrampen von -60 bis 130 mV . Stromdichten vor A, während B FGF-2-Zugabe und nach zusätzlicher CPZ Zugabe C sind dargestellt. **D-E** Auswertung der Versuche unter Verwendung von $10 \mu\text{M}$ RN Sigma 1734 anstelle von CPZ; die Versuchsdurchführung war identisch mit den Versuchen in **A-B**. CPZ und RN Sigma 1734 bewirken eine deutliche Reduktion der FGF-2-induzierten Ganzzellstromzunahmen. **C/F** Zusammenfassung der Patch-Clamp Experimente mit FGF-2, CPZ und RN Sigma 1734. Die Sternchen (*) symbolisieren statistisch signifikante Änderungen der ein- und auswärts gerichteten Ströme.

Zusammenfassend erscheint der FGF-2 getriggerte Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit TRPV1 und TRPV4 assoziiert zu sein.

4.7 3-T₁AM Wirkung auf die VEGF-induzierte Ca²⁺ Erhöhung

In Vorarbeiten war die funktionelle TRPM8 Expression in UM 92.1 Zellen mittels Calcium-Imaging und Patch-Clamp Experimenten nachgewiesen worden [68, 141]. Ebenso war bereits ein ähnlicher Effekt auf die [Ca²⁺]_i von 3-T₁AM, wie Menthol gezeigt worden und 3-T₁AM als selektiver TRPM8 Agonist validiert worden [68, 134-136]. Ein Crosstalk zwischen TRPM8 und TRPV1 war zuvor bereits untersucht worden; es konnte eine Inhibierung von TRPV1 Antworten durch TRPM8 Aktivierung gezeigt werden [69, 135, 136].

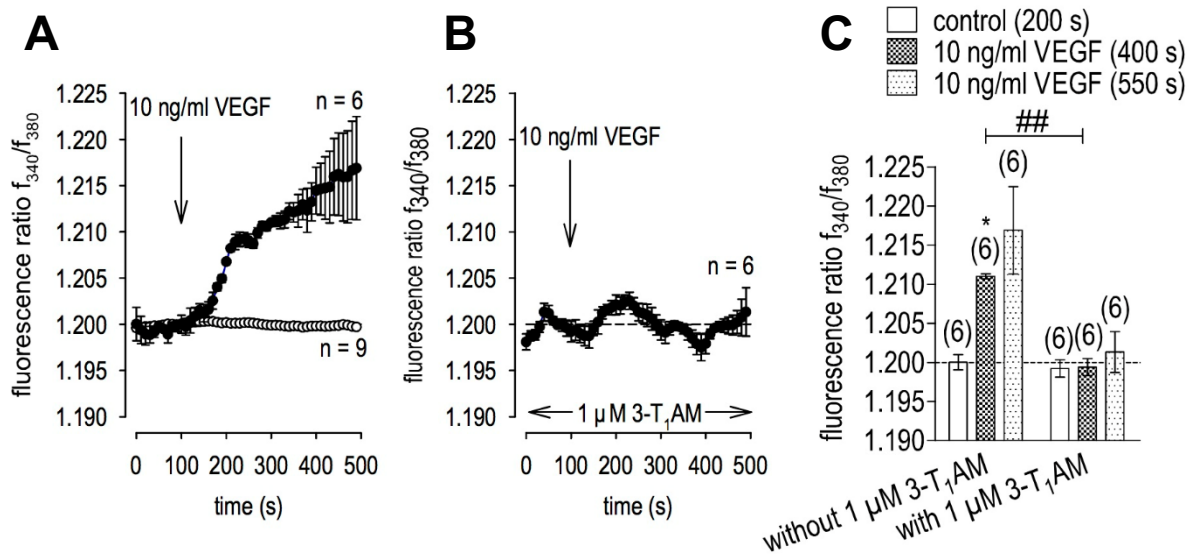


Abbildung 22 VEGF- induzierte TRPV1- Aktivierung kann durch 3-T₁AM inhibiert werden in UM 92.1. Zellen. 10 ng/ml VEGF/ 3-T₁AM wurden an den durch Pfeile markierten Zeitpunkten hinzugefügt. Es sind jeweils die Mittelwerte +/- SEM von 4 - 9 Versuchen dargestellt. **A** Der VEGF- induzierte Ca²⁺ Einstrom ist als Mittelwert aus 6 Experimenten dargestellt. **B** Wiederholung der Experimente aus A in Anwesenheit von 1 μM 3-T₁AM. 3-T₁AM inhibiert deutlich den VEGF-induzierten Ca²⁺ Einstrom (n = 6). **C** Zusammenfassung und statistische Auswertung der Experimente aus A - B mit VEGF und 3-T₁AM. Die Sternchen (*) zeigen signifikante Ca²⁺ Änderungen als Antwort auf VEGF-Zugabe (n = 6; *p < 0,05; gepaarter t-Test). Die Rauten (#) symbolisieren statistisch relevante Unterschiede des Fluoreszenzquotienten zwischen VEGF-Zugabe in An- bzw. Abwesenheit von 3-T₁AM (n = 6; ## p > 0,01; ungepaarter t-Test) [68].

Es erfolgten weitere Experimente zur Untersuchung der Fragestellung, ob auch die VEGF induzierten über TRPV1 Aktivierung vermittelten Calciumeffekte durch 3-T₁AM inhibiert werden können. Dazu wurde der Versuchsaufbau der vorherigen Experimente in Anwesenheit von 1 μM 3-T₁AM wiederholt (Abbildung 22A-C). In Anwesenheit von 3-T₁AM wurde die durch 10 ng/ml VEGF induzierte Calciumantwort vollständig inhibiert (Abbildung 22B,C). Diese Ergebnisse konnten auch in Patch-Clamp Messungen bestätigt werden (n = 7; p < 0.01, Abbildung 23).

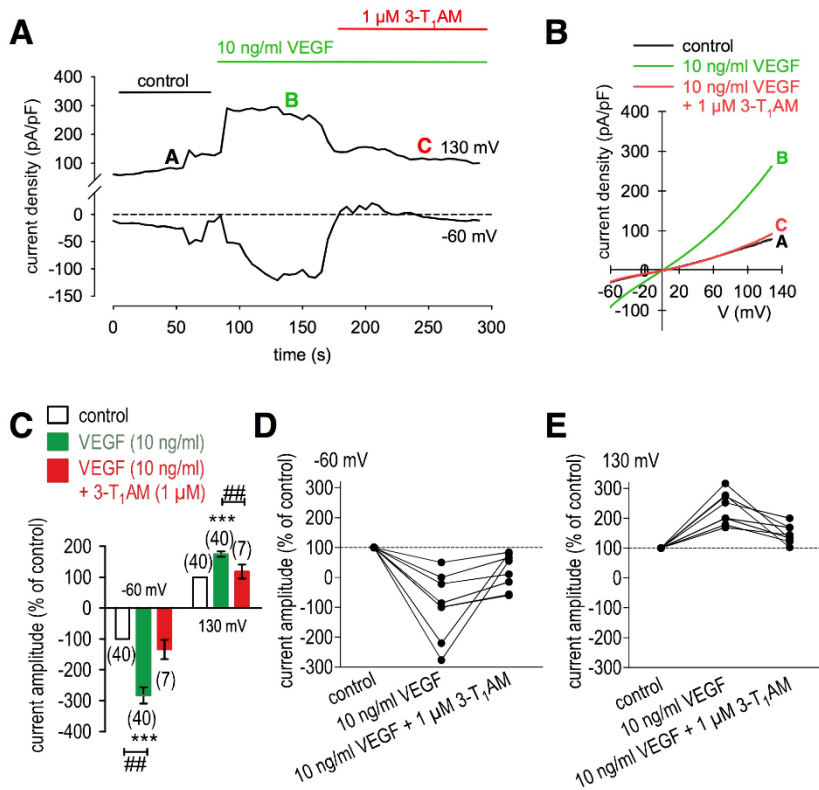


Abbildung 23 3-T₁AM inhibiert die VEGF-induzierten Ganzzellstromanstiege in 92.1 UM Zellen. **A** Aufzeichnung der Ganzzellstromzunahme nach 10 ng/ml VEGF Zugabe der Stromreduktion nach Zugabe von 1 μM 3-T₁AM im Zeitverlauf. **B** Original Daten der VEGF-induzierten Stromantworten auf Spannungsrampen von -60 bis 130 mV. Die Stromdichten sind vor (A), während (B) VEGF-Zugabe und nach zusätzlicher 3-T₁AM Zugabe (C) sind dargestellt. **C** Zusammenfassung der Patch-Clamp Experimente mit VEGF und 3-T₁AM. Die Sternchen (*) symbolisieren die statistisch signifikante Zunahme der ein- und auswärts gerichteten Ströme mit VEGF (n = 40; *** p < 0,0005; gepaarter t-Test). Die Rauten (#) symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede der VEGF-induzierten Ein- und Auswärtsströme in An- bzw. Abwesenheit von 3-T₁AM (n = 7 - 40; p < 0,01; ungepaarter t-Test). **D** Maximale negative von einem Spannungssprung von 0 auf -60 mV hervorgerufene Stromamplituden sind als prozentuale Änderungen in Bezug auf den Ausgangswert vor VEGF Zugabe dargestellt. VEGF-induzierte Einwärtsströme (n = 7; **p < 0,01) konnten in Gegenwart von 3-T₁AM (n = 7; *p < 0,05) klar inhibiert werden. **E** Maximale positive von einem Spannungssprung von 0 auf 130 mV hervorgerufene Stromamplituden sind als prozentuale Änderungen in Bezug auf den Ausgangswert vor VEGF Zugabe dargestellt. VEGF-induzierte Auswärtsströme (n = 7; ***p < 0,005) konnten in Gegenwart von 3-T₁AM (n = 7; **p < 0,01) klar inhibiert werden [68].

5. Diskussion

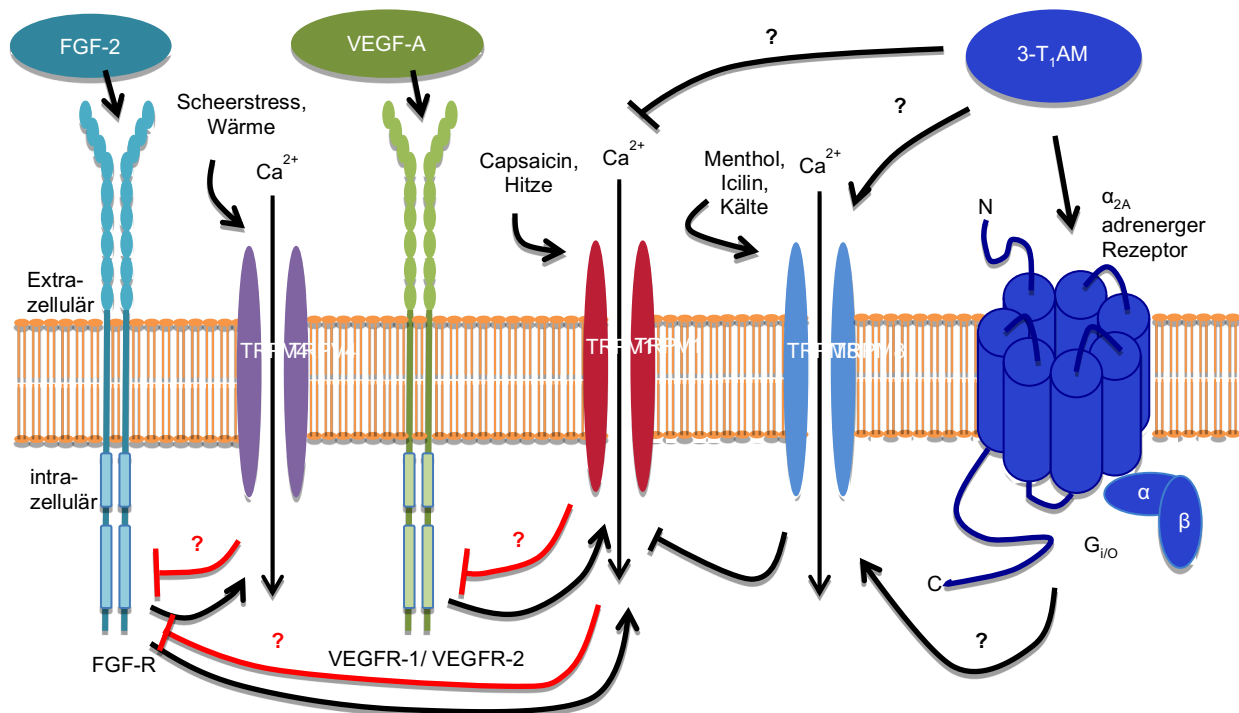


Abbildung 24 Schematische Darstellung der Ca^{2+} Signaltransduktion in UM Zellen anhand der Ergebnisse. Funktionelle TRPV4 Expression konnte erstmalig in UM Zellen gezeigt werden (Abb. 15, 16). Eine Aktivierung von TRPV1 und TRPV4 durch FGF-2 abhängige FGFR Aktivierung wurde funktionell beobachtet (Abb. 20, 21). VEGF-A aktiviert über VEGFR-1/VEGFR-2 TRPV1 (Abb. 17, 18, 19). 3-T₁AM aktiviert GPCR und direkt TRPM8. Dabei wird durch eine 3-T₁AM induzierte TRPM8 Aktivierung die VEGFR induzierte TRPV1 Aktivierung supprimiert (Abb. 22). Ebenso supprimieren andere TRPM8 Agonisten (Icillin, Menthol) die VEGFR TRPV1-Aktivierung (vgl. Walcher et al [68]).

5.1 Zellmorphologie der UM 92.1 Zellen

Die Zellen zeigen sich morphologisch für UM Zellen charakteristisch in Zellverbänden mit einem pleomorphen Erscheinungsbild. Die Zellen besitzen große prominente runde oder ovale Zellkerne mit einem oder mehreren großen Nucleoli. Sie sind multipolar mit multiplen dendritischen eosinophilen Zytoplasma-Ausläufern [142, 150] (Abbildung 12). Es zeigte sich eine identische Morphologie, wie in anderen Studien mit derselben Zelllinie [67, 150, 151] und eine ähnliche Morphologie wie andere UM Zelllinien [151, 152] (Abbildung 25). Auch entspricht die Morphologie dem Bild primärer UM.

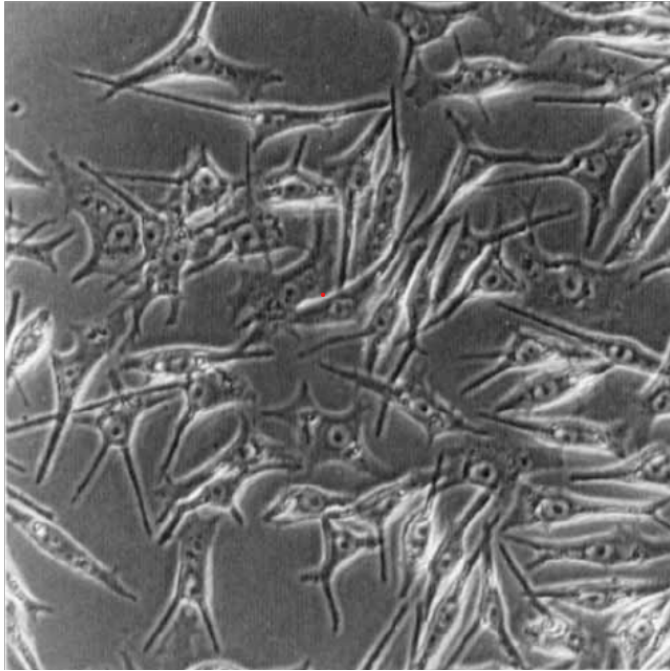


Abbildung 25 Mikroskopische Darstellung der UM 92.1 Zellen von De Waard et al 1995, mit freundlicher Erlaubnis des herausgebenden Verlages [153]

Der gesehene Phänotyp entspricht dem, der auch in der Primärkultur in der Studie von Pardo vor Auftreten kulturbedingter Änderungen des Phänotyps (Primärkultur < 7 Passagen) beschrieben wurde [154]. Auch konnten typische zytogenetische Veränderungen (GNAQ Q209L Mutation, Tetrasomie von Chromosom 6p und 8) und Antigenexpressionsmuster nachgewiesen werden für die UM 92.1 Zelllinie [142], sodass dies ein geeignetes Modell für die *in vitro* Erforschung des UM repräsentiert.

5.2 Funktionelle Calciumregulation in UM 92.1 Zellen

Im Anschluss auf die morphologische Beurteilung folgte die Untersuchung der Calciumregulation der verwendeten Zellen mittels Zugabe von Calcium-freier Ringer-ähnlicher Lösung mit 1 μM EGTA (Abbildung 13). Die erfolgte Antwort mit Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration belegt eine deutliche Calciumregulation der verwendeten Zelllinie und lässt vitale Zellen vermuten. Es bestätigt auch die funktionelle Expression von Ca^{2+} permeablen Ionenkanälen, über die diese Antwort vermittelt werden konnte. Vermutlich könnte es über TRPV6 vermittelt sein, da TRPV6 in vielen Tumoren überexprimiert und relevanter Parameter in Tumorthérapien ist [155, 156] und der hier in der Arbeit verwendete experimentelle Ansatz für die Detektion von TRPV6 ähnlich ist, wie die in anderen Calcium-Studien [157]. Entsprechend des induzierten

elektrochemischen Gradienten erfolgt der Calciumausstrom aus der Zelle durch die PMCA, was durch die Fluoreszenzabnahme widerspiegelt wird. Ähnliche Versuche mit demselben Ergebnis waren in durch Mergler et al. bereits zuvor erfolgt [67]. Die Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration zeigte sich in den Experimenten der Studie nach erneuter Calciumzugabe reversibel. Zusätzlich wurde die Beteiligung von TRP Kanälen an der Calciumhomöostase in UM 92.1 Zellen durch Wiederholung des Versuchsaufbaus in Anwesenheit von La^{3+} wiederholt, wodurch die Wiederaufnahme von Calcium in die Zelle gehemmt wurde. In derselben Studie von Mergle et al. konnte die funktionelle TRPV1 und TRPM8 Expression in UM 92.1 Zellen gezeigt werden [67].

5.3 Funktionelle Expression von TRPV4 in UM 92.1 Zellen

Die Zugabe des selektiven TRPV4 Agonisten GSK1016790A [102, 158, 159] bewirkte eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration; dieser Effekt ließ sich in Anwesenheit eines selektiven TRPV4 Antagonisten (GSK 2193874; RuR) inhibieren, was für eine funktionelle Expression von TRPV4 in UM Zellen spricht (Abbildung 15, Abbildung 16). Die verwendeten Agonisten (GSK1016790A [102, 158, 159]) und Antagonisten (GSK 2193874, RuR [101, 160-163]) sind dabei gut etabliert und als selektive Wirkstoffe anerkannt und wurden bereits in multiplen Studien zum funktionellen TRPV4 Nachweis in anderen Zellen genutzt [78, 101, 164], wobei pharmakologische Aktivierung von TRPV4 Zellschäden und Apoptose in Keratinozyten verursachen kann [165]. Auch elektrophysiologisch ließ sich dieses Ergebnis bestätigen; die Patch-Clamp Daten zeigten ein TRP-Kanal typisches Strommuster mit einem Umkehrpotential von 0 mV und auswärtsrektifizierenden Strömen. Dies stimmt ebenfalls mit ähnlichen Untersuchungen überein [67]. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig die funktionelle Expression von TRPV4 in einer UM Zelllinie nachgewiesen werden. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der PCR Daten der von Valtink et al. (nicht veröffentlichte Daten), die eine Genexpression von TRPV4 in UM 92.1 Zellen zeigen konnten.

Die in dieser Studie beobachteten Strom- und Fluoreszenzantworten (Abbildung 15, Abbildung 16) stimmen mit Studien in humanen kornealen Endothelzellen (HCEC-12) überein, was für eine funktionelle TRPV4 Expression in UM 92.1 Zellen spricht [78, 101].

Somit konnte die Reaktivität auf die in der Einleitung genannten Stimuli bestätigt werden. Dabei war TRPV4 überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert [101]. Es konnten für HCEC aber auch intrazelluläre TRPV4 Speicher nachgewiesen werden, die möglicherweise als Antwort auf gezielte Stimulation zusätzlich in die Zellmembran eingebaut werden können [101].

Die biologische Funktion der TRPV4 Expression in UM Zellen könnte, wie auch in der Diskussion für HCEC Zellen, in Zusammenhang mit der Osmo- und Scheerstresssensitivität stehen [78]. Eine durch das Tumorwachstum induzierte intraokulare Druckerhöhung kann durch den TRPV4 Sensor detektiert und eine entsprechende Gegenregulation eingeleitet werden, um das Zellüberleben zu sichern. Außerdem könnten freigesetzte Zytokine über eine Calciumspeicher Freisetzung eine Aktivierung der membranständigen TRPV4 Kanäle physiologisch stimulieren. Dabei könnte auch die in der Studie von Ye et al. entdeckte Erhöhung der TRPV4 vermittelten Glucoseaufnahme in die Zelle biologisch nützlich sein, um den erhöhten Nährstoffbedarf des Tumors bei reduzierter Stoffwechselkapazität zu decken [166].

In anderen Tumorzelllinien wie Gliomen und Kolonkarzinomen [89, 167] konnte ebenfalls eine TRPV4 Überexpression gezeigt und mit einer höheren Zellmotilität und Metastasierungsrate assoziiert werden. Dies erfolgt über verbesserte epitheliale-mesenchymale Umwandlung (EMT), wodurch das Einwandern in Blut- und Lymphgefäße erleichtert wird. In Brustkrebszellen zeigte sich eine erhöhte AKT Phosphorylierung und Aktivität nach TRPV4 Aktivierung, wodurch E-Cadherin herunterreguliert und Zellmigration erleichtert wurde [106]. Dies stellt einen der sechs Kennzeichen von Krebs [7] dar und somit könnte eine TRPV4 Expression ursächlich für die hohe Metastasierungsrate des UMs sein. Andererseits konnte auch ein proapoptotischer Effekt von TRPV4 Überaktivierung gezeigt werden [88, 165], weshalb TRPV4 Kanäle mögliche Ansatzpunkte neuer spezifischer Krebstherapien darstellen. In Melanomzellen konnte eine erhöhte TRPV4 Expression in einer Zelllinie gezeigt werden. Durch TRPV4 Aktivierung konnte die Proliferation gehemmt und Apoptose über Calciumabhängige AKT Phosphorylierung induziert werden [88]. Inwieweit diese Ergebnisse auf UM Zellen übertragbar sind, muss in Folgestudien weiter untersucht werden. In diesem Kontext wäre eine vergleichende Untersuchung der TRPV4 Expression in UM und normalen Melanozyten erforderlich [90, 106-109].

Auch eine TRPV4 abhängige Angiogeneseregulation wird diskutiert [111, 168, 169]. Adapala et al. konnte in Tumor Endothelzellen eine verminderte TRPV4 Expression beobachten, die mit einer erhöhten Steifigkeit der extrazellulären Matrix und dysfunktionaler Angiogenese mit erhöhter vaskulärer Dichte, Gefäßdurchmesser und reduzierter Perizytenabdeckung assoziiert wurde. Durch TRPV4 Überexpression oder TRPV4 Aktivierung konnten die Gefäße normalisiert werden. Zudem konnte ein verbessertes Therapieansprechen auf eine Cisplatintherapie bei Lewis Lungenkarzinomen in Mäusen beobachtet werden in kombinierter Gabe mit GSK1016790 [111]. Diesbezüglich wurde als weiterer physiologisch relevanter Stimulus auf die Angiogenese der Einfluss von FGF-2 und VEGF auf die TRPV4 Öffnungswahrscheinlichkeit untersucht und soll nachfolgend diskutiert werden. Die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen TRPV4 und Wachstumsfaktoren ist dabei erstmalig in dieser Arbeit erfolgt.

5.4 FGF-2 aktiviert TRPV1 und TRPV4

FGF-2/FGFR Aktivierung führt zur einer TRPV1- und TRPV4- Antwort wie die durchgeführten Experimente (Abbildung 20, 21) nahelegen. Die TRPV-Antwort könnte durch direkte Interaktion von FGFR und TRPV1/TRPV4 erfolgen [65] oder durch Signalkaskaden abhängigen Einbau von intrazellulären TRP Kanälen in die Zellmembran, wie sie für HCEC Zellen gezeigt werden konnten [101] (Abbildung 24). In den entsprechenden Patch-Clamp Messungen konnten auch typische TRP Kanalstromantwortmuster, wie ein Umkehrpotential von 0 mV und auswärtsrektifizierende Ströme gezeigt werden [78]. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig in der Literatur eine Interaktion von FGF-2 und TRPV4 gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in retinalen Pigmentepithelzellen beobachtet werden, aber in Bezug auf einen Crosstalk zwischen FGF-2 und spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen bzw. Rezeptortyrosinkinasen [170]. Mergler et al konnten 2003 [171] auch für humane korneale Endothelzellen (HCEC-12) bereits eine FGF/FGFR Tyrosinkinase vermittelten Calcium-Einstrom nachweisen, wodurch Zellmigration und –proliferation begünstigt wurden. In der damaligen Studie konnte eine Beteiligung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen des L-Typs in humanen Hornhautendothelzellen

gezeigt werden. Die Antworten waren durch Hemmung dieser Kanäle jedoch nicht vollständig supprimierbar, weshalb eine Aktivierung weiterer Calciumkanäle wie den TRP-Kanälen postuliert wurde. Zusätzlich wurde in einer weiteren Studie auch TRPM8-Kanäle erkannt [80, 172]. Die gemessenen Ca^{2+} Antwortmuster entsprechen auch den Ca^{2+} Antwortmustern, die in dieser Studie mit TRPV1 bzw. TRPV4 Agonisten ausgelöst wurden. Antoniotti et al. konnten in ihrer Arbeit eine FGF-2 vermittelte TRPC1 Aktivierung in der Zellmembran in nativen Endothelzellen und eine hierüber vermittelten Calciumeinstrom nachweisen, sodass scheinbar Wachstumsfaktoren ihre Calciumvermittelten Effekte auch über Aktivierung von TRP Kanälen in anderen Zelltypen hervorrufen [173]. Insgesamt ist es eine weitere spannende Erkenntnis, dass FGF-2 nicht nur SOCE vermittelt die Calciumhomöostase reguliert, sondern auch über TRP Kanäle in den Calciumhaushalt eingreift. Ein ähnlicher Befund konnte mit EGF und SOCE in humanen Hornhautepithelzellen gezeigt werden [174]. Dies gilt es zu berücksichtigen in möglichen therapeutischen Ansätzen der SOCE Modulation. Es könnte die TRPV1 und TRPV4 vermittelte Ca^{2+} Änderung die Signaltransduktion aufrechterhalten; zudem wäre es möglich, dass es kompensatorisch zur Hochregulation dieser Kanäle kommt, wodurch paradoxe Antworten hervorgerufen werden könnten. Dies weiter zu evaluieren bleibt jedoch Inhalt weiterführender Arbeiten. Rezzola et al. zeigten in ihrer Studie an UM Zellen eine FGF/FGFR abhängige E-Cadherin-Regulierung, und damit Zellmotilitätssteuerung, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt wurde [37]. Dies könnte durch die TRPV4 Aktivierung erfolgen. In Brustkrebszellen konnte eine vermehrte AKT Phosphorylierung durch TRPV4 Aktivierung gezeigt werden, wodurch die E-Cadherin Expression herunterreguliert wurde [106].

Im Kontext der Aktivierung von sowohl TRPV1 als auch TRPV4 ist es zudem deutlich, dass durch selektive Blockade der einzelnen Kanäle eine komplette Inhibierung der Calciumantwort möglich war (Abbildung 21). Dies könnte einerseits durch partielle antagonistische Wirkung der verwendeten Agenzien auch am jeweilig anderen TRP Kanal zu erklären sein. Die Tatsache, dass die Effekte jedoch auch bei Verwendung verschiedener selektiver Antagonisten (CPZ [61, 74, 175] und GSK 2193874 [160-162] und RN 1734 [176-179] für TRPV4) [180] auftrat, spricht jedoch gegen diese Möglichkeiten. Zudem wurden etablierte selektive Blocker verwendet [102, 163]. Eine alternative Erklärung wäre eine Interaktion der Kanäle untereinander, die einer

gleichzeitigen Aktivierung entgegenwirkt bzw. eine Koaktivierung/ -hemmung hervorruft. So konnte in retinalen Endothelzellen eine Heteromerbildung von TRPV1 und TRPV4 gezeigt werden, wobei eine Antagonisierung eines der Kanäle, wie in den UM Zellen zur nahezu vollständigen Inhibition der Calciumantworten führte [180]. Eine ähnliche Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV4 konnte auch in sensorischen Nervenzellen beobachtet werden [181]. Durch die Heteromerisierung wird die TRP Diversität erhöht und eine verbesserte Zellantwort auf äußere Stimuli ermöglicht [182], jedoch scheint die Heteromerisierung nicht in allen Zelltypen mit Koexpression von TRPV4 und TRPV1 zu erfolgen [183], sodass weitere Untersuchungen der Rezeptoren und deren Interaktion zur Erklärung dieses Effektes erforderlich sind.

5.5 VEGF aktiviert TRPV1

VEGF führt zur einer Aktivierung von TRPV1 über VEGFR Aktivierung (Abbildung 24). Dies konnte durch die vollständige Inhibierung der Ca^{2+} Ströme in Anwesenheit von CPZ nachgewiesen werden (Abbildung 17, Abbildung 18). Da die Inhibierung mithilfe von TRPV4-Antagonisten ebenso wenig wie mit TRPM8-Antagonisten erzielt werden konnte, scheint der VEGF induzierte Calciumeinstrom allein über TRPV1 vermittelt zu werden (Abbildung 17, Abbildung 18). Ein ähnliches Ergebnis konnte in derselben Arbeitsgruppe für einen benignen Tumor gefunden werden [84]. In retinalen Endothelzellen konnte zwar auch ein proangiogenetischer Effekt von TRPV1 Aktivierung beobachtet werden, jedoch zeigte sich kein verändertes Calciumsignal nach VEGF-Stimulation in Anwesenheit von CPZ [180]. Dies könnte bedeuten, dass in malignen Zellen die Antwort auf VEGF über veränderte Signaltransduktionsmechanismen erfolgt, die das Wachstum und dadurch die Tumorprogression begünstigen.

Auch wenn VEGF keine Aktivierung von TRPV4 bewirkt (Abbildung 19), so wurde in Endothelzellen eine TRPV4 abhängige VEGFR Aktivierung und Translokalisierung in die Zellmembran beobachtet, wodurch VEGF Effekte verstärkt wurden, [184]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in einer Studie von Chen et al. mit Ratten nach cerebraler Ischämie, wo TRPV4 Aktivierung eine VEGF Freisetzung und Angiogeneseinduktion hervorrief [185].

Mit BCTC konnte eine partielle Blockade des Calciumeinstroms erzielt werden; dies entspricht der Tatsache, dass BCTC sowohl als TRPV1 als auch TRPM8 Antagonist wirken kann [163]. Das mit dem hochspezifischen TRPM8 Antagonisten AMTB [186], der VEGF Effekt jedoch nicht gehemmt werden konnte (Abbildung 17D; Abbildung 18A,B) belegt, dass der VEGF Effekt über eine alleinige TRPV1 Aktivierung generiert wird.

5.6 3-T₁AM Wirkung

3-T₁AM ist ein Schilddrüsenhormonderivat, das im Gegensatz zu den klassischen Schilddrüsenhormonen T₃ und T₄ nicht langsam über Bindung an nukleäre Rezeptoren und Modulation der Genexpression wirkt, sondern kurzfristige Effekte über Bindung an membranständige Rezeptoren oder in den Mitochondrien bewirkt [130]. Seit der Entdeckung von 3-T₁AM wurde eine Vielzahl von Studien zur biologischen Funktion, dem Wirkmechanismus und den Signaltransduktionswegen durchgeführt. Dabei konnte als primärer membranständiger Rezeptor TAAR1 ermittelt werden, jedoch scheint 3-T₁AM als multi-target Ligand auch an adrenerge, muskarinerge und serotonerge Rezeptoren, sowie an TRPM8 binden zu können [134]. 3-T₁AM funktioniert demnach auch als TRPM8 Agonist [69]. Auch wurden durch Interaktion mit den Mitochondrien vermittelte Wirkungen in Bindehautzellen beobachtet [187]. In UM 92.1 Zellen führt 3-T₁AM zu einer TRPM8 Aktivierung [68]. Dabei scheint die 3-T₁AM induzierte Aktivierung nicht auf die TAAR1 induzierte Temperaturreduktion zurückführbar zu sein, sondern über einen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor (betaadrenerge Rezeptoren), da der Effekt auch bei konstanter Temperatur reproduzierbar war und die Rezeptoren in diversen Zelltypen im Auge exprimiert sind [188]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine TRPM8 Aktivierung TRPV1 Effekte in UM Zellen inhibiert [68]. So konnte die VEGF-induzierte TRPV1 vermittelte Calciumantwort durch 3-T₁AM inhibiert werden [68] (Abbildung 22, Abbildung 23). Dieser Mechanismus konnte auch in humanen konjunktivalen Epithelzellen gefunden werden [135, 136]. Dies ist in Zusammenhang mit der wachstumsfaktorinduzierten TRPV1 Aktivierung eine wichtige Erkenntnis, da TRPM8, wie Vorarbeiten gezeigt haben [67], nur in UM Zellen, nicht jedoch in gesunden Melanozyten exprimiert werden. Somit stellt die 3-T₁AM-TRPM8 Interaktion einen denkbaren pharmakologischen Angriffspunkt für spezifische Therapien dar, um gesundes Gewebe nicht mit anzugreifen. Insbesondere oftere in Anbetracht der Befunde

aus weiteren Studien mit 3-T₁AM an malignen Zellen, wo wachstumshemmende Effekte gesehen wurden, die in gesunden Zelllinien nicht auftraten, erscheint 3-T₁AM als vielversprechende endogene Therapieoption [138, 140].

5.7 Limitationen

Eine wesentliche Limitation dieser Forschungsarbeit liegt in der Verwendung von Zellmodellen. Zwar sind Untersuchungen an Zellkulturen auch schon aus ethischer Sicht zwingende Voraussetzung zur Durchführung von *in vivo* Studien, allerdings können nicht alle Mechanismen aus *in vitro* auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden. *In vitro* Experimente bilden auch nicht das komplette natürliche Zellnetzwerk und Tumorstroma nach, da *in vitro* zumeist Monokulturen verwendet werden und somit die Effekte des Mikroenvironments und die der Immunzellen der Umgebung nicht abgebildet werden. So können Aussagen zu Tendenzen getroffen werden, eine Überprüfung der aufgestellten Thesen in einem *in vivo* Experiment ist aber in jedem Fall sinnvoll und erforderlich vor Zulassung neuer Therapien. Ähnliche Untersuchungen sowohl von spannungsabhängigen Ca²⁺ Kanälen als auch TRP-Kanälen in neuroendokrinen Tumorzellen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Calciumkanalexpressionsmuster zwischen Zellmodellen (BON-1) und frisch isolierten Tumorzellen (Primärzellkulturen) [189, 190]. Auch das hier angewandte UM 92.1 Zellmodell zeigt gleiche Calciumantwortmuster bei unterschiedlichen Zellpassagen [68]. Es lassen sich viele Vorexperimente und Beobachtungen bereits *in vitro* durchführen, wodurch auch gemäß des 3R Studienprinzips Tierversuche reduziert und Tierleid minimiert werden kann (<https://charite3r.charite.de/>). Ein Vorteil von Tiermodellen liegt in der besseren Repräsentation der Interaktionen verschiedener Zelltypen im Gewebe, andererseits lassen sich auch nicht alle Ergebnisse aus Tierstudien aufgrund verschiedener biologischer Grundeigenschaften auf Menschen übertragen. So sind beispielsweise bestimmte Viren wie z.B. Masernviren ausschließlich humanpathogen und können Tiere nicht infizieren, während humanpathogene SARS-Cov-2 Viren durchaus auch Tiere infizieren können (z.B. Katzen, Nerze) und umgekehrt SARS-Cov-2 von Tieren auch Menschen infizieren können [191-193]

Die verwendete UM 92.1 Zelllinie weist nicht alle UM typischen Mutationen auf. Es zeigten sich Schwierigkeiten durch *in vivo* und *in vitro* Selektionsmechanismen Zelllinien mit Monosomie von Chromosom 3 und BAP1 Funktionsverlust zu etablieren. Dennoch sind wesentliche Tumormerkmale auf zytogenetischer Ebene des Primärtumors in der etablierten Ziellinie erhalten [1, 3, 142]. So finden sich in den meisten UM Zellen *in vivo* ähnliche Expressions- und Mutationsmuster. Auch konnte anhand von HLA-Mustern eine Stabilität der Zellen nachgewiesen werden, sodass die UM 92.1 Zelllinie ein brauchbares und etabliertes UM Zellmodell darstellen.

Eine weitere Limitation ist die Durchführung der Experimente mit nur einer Zelllinie. In Vorarbeiten mit verschiedenen UM Zelllinien konnte hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit eine FGF/ FGFR sowie VEGF-A Überexpression gezeigt werden [37]. Ebenso zeigten sich ähnliche TRPV1 und CB1 Expressionsmuster in PCR Untersuchungen in anderen UM Zelllinien, wohingegen die TRPM8 und TRPA1 Expression variierte. Dieser Befund steht vermutlich im Zusammenhang mit der Tumorprogression. TRPV4 Expression in anderen UM Zellen wurde bisher noch nicht untersucht [67]. Ebenso zeigte beispielsweise die Studie von Zuidervaart et al. eine Überaktivierung des MAPK für UM 92.1 ebenso wie für andere UM Zellen, sodass die UM 92.1 Zellen ein repräsentatives Modell für UM zu sein scheinen [194]. Gerade im Kontext von Tumoren mit hoher Mutationsrate und bekannten verschiedenen Mutationen wird die Validität der Aussagen durch Nutzung verschiedener Zelllinien erhöht, da hierdurch das genetische und funktionelle Spektrum des Tumors besser repräsentiert werden. Allerdings ist aus Vorarbeiten zumindest die erhöhte VEGF-A Expression für alle bekannten UM Zelllinien sowie Primärtumoren bekannt [13, 17], sodass im Rahmen dieser Experimente auf die Nutzung verschiedener Zelllinien verzichtet wurde. Es wurden bewusst niedrige Zellpassagen verwendet, wobei ein vergleichendes Experiment zwischen Zellen höherer und niedriger Passagenzahl dieselben Ergebnisse brachten (Passage 14 vs. Passage 51; Ergebnisse nicht Teil dieser Arbeit). Auch konnte von Mouriaux et al. gezeigt werden, dass nur moderate Veränderungen der Genexpression im Rahmen der Zellkultur auftreten und somit *in vitro* Versuche mit immortalisierten Zelllinien eine gute Methode für funktionelle Analysen darstellen [195].

Eine weitere Limitation liegt in den verwendeten Chemikalien. Es wurden zwar etablierte Agonisten und Antagonisten genutzt, jedoch sind auch die „selektiven“ Hemmstoffe aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der einzelnen TRP-Kanäle nicht immer selektiv, sondern können auch partiell andere Kanäle co-aktivieren. Dieser Effekt konnte in den VEGF Experimenten beobachtet werden: BCTC (vorwiegender TRPM8 Antagonist) konnte die TRPV1 induzierte Ca^{2+} Antwort teilweise inhibieren. Dies spricht für einen partiellen inhibitorischen Effekt von BCTC auf TRPV1, während durch den hochspezifischen TRPM8 Blocker AMTB [186] keine Inhibition der VEGF induzierten Antworten erfolgte. Dies ist auch aus der Literatur bekannt [97, 163, 175]. Allerdings hat BCTC nur eine unspezifische geringe Affinität zu TRPV1, wie auch die Experimente von Lucius et al. demonstrieren konnten, in denen BCTC die durch eine relativ hohe CAP Konzentration (20 μM) induzierte TRPV1 Aktivierung nicht inhibieren konnte [136]. Um solchen Fehlinterpretationen entgegenzuwirken, wurden möglichst gut etablierte selektive Agonisten und Antagonisten verwendet, bzw. Experimente mit verschiedenen Reagenzien zur Erhöhung der Validität durchgeführt. So wurde für TRPV1 Aktivierung CAP [82] bzw. Antagonisierung CPZ [196-198] verwendet; für TRPV4 Aktivierung GSK1016790A [184] und Inhibierung RnR, GSK 2193874 [184] und RN Sigma 1734, sowie für TRPM8 Aktivierung Icilin [97, 199] und BCTC [97, 163, 175] und AMBT [186] als Antagonisten verwendet. Dabei wurden die Substanzen in ähnlichen, etablierten Konzentrationen wie in anderen Studien verwendet, um toxische Nebenwirkungen auszuschließen. Auch wurden Effekte der Antagonisten auf die Calciumhomöostase der Zellen durch Experimente in Abwesenheit von Agonisten ausgeschlossen (Beispielhaft für La^{3+} , Abbildung 14). Allgemein ist die Untersuchung der TRP-Kanäle mit einem pharmakologischen Ansatz bereits gut etabliert [163].

Auch haben die verwendeten Messmethoden ihre technischen Limitationen. So können zu hohe Konzentrationen der Agonisten und Antagonisten zu Irreversibilität des Ca^{2+} Einstroms führen. Die unphysiologisch hohen Ca^{2+} Veränderungen kann die Zelle nicht mehr vollständig kompensieren und dadurch potenziell Apoptose aktivieren [165]. Außerdem können Probleme bei der Färbetechnik schwache Fluoreszenzsignale hervorrufen, sodass Messsignale sich nur wenig vom Hintergrundrauschen abheben (Signal-Rauschverhältnis). Umgekehrt können zu lang gefärbte Zellen sehr starke Fluoreszenzsignale auslösen, die mit der Zeit deutlich abnehmen (Bleaching). Zudem

können Pipettierartefakte durch starke Umwälzungen in der Badkammer auftreten, die zu erkennen und eliminieren es Erfahrung bedarf. Jedoch hilft der Zeitpunkt des möglichen Artefakts zur Unterscheidung zwischen Pipettierartefakt und echtem Signal. Artefakte können zudem auch durch vorbeischwimmende stark autofluoreszierende Teilchen verursacht werden. Stark Artefakt überlagerte Messungen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, um ein realistisches Bild der realen Gegebenheiten zu erhalten.

Das verwendete planare Patch-Clamp System hat den großen Vorteil der stark vereinfachten Handhabung gegenüber der konventionellen Patch-Clamp Methode. Jedoch muss auch hierbei eine ausreichend präzise Zellpräparation und stabile Verbindung zwischen den Zellen und dem Chip erreicht werden, um valide Messungen durchführen zu können, was mit den UM 92.1 Zellen sehr gut gelang. Häufig treten Leakstromerhöhungen beim Wechsel der extrazellulären Lösung auf. Um diese (erneut) zu kompensieren erfolgten Messunterbrechungen, was zur zuverlässigeren Auswertung der Daten erfolgte. Aufgrund der Thermosensitivität der TRPs sind gleichbleibende Untersuchungsbedingungen zwingend erforderlich. Dies wurde zu gewährleisten versucht (mittels Klimaanlage), kleinere Schwankungen sind jedoch nicht zu vermeiden gewesen. Dies erklärt kleinere Schwankungen in den Basismessungen, den Zellen wurden zudem immer eine gewisse Zeit zur Adaption an die Raumtemperatur gegeben. Kleine Rauschsignale/ Artefakte können auch durch spontane Ca^{2+} Freisetzung (z.B. automatische Ca^{2+} Speicherentleerungen) aus intrazellulären Organellen etc. bedingt sein.

5.8 Weiterer Forschungsbedarf / Ausblick

Diese Arbeit liefert bereits einen interessanten Einblick der Effekte von einzelnen Wachstumsfaktoren auf die Tumorzellen. Es zeigte sich eine deutliche TRPV1 vermittelte Calciumantwort nach VEGF Stimulation und eine TRPV1 und TRPV4 vermittelte Calciumantwort nach FGF-2 Stimulation. Des Weiteren konnte eine Interaktion von TRPM8 und TRPV1 durch gleichzeitige Aktivierung gezeigt werden. Neuere Forschungsarbeiten zu anderen malignen Tumoren zeigen zunehmend, dass das Tumorstroma, also die den Tumor umgebenden Immun- und Bindegewebszellen Tumorwachstum stark beeinflussen. Ein Vorschlag wäre den Crosstalk zwischen den

einzelnen Zellen näher zu untersuchen, um ein besseres Verständnis über die Synthesewege des VEGFs und FGF-2 *in vivo* zu erhalten, und so weitere Angriffspunkte einer zielgerichteten Therapie zu evaluieren. Auch sind weitergehende Studien zum Interaktionsmechanismus der TRP Kanäle untereinander ein interessantes weiteres Forschungsfeld.

Erstmals konnte die Expression von TRPV4 in UM Zellen nachgewiesen werden, interessant wären nun weitere Untersuchungen ob auch gesunde Melanozyten TRPV4 exprimieren oder ob dies ein Alleinstellungsmerkmal des Tumors und somit ein weiterer pharmakologischer Angriffspunkt in der UM Therapie wäre. Dies ist insbesondere klinisch relevant aufgrund der zunehmenden Daten im Hinblick auf TRPV4 Expression und Assoziation zu Tumormetastasierung und Patientenüberleben. So wären weitere Untersuchungen und eine Charakterisierung des TRPV4 sinnvoll, um dessen Funktion und Signalwege besser zu verstehen zu können. Im Retinoblastom, dem häufigsten malignen Tumor im Auge im Kindesalter konnte beispielsweise ein Zusammenhang zwischen TRP-Expressionsmuster und Chemotherapie Resistenzen hergestellt werden. Retinoblastomzelllinien, die resistent gegenüber einer Etoposidchemotherapie sind, exprimieren keine TRPA1 Kanäle. In diesen Zellen konnte im Gegensatz zu Etoposid-sensiblen Zellen eine Cannabinoidrezeptoraktivierung keine TRPV1 Hemmung bewirken [82]. So wäre es interessant auch im UM weitere Studien durchzuführen, um zu überprüfen, ob die veränderten TRP Expressionsmuster zu Therapieresistenzen führen und inwieweit man dies therapeutisch nutzen kann, um effektive Therapien zu entwickeln.

Quellenverzeichnis

- 1 Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, Angelini G, Barisione G, Ferrini S, Pfeffer U. The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2017;36:109-140.
- 2 Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Grossniklaus HE, Stern MH, Carvajal RD, Belfort RN, Jia R, Shields JA, Damato BE. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:24.
- 3 Alvarez-Rodriguez B, Latorre A, Posch C, Somoza A. Recent advances in uveal melanoma treatment. *Med Res Rev* 2017;37:1350-1372.
- 4 Introduction: Uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2008;86 Thesis 4:7-19.
- 5 Sachsenweger M. *Augenheilkunde. Duale Reihe: Augenheilkunde: Georg Thieme Verlag, 2003. p. S.194.*
- 6 Retrieved 03.03.2021, from <https://augenlinik.charite.de/leistungen/aderhautmelanom/>.
- 7 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 8 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- 9 Yang J, Manson DK, Marr BP, Carvajal RD. Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Ther Adv Med Oncol* 2018;10:1758834018757175.
- 10 Cheng Y, Feng J, Zhu X, Liang J. Cytokines concentrations in aqueous humor of eyes with uveal melanoma. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e14030.
- 11 Nagarkatti-Gude N, Bronkhorst IH, van Duinen SG, Luyten GP, Jager MJ. Cytokines and chemokines in the vitreous fluid of eyes with uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:6748-6755.
- 12 Barak V, Pe'er J, Kalickman I, Frenkel S. VEGF as a biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Curr Eye Res* 2011;36:386-390.
- 13 Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, Zijlmans HJ, Lau C, Eilers PH, Keunen JE, Jager MJ. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1428-1434.
- 14 Missotten GS, Schlingemann RO, Jager MJ. Angiogenesis and vascular endothelial growth factors in intraocular tumors. *Dev Ophthalmol* 2010;46:123-132.
- 15 el Filali M, van der Velden PA, Luyten GP, Jager MJ. Anti-angiogenic therapy in uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* 2012;49:117-136.

- 16 Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156:361-381.
- 17 Koch KR, Refaian N, Hos D, Schlereth SL, Bosch JJ, Cursiefen C, Heindl LM. Autocrine impact of VEGF-A on uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2697-2704.
- 18 Finger PT, Chin KJ, Semenova EA. Intravitreal anti-VEGF therapy for macular radiation retinopathy: a 10-year study. *Eur J Ophthalmol* 2016;26:60-66.
- 19 el Filali M, Ly LV, Luyten GP, Versluis M, Grossniklaus HE, van der Velden PA, Jager MJ. Bevacizumab and intraocular tumors: an intriguing paradox. *Mol Vis* 2012;18:2454-2467.
- 20 Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM, Strauss O. Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6001-6008.
- 21 Reichhart N, Keckeis S, Fried F, Fels G, Strauss O. Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253:865-874.
- 22 Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;57:4593-4599.
- 23 Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:391-400.
- 24 Dithmer M, Kirsch AM, Gräfenstein L, Wang F, Schmidt H, Coupland SE, Fuchs S, Roider J, Klettner AK. [Uveal Melanoma Cell Under Oxidative Stress - Influence of VEGF and VEGF-Inhibitors]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2019;236:295-307.
- 25 Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2835-2842.
- 26 Daud A, Kluger HM, Kurzrock R, Schimmoller F, Weitzman AL, Samuel TA, Moussa AH, Gordon MS, Shapiro GI. Phase II randomised discontinuation trial of the MET/VEGF receptor inhibitor cabozantinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2017;116:432-440.
- 27 Chiarelli F, Spagnoli A, Basciani F, Tumini S, Mezzetti A, Cipollone F, Cuccurullo F, Morgese G, Verrotti A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to

- glycaemic control and microvascular complications. *Diabet Med* 2000;17:650-656.
- 28 Schlingemann RO, Van Noorden CJ, Diekman MJ, Tiller A, Meijers JC, Koolwijk P, Wiersinga WM. VEGF levels in plasma in relation to platelet activation, glycemic control, and microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013;36:1629-1634.
- 29 Boyd SR, Tan D, Bunce C, Gittos A, Neale MH, Hungerford JL, Charnock-Jones S, Cree IA. Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol* 2002;86:448-452.
- 30 Boyd SR, Tan DS, de Souza L, Neale MH, Myatt NE, Alexander RA, Robb M, Hungerford JL, Cree IA. Uveal melanomas express vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and support endothelial cell growth. *Br J Ophthalmol* 2002;86:440-447.
- 31 Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:REVIEWS3005.
- 32 Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116-129.
- 33 Wang Y, Bao X, Zhang Z, Sun Y, Zhou X. FGF2 promotes metastasis of uveal melanoma cells via store-operated calcium entry. *Onco Targets Ther* 2017;10:5317-5328.
- 34 Jensen RL, Lee YS, Guijrati M, Origitano TC, Wurster RD, Reichman OH. Inhibition of in vitro meningioma proliferation after growth factor stimulation by calcium channel antagonists: Part II--Additional growth factors, growth factor receptor immunohistochemistry, and intracellular calcium measurements. *Neurosurgery* 1995;37:937-946; discussion 946-937.
- 35 Mergler S, Strauss O, Strowski M, Prada J, Drost A, Langrehr J, Neuhaus P, Wiedenmann B, Ploeckinger U. Insulin-like growth factor-1 increases intracellular calcium concentration in human primary neuroendocrine pancreatic tumor cells and a pancreatic neuroendocrine tumor cell line (BON-1) via R-type Ca²⁺ channels and regulates chromogranin a secretion in BON-1 cells. *Neuroendocrinology* 2005;82:87-102.
- 36 Notting IC, Missotten GS, Sijmons B, Boonman ZF, Keunen JE, van der Pluijm G. Angiogenic profile of uveal melanoma. *Curr Eye Res* 2006;31:775-785.
- 37 Rezzola S, Ronca R, Loda A, Nawaz MI, Tobia C, Paganini G, Maccarinelli F, Giacomini A, Semeraro F, Mor M, Presta M. The Autocrine FGF/FGFR System in both Skin and Uveal Melanoma: FGF Trapping as a Possible Therapeutic Approach. *Cancers (Basel)* 2019;11.

- 38 Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, Hines L, Baumgartner KB, Torres-Mejia G, Wolff RK. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140:587-601.
- 39 Suzuki T, Yasuda H, Funaishi K, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Tani T, Hamamoto J, Ohashi A, Naoki K, Betsuyaku T, Soejima K. Multiple roles of extracellular fibroblast growth factors in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2015;46:423-429.
- 40 Li Z, Sasaki Y, Mezawa M, Wang S, Li X, Yang L, Wang Z, Zhou L, Araki S, Matsumura H, Takai H, Ogata Y. cAMP and fibroblast growth factor 2 regulate bone sialoprotein gene expression in human prostate cancer cells. *Gene* 2011;471:1-12.
- 41 Stanisz H, Saul S, Müller CS, Kappl R, Niemeyer BA, Vogt T, Hoth M, Roesch A, Bogeski I. Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:442-453.
- 42 Lefevre G, Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mrzyk S, Mascarelli F. Activation of the FGF2/FGFR1 autocrine loop for cell proliferation and survival in uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1047-1057.
- 43 Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 2019;176:1248-1264.
- 44 Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:385-403.
- 45 Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-2049.
- 46 Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:1-19.
- 47 el Filali M, Missotten GS, Maat W, Ly LV, Luyten GP, van der Velden PA, Jager MJ. Regulation of VEGF-A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2329-2337.
- 48 Crosby MB, Yang H, Gao W, Zhang L, Grossniklaus HE. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with number and location of micrometastases in a murine model of uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2011;95:112-117.
- 49 Foss AJ, Alexander RA, Jefferies LW, Hungerford JL, Harris AL, Lightman S. Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res* 1996;56:2900-2903.

- 50 Ly LV, Odish OF, Wolff-Rouendaal D, Missotten GS, Luyten GP, Jager MJ. Intravascular presence of tumor cells as prognostic parameter in uveal melanoma: a 35-year survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:658-665.
- 51 Hegde PS, Wallin JJ, Mancao C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of angiogenesis inhibitors as immunotherapeutics. *Semin Cancer Biol* 2018;52:117-124.
- 52 Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 2013;39:61-73.
- 53 Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 2012;287:31666-31673.
- 54 Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, Iwakiri Y, Nathanson MH, Yamaguchi K. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium* 2010;48:315-323.
- 55 Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007;131:1047-1058.
- 56 Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-529.
- 57 Stewart TA, Yapa KT, Monteith GR. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:2502-2511.
- 58 Deliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:2512-2522.
- 59 McAndrew D, Grice DM, Peters AA, Davis FM, Stewart T, Rice M, Smart CE, Brown MA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10:448-460.
- 60 Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, De Lorenzo MS, Xie LH, Feng X, Oda K, Makino A, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, Ishikawa Y, Iwatsubo K. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration. *PLoS One* 2014;9:e89292.
- 61 Zhang F, Yang H, Wang Z, Mergler S, Liu H, Kawakita T, Tachado SD, Pan Z, Capo-Aponte JE, Pleyer U, Koziel H, Kao WW, Reinach PS. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *J Cell Physiol* 2007;213:730-739.
- 62 Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87:165-217.

- 63 Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011;12:218.
- 64 Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol* 2012;3:324.
- 65 Reinach PS, Mergler S, Okada Y, Saika S. Ocular transient receptor potential channel function in health and disease. *BMC Ophthalmol* 2015;15 Suppl 1:153.
- 66 Veldhuis NA, Poole DP, Grace M, McIntyre P, Bunnett NW. The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. *Pharmacol Rev* 2015;67:36-73.
- 67 Mergler S, Derckx R, Reinach PS, Garreis F, Bohm A, Schmelzer L, Skosyrski S, Ramesh N, Abdelmessih S, Polat OK, Khajavi N, Riechardt AI. Calcium regulation by temperature-sensitive transient receptor potential channels in human uveal melanoma cells. *Cell Signal* 2014;26:56-69.
- 68 Walcher L, Budde C, Bohm A, Reinach PS, Dhandapani P, Ljubojevic N, Schweiger MW, von der Waydbrink H, Reimers I, Kohrle J, Mergler S. TRPM8 Activation via 3-Iodothyronamine Blunts VEGF-Induced Transactivation of TRPV1 in Human Uveal Melanoma Cells. *Front Pharmacol* 2018;9:1234.
- 69 Khajavi N, Mergler S, Biebermann H. 3-Iodothyronamine, a Novel Endogenous Modulator of Transient Receptor Potential Melastatin 8? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:198.
- 70 Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 2005;451:204-211.
- 71 Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 2010;16:1396-1399.
- 72 Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N. Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 2000;527 Pt 1:71-83.
- 73 Mergler S, Garreis F, Sahlmuller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2011;226:1828-1842.
- 74 Mergler S, Garreis F, Sahlmuller M, Lyras EM, Reinach PS, Dwarakanath A, Paulsen F, Pleyer U. Calcium regulation by thermo- and osmosensing transient receptor potential vanilloid channels (TRPVs) in human conjunctival epithelial cells. *Histochem Cell Biol* 2012;137:743-761.

- 75 Yang Y, Yang H, Wang Z, Okada Y, Saika S, Reinach PS. Wakayama symposium: dependence of corneal epithelial homeostasis on transient receptor potential function. *Ocul Surf* 2013;11:8-11.
- 76 Mergler S, Pleyer U. [Physiology of the human corneal endothelium--new insights from electrophysiological investigations]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2011;228:520-524.
- 77 Mergler S, Pleyer U. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:359-378.
- 78 Mergler S, Valtink M, Taetz K, Sahlmuller M, Fels G, Reinach PS, Engelmann K, Pleyer U. Characterization of transient receptor potential vanilloid channel 4 (TRPV4) in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2011;93:710-719.
- 79 Mergler S, Valtink M, Coulson-Thomas VJ, Lindemann D, Reinach PS, Engelmann K, Pleyer U. TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2010;90:758-770.
- 80 Mergler S, Mertens C, Valtink M, Reinach PS, Szekely VC, Slavi N, Garreis F, Abdelmessih S, Turker E, Fels G, Pleyer U. Functional significance of thermosensitive transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) expression in immortalized human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2013;116:337-349.
- 81 Yang Y, Yang H, Wang Z, Mergler S, Wolosin JM, Reinach PS. Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res* 2013;107:121-129.
- 82 Mergler S, Cheng Y, Skosyrski S, Garreis F, Pietrzak P, Kociok N, Dwarakanath A, Reinach PS, Kakkassery V. Altered calcium regulation by thermosensitive transient receptor potential channels in etoposide-resistant WERI-Rb1 retinoblastoma cells. *Exp Eye Res* 2012;94:157-173.
- 83 Oronowicz J, Reinhard J, Reinach PS, Ludwiczak S, Luo H, Omar Ba Salem MH, Kraemer MM, Biebermann H, Kakkassery V, Mergler S. Ascorbate-induced oxidative stress mediates TRP channel activation and cytotoxicity in human etoposide-sensitive and -resistant retinoblastoma cells. *Lab Invest* 2021;101:70-88.
- 84 Garreis F, Schroder A, Reinach PS, Zoll S, Khajavi N, Dhandapani P, Lucius A, Pleyer U, Paulsen F, Mergler S. Upregulation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel Activity and Ca²⁺ Influx Dysfunction in Human Pterygial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:2564-2577.
- 85 Nilius B, Owsianik G. Channelopathies converge on TRPV4. *Nat Genet* 2010;42:98-100.
- 86 Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:937-946.

- 87 Bai VU, Murthy S, Chinnakannu K, Muhletaler F, Tejwani S, Barrack ER, Kim SH, Menon M, Veer Reddy GP. Androgen regulated TRPM8 expression: a potential mRNA marker for metastatic prostate cancer detection in body fluids. *Int J Oncol* 2010;36:443-450.
- 88 Zheng J, Liu F, Du S, Li M, Wu T, Tan X, Cheng W. Mechanism for Regulation of Melanoma Cell Death via Activation of Thermo-TRPV4 and TRPV2. *J Oncol* 2019;2019:7362875.
- 89 Liu X, Zhang P, Xie C, Sham KWY, Ng SSM, Chen Y, Cheng CHK. Activation of PTEN by inhibition of TRPV4 suppresses colon cancer development. *Cell Death Dis* 2019;10:460.
- 90 Lee WH, Choong LY, Jin TH, Mon NN, Chong S, Liew CS, Putti T, Lu SY, Harteneck C, Lim YP. TRPV4 plays a role in breast cancer cell migration via Ca(2+)-dependent activation of AKT and downregulation of E-cadherin cell cortex protein. *Oncogenesis* 2017;6:e338.
- 91 Liu Z, Wu H, Wei Z, Wang X, Shen P, Wang S, Wang A, Chen W, Lu Y. TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142:1871-1881.
- 92 Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Control of TRPC and store-operated channels by protein kinase C. *Novartis Found Symp* 2004;258:172-185; discussion 185-178, 263-176.
- 93 Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007;76:387-417.
- 94 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-824.
- 95 Khajavi N, Reinach PS, Skrzypski M, Lude A, Mergler S. L-carnitine reduces in human conjunctival epithelial cells hypertonic-induced shrinkage through interacting with TRPV1 channels. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:790-803.
- 96 Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:485-493.
- 97 Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 2004;141:737-745.
- 98 Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* 2006;281:8991-8995.

- 99 Hartel M, di Mola FF, Selvaggi F, Mascetta G, Wente MN, Felix K, Giese NA, Hinz U, Di Sebastiano P, Buchler MW, Friess H. Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management. *Gut* 2006;55:519-528.
- 100 Yang Y, Yang H, Wang Z, Varadaraj K, Kumari SS, Mergler S, Okada Y, Saika S, Kingsley PJ, Marnett LJ, Reinach PS. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory responses to corneal injury. *Cell Signal* 2013;25:501-511.
- 101 Pan Z, Yang H, Mergler S, Liu H, Tachado SD, Zhang F, Kao WW, Koziel H, Pleyer U, Reinach PS. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell Calcium* 2008;44:374-385.
- 102 Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ES, Gordon E, Evans L, Misajet BA, Demarini DJ, Nation JH, Casillas LN, Marquis RW, Votta BJ, Sheardown SA, Xu X, Brooks DP, Laping NJ, Westfall TD. N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino)-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:432-442.
- 103 Nilius B, Watanabe H, Vriens J. The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflugers Arch* 2003;446:298-303.
- 104 Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T. TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C195-205.
- 105 Hope JM, Greenlee JD, King MR. Mechanosensitive Ion Channels: TRPV4 and P2X7 in Disseminating Cancer Cells. *Cancer J* 2018;24:84-92.
- 106 Lee WH, Choong LY, Mon NN, Lu S, Lin Q, Pang B, Yan B, Krishna VS, Singh H, Tan TZ, Thiery JP, Lim CT, Tan PB, Johansson M, Harteneck C, Lim YP. TRPV4 Regulates Breast Cancer Cell Extravasation, Stiffness and Actin Cortex. *Sci Rep* 2016;6:27903.
- 107 Fiorio Pla A, Ong HL, Cheng KT, Brossa A, Bussolati B, Lockwich T, Paria B, Munaron L, Ambudkar IS. TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene* 2012;31:200-212.
- 108 Fang Y, Liu G, Xie C, Qian K, Lei X, Liu Q, Liu G, Cao Z, Fu J, Du H, Liu S, Huang S, Hu J, Xu X. Pharmacological inhibition of TRPV4 channel suppresses malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma via modulation of ERK signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2018;101:910-919.

- 109 Huang R, Wang F, Yang Y, Ma W, Lin Z, Cheng N, Long Y, Deng S, Li Z. Recurrent activations of transient receptor potential vanilloid-1 and vanilloid-4 promote cellular proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma cells. *FEBS Open Bio* 2019;9:206-225.
- 110 Peters AA, Jamaludin SYN, Yapa K, Chalmers S, Wiegman AP, Lim HF, Milevskiy MJG, Azimi I, Davis FM, Northwood KS, Pera E, Marcial DL, Dray E, Waterhouse NJ, Cabot PJ, Gonda TJ, Kenny PA, Brown MA, Khanna KK, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Oncosis and apoptosis induction by activation of an overexpressed ion channel in breast cancer cells. *Oncogene* 2017;36:6490-6500.
- 111 Adapala RK, Thoppil RJ, Ghosh K, Cappelli HC, Dudley AC, Paruchuri S, Keshamouni V, Klagsbrun M, Meszaros JG, Chilian WM, Ingber DE, Thodeti CK. Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene* 2016;35:314-322.
- 112 Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPM Family Channels in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018;11.
- 113 Olivares E, Salgado S, Maidana JP, Herrera G, Campos M, Madrid R, Orio P. TRPM8-Dependent Dynamic Response in a Mathematical Model of Cold Thermoreceptor. *PLoS One* 2015;10:e0139314.
- 114 Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002;108:705-715.
- 115 Andersen HH, Gazerani P, Arendt-Nielsen L. High-Concentration L-Menthol Exhibits Counter-Irritancy to Neurogenic Inflammation, Thermal and Mechanical Hyperalgesia Caused by Trans-cinnamaldehyde. *J Pain* 2016;17:919-929.
- 116 Du S, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Sawada N, Takeda M. Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs. *Urology* 2008;72:450-455.
- 117 Boldyrev OI, Sotkis HV, Kuliieva Ie M, Vladymyrova IA, Filippov IB, Skryma R, Prevars'ka N, Shuba Ia M. [Expression of the cold receptor TRPM8 in the smooth muscles of the seminal ejaculatory ducts in rats]. *Fiziol Zh* 2009;55:17-27.
- 118 Tsumura M, Sobhan U, Sato M, Shimada M, Nishiyama A, Kawaguchi A, Soya M, Kuroda H, Tazaki M, Shibukawa Y. Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. *PLoS One* 2013;8:e82233.
- 119 Du GJ, Li JH, Liu WJ, Liu YH, Zhao B, Li HR, Hou XD, Li H, Qi XX, Duan YJ. The combination of TRPM8 and TRPA1 expression causes an invasive phenotype in lung cancer. *Tumour Biol* 2014;35:1251-1261.

- 120 Bilecik T, Karateke F, Elkan H, Gokce H. The effects of TRPM2, TRPM6, TRPM7 and TRPM8 gene expression in hepatic ischemia reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23:3088-3095.
- 121 Valero ML, Mello de Queiroz F, Stuhmer W, Viana F, Pardo LA. TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. *PLoS One* 2012;7:e51825.
- 122 Liu J, Chen Y, Shuai S, Ding D, Li R, Luo R. TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3beta pathway. *Tumour Biol* 2014;35:8969-8977.
- 123 Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Morita A, Shimada S. TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C296-301.
- 124 Yee NS. Roles of TRPM8 Ion Channels in Cancer: Proliferation, Survival, and Invasion. *Cancers (Basel)* 2015;7:2134-2146.
- 125 Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* 2007;117:1647-1657.
- 126 Leanza L, Biasutto L, Managò A, Gulbins E, Zoratti M, Szabò I. Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol* 2013;4:227.
- 127 Hoefig CS, Köhrle J, Brabant G, Dixit K, Yap B, Strasburger CJ, Wu Z. Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1864-1872.
- 128 Saba A, Chiellini G, Frascarelli S, Marchini M, Ghelardoni S, Raffaelli A, Tonacchera M, Vitti P, Scanlan TS, Zucchi R. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* 2010;151:5063-5073.
- 129 Roy G, Placzek E, Scanlan TS. ApoB-100-containing lipoproteins are major carriers of 3-iodothyronamine in circulation. *J Biol Chem* 2012;287:1790-1800.
- 130 Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, Frascarelli S, Crossley DA, Bunzow JR, Ronca-Testoni S, Lin ET, Hatton D, Zucchi R, Grandy DK. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 2004;10:638-642.
- 131 Köhrle J. The Colorful Diversity of Thyroid Hormone Metabolites. *Eur Thyroid J* 2019;8:115-129.
- 132 Köhrle J, Biebermann H. 3-Iodothyronamine-A Thyroid Hormone Metabolite With Distinct Target Profiles and Mode of Action. *Endocr Rev* 2019;40:602-630.

- 133 Doyle KP, Suchland KL, Ciesielski TM, Lessov NS, Grandy DK, Scanlan TS, Stenzel-Poore MP. Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury. *Stroke* 2007;38:2569-2576.
- 134 Schanze N, Jacobi SF, Rijntjes E, Mergler S, Del Olmo M, Hoefig CS, Khajavi N, Lehmpful I, Biebermann H, Mittag J, Kohrle J. 3-Iodothyronamine Decreases Expression of Genes Involved in Iodide Metabolism in Mouse Thyroids and Inhibits Iodide Uptake in PCCL3 Thyrocytes. *Thyroid* 2017;27:11-22.
- 135 Khajavi N, Reinach PS, Slavi N, Skrzypski M, Lucius A, Strauss O, Kohrle J, Mergler S. Thyronamine induces TRPM8 channel activation in human conjunctival epithelial cells. *Cell Signal* 2015;27:315-325.
- 136 Lucius A, Khajavi N, Reinach PS, Kohrle J, Dhandapani P, Huimann P, Ljubojevic N, Grotzinger C, Mergler S. 3-Iodothyronamine increases transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) activity in immortalized human corneal epithelial cells. *Cell Signal* 2016;28:136-147.
- 137 Turker E, Garreis F, Khajavi N, Reinach PS, Joshi P, Brockmann T, Lucius A, Ljubojevic N, Turan E, Cooper D, Schick F, Reinholz R, Pleyer U, Kohrle J, Mergler S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induced Downstream Responses to Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and 3-Iodothyronamine (3-TIAM) in Human Corneal Keratocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:670.
- 138 Rogowski M, Gollahon L, Chellini G, Assadi-Porter FM. Uptake of 3-iodothyronamine hormone analogs inhibits the growth and viability of cancer cells. *FEBS Open Bio* 2017;7:587-601.
- 139 Tremmel E, Hofmann S, Kuhn C, Heidegger H, Heublein S, Hermelink K, Wuerstlein R, Harbeck N, Mayr D, Mahner S, Ditsch N, Jeschke U, Vattai A. Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2019;11:87-97.
- 140 Shinderman-Maman E, Cohen K, Moskovich D, Hercbergs A, Werner H, Davis PJ, Ellis M, Ashur-Fabian O. Thyroid hormones derivatives reduce proliferation and induce cell death and DNA damage in ovarian cancer. *Sci Rep* 2017;7:16475.
- 141 Böhm A. Charakterisierung von temperatursensitiven Transient-Rezeptor-Potenzial- Kanälen in kultivierten Aderhautmelanomzellen (92.1). Charite Universitätsmedizin Berlin
Refubium FU Berlin
<https://refubiumfu-berlin.de/handle/fub188/1670> 2017.
- 142 De Waard-Siebinga I, Blom D-JR, Griffioen M, Schrier PI, Hoogendoorn E, Beverstock G, Danen EHJ, Jager MJ. Establishment and Characterization of an uveal Melanoma cell line. *International Journal for Cancer* 1995;62:155-161.

- 143 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
- 144 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1981:85-100.
- 145 Liem LK, Simard JM, Song Y, Tewari K. The patch clamp technique. *Neurosurgery* 1995;36:382-392.
- 146 Brüggemann A, Stoelzle S, George M, Behrends JC, Fertig N. Microchip Technology for Automated and Parallel Patch-Clamp Recording. *small* 2006;2:840-846.
- 147 Milligan CJ, Li J, Sukumar P, Majeed Y, Dallas ML, English A, Emery P, Porter KE, Smith AM, McFadzean I, Beccano-Kelly D, Bahnasi Y, Cheong A, Naylor J, Zeng F, Liu X, Gamper N, Jiang L-H, Pearson HA, Peers C, Robertson B, Beech DJ. Robotic multiwell planar patch-clamp for native and primary mammalian cells. *Nature Protocols*, print copy in press 2009. Available from: doi:10.1038/nprot.2008.230.
- 148 Brüggemann A, Farre C, Haarmann C, Haythornthwaite A, Kreir M, Stoelzle S, George M, Fertig N. Planar Patch Clamp: Advances in Electrophysiology. *Methods in Molecular Biology* 2008;Potassium Channels:165-176.
- 149 Barry PH. 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* 1994;51:107-116.
- 150 Jager MJ, Magner JA, Ksander BR, Dubovy SR. Uveal Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2016;114:T5.
- 151 Cools-Lartigue JJ, McCauley CS, Marshall JC, Di Cesare S, Gregoire F, Anteckka E, Logan P, Burnier MN. Immunomagnetic isolation and in vitro expansion of human uveal melanoma cell lines. *Mol Vis* 2008;14:50-55.
- 152 Nareyeck G, Zeschnigk M, Bornfeld N, Anastassiou G. Novel cell lines derived by long-term culture of primary uveal melanomas. *Ophthalmologica* 2009;223:196-201.
- 153 De Waard-Siebinga I, Blom DJ, Griffioen M, Schrier PI, Hoogendoorn E, Beverstock G, Danen EH, Jager MJ. Establishment and characterization of an uveal-melanoma cell line. *Int J Cancer* 1995;62:155-161.
- 154 Pardo M, Garcia A, Thomas B, Pineiro A, Akoulitchev A, Dwek RA, Zitzmann N. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells

- shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int J Cancer* 2006;119:1014-1022.
- 155 Skrzypski M, Kolodziejski PA, Mergler S, Khajavi N, Nowak KW, Strowski MZ. TRPV6 modulates proliferation of human pancreatic neuroendocrine BON-1 tumour cells. *Biosci Rep* 2016;36.
 - 156 Stewart JM. TRPV6 as A Target for Cancer Therapy. *J Cancer* 2020;11:374-387.
 - 157 Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S, Szczepankiewicz D, Kolodziejski PA, Metzke D, Wojciechowicz T, Billert M, Nowak KW, Strowski MZ. TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:3202-3210.
 - 158 Xu X, Gordon E, Lin Z, Lozinskaya IM, Chen Y, Thorneloe KS. Functional TRPV4 channels and an absence of capsaicin-evoked currents in freshly-isolated, guinea-pig urothelial cells. *Channels (Austin)* 2009;3:156-160.
 - 159 Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, Suzuki M, Zhang DX. TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H466-476.
 - 160 Liao J, Wu Q, Qian C, Zhao N, Zhao Z, Lu K, Zhang S, Dong Q, Chen L, Li Q, Du Y. TRPV4 blockade suppresses atrial fibrillation in sterile pericarditis rats. *JCI Insight* 2020;5.
 - 161 Buday T, Kovacikova L, Ruzinak R, Plevkova J. TRPV4 antagonist GSK2193874 does not modulate cough response to osmotic stimuli. *Respir Physiol Neurobiol* 2017;236:1-4.
 - 162 White JP, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, Nagy I. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol Rev* 2016;96:911-973.
 - 163 Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 2009;75:1262-1279.
 - 164 Skrzypski M, Kakkassery M, Mergler S, Grotzinger C, Khajavi N, Sassek M, Szczepankiewicz D, Wiedenmann B, Nowak KW, Strowski MZ. Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms. *FEBS Lett* 2013;587:3281-3287.
 - 165 Olivan-Viguera A, Garcia-Otin AL, Lozano-Gerona J, Abarca-Lachen E, Garcia-Malinis AJ, Hamilton KL, Gilaberte Y, Pueyo E, Kohler R. Pharmacological activation of TRPV4 produces immediate cell damage and induction of apoptosis in human melanoma cells and HaCaT keratinocytes. *PLoS One* 2018;13:e0190307.

- 166 Ye L, Kleiner S, Wu J, Sah R, Gupta RK, Banks AS, Cohen P, Khandekar MJ, Bostrom P, Mepani RJ, Laznik D, Kamenecka TM, Song X, Liedtke W, Mootha VK, Puigserver P, Griffin PR, Clapham DE, Spiegelman BM. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 2012;151:96-110.
- 167 Ou-Yang Q, Li B, Xu M, Liang H. TRPV4 promotes the migration and invasion of glioma cells via AKT/Rac1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503:876-881.
- 168 Guarino BD, Adapala RK, Kanugula AK, Lenkey NM, Dougherty JA, Paruchuri S, Khan M, Thodeti CK. Extracellular Vesicles From Pathological Microenvironment Induce Endothelial Cell Transformation and Abnormal Angiogenesis via Modulation of TRPV4 Channels. *Front Cell Dev Biol* 2019;7:344.
- 169 Yu S, Huang S, Ding Y, Wang W, Wang A, Lu Y. Transient receptor potential ion-channel subfamily V member 4: a potential target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2019;10:497.
- 170 Mergler S, Steinhausen K, Wiederholt M, Strauss O. Altered regulation of L-type channels by protein kinase C and protein tyrosine kinases as a pathophysiologic effect in retinal degeneration. *FASEB J* 1998;12:1125-1134.
- 171 Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U. Calcium influx induced by activation of receptor tyrosine kinases in SV40-transfected human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2003;77:485-495.
- 172 Mergler S, Pleyer U, Reinach P, Bednarz J, Dannowski H, Engelmann K, Hartmann C, Yousif T. EGF suppresses hydrogen peroxide induced Ca²⁺ influx by inhibiting L-type channel activity in cultured human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2005;80:285-293.
- 173 Antoniotti S, Lovisollo D, Fiorio Pla A, Munaron L. Expression and functional role of bTRPC1 channels in native endothelial cells. *FEBS Lett* 2002;510:189-195.
- 174 Yang H, Sun X, Wang Z, Ning G, Zhang F, Kong J, Lu L, Reinach PS. EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells. *J Membr Biol* 2003;194:47-58.
- 175 Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol* 2005;68:518-527.
- 176 Lee K, Byun J, Kim B, Yeon J, Tai J, Lee SH, Kim TH. TRPV4-Mediated Epithelial Junction Disruption in Allergic Rhinitis Triggered by House Dust Mites. *Am J Rhinol Allergy* 2020:1945892420964169.
- 177 Feetham CH, Nunn N, Lewis R, Dart C, Barrett-Jolley R. TRPV4 and K(Ca) ion channels functionally couple as osmosensors in the paraventricular nucleus. *Br J Pharmacol* 2015;172:1753-1768.

- 178 Feetham CH, Nunn N, Barrett-Jolley R. The depressor response to intracerebroventricular hypotonic saline is sensitive to TRPV4 antagonist RN1734. *Front Pharmacol* 2015;6:83.
- 179 Sun L, Yao K, Zhang H, Chen W. Activation of the ATP-P2X pathway by TRPV4 in acute ocular hypertension. *Int J Ophthalmol* 2020;13:1697-1704.
- 180 O'Leary C, McGahon MK, Ashraf S, McNaughten J, Friedel T, Cincola P, Barabas P, Fernandez JA, Stitt AW, McGeown JG, Curtis TM. Involvement of TRPV1 and TRPV4 Channels in Retinal Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60:3297-3309.
- 181 Kim S, Barry DM, Liu XY, Yin S, Munanairi A, Meng QT, Cheng W, Mo P, Wan L, Liu SB, Ratnayake K, Zhao ZQ, Gautam N, Zheng J, Karunarathne WK, Chen ZF. Facilitation of TRPV4 by TRPV1 is required for itch transmission in some sensory neuron populations. *Sci Signal* 2016;9:ra71.
- 182 Cheng W, Sun C, Zheng J. Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 2010;1:802-810.
- 183 Lakk M, Young D, Baumann JM, Jo AO, Hu H, Krizaj D. Polymodal TRPV1 and TRPV4 Sensors Colocalize but Do Not Functionally Interact in a Subpopulation of Mouse Retinal Ganglion Cells. *Front Cell Neurosci* 2018;12:353.
- 184 Kanugula AK, Adapala RK, Midha P, Cappelli HC, Meszaros JG, Paruchuri S, Chilian WM, Thodeti CK. Novel noncanonical regulation of soluble VEGF/VEGFR2 signaling by mechanosensitive ion channel TRPV4. *FASEB J* 2019;33:195-203.
- 185 Chen CK, Hsu PY, Wang TM, Miao ZF, Lin RT, Juo SH. TRPV4 Activation Contributes Functional Recovery from Ischemic Stroke via Angiogenesis and Neurogenesis. *Mol Neurobiol* 2018;55:4127-4135.
- 186 Lashinger ES, Steingra MS, Hieble JP, Leon LA, Gardner SD, Nagilla R, Davenport EA, Hoffman BE, Laping NJ, Su X. AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F803-810.
- 187 Dinter J, Khajavi N, Muhlhaus J, Wienchol CL, Coster M, Hermsdorf T, Staubert C, Kohrle J, Schoneberg T, Kleinau G, Mergler S, Biebermann H. The Multitarget Ligand 3-Iodothyronamine Modulates beta-Adrenergic Receptor 2 Signaling. *Eur Thyroid J* 2015;4:21-29.
- 188 Matsuo T, Cynader MS. Localization of alpha-2 adrenergic receptors in the human eye. *Ophthalmic Res* 1992;24:213-219.
- 189 Mergler S. Ca²⁺ channel characteristics in neuroendocrine tumor cell cultures analyzed by color contour plots. *J Neurosci Methods* 2003;129:169-181.

- 190 Mergler S, Skrzypski M, Sassek M, Pietrzak P, Pucci C, Wiedenmann B, Strowski MZ. Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cell Signal* 2012;24:233-246.
- 191 Sailleau C, Dumarest M, Vanhomwegen J, Delaplace M, Caro V, Kwasiborski A, Hourdel V, Chevaillier P, Barbarino A, Comtet L, Pourquier P, Klonjkowski B, Manuguerra JC, Zientara S, Le Poder S. First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis* 2020.
- 192 Murcia P, Streiker D, Philippe ADS, Robertson D, Jarrett R, Willett B, Hosie M, Biek R, Allan K, Weir W. Send cat and dog samples to test for SARS-CoV-2. *Vet Rec* 2020;186:571.
- 193 Abdel-Moneim AS, Abdelwhab EM. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. *Pathogens* 2020;9.
- 194 Zuidervaart W, van Nieuwpoort F, Stark M, Dijkman R, Packer L, Borgstein AM, Pavey S, van der Velden P, Out C, Jager MJ, Hayward NK, Gruis NA. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. *Br J Cancer* 2005;92:2032-2038.
- 195 Mouriaux F, Zaniolo K, Bergeron MA, Weidmann C, De La Fouchardiere A, Fournier F, Droit A, Morcos MW, Landreville S, Guerin SL. Effects of Long-term Serial Passaging on the Characteristics and Properties of Cell Lines Derived From Uveal Melanoma Primary Tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:5288-5301.
- 196 Liu L, Simon SA. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett* 1997;228:29-32.
- 197 Teng HP, Huang CJ, Yeh JH, Hsu SS, Lo YK, Cheng JS, Cheng HH, Chen JS, Jiann BP, Chang HT, Huang JK, Jan CR. Capsazepine elevates intracellular Ca²⁺ in human osteosarcoma cells, questioning its selectivity as a vanilloid receptor antagonist. *Life Sci* 2004;75:2515-2526.
- 198 Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 1997;121:1461-1467.
- 199 Rawls SM, Gomez T, Ding Z, Raffa RB. Differential behavioral effect of the TRPM8/TRPA1 channel agonist icilin (AG-3-5). *Eur J Pharmacol* 2007;575:103-104.
- 200 Amirouchene-Angelozzi N, Nemati F, Gentien D, et al. Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target. *Mol Oncol*. 2014;8(8):1508–1520.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Clara Budde, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren und transienten Rezeptor Potenzial (TRP-) Kanälen auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in kultivierten, humanen uveal Melanomzellen (92.1)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:

Anteilserklärung

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Promotion wurden im Rahmen eines Papers veröffentlicht [68]. Die geteilte Erstautorenschaft des Papers liegt bei L. Walcher und C. Budde

Publikation 1: Walcher L, Budde C, Bohm A, Reinach PS, Dhandapani P, Ljubojevic N, Schweiger MW, von der Waydbrink H, Reimers I, Kohrle J, Mergler S. TRPM8 Activation via 3-Iodothyronamine Blunts VEGF-Induced Transactivation of TRPV1 in Human Uveal Melanoma Cells. Front Pharmacol 2018;9:1234.

Dabei wurden Patch-Clamp und Calcium Imaging Daten, insbesondere für die in dieser Monografie zitierten Grafiken (Abbildung 2,3, 7 und 8) von C. Budde größtenteils erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von S. Mergler gemeinsam mit L. Walcher und N. Ljubojevic. Die Grafiken wurden in Zusammenarbeit mit L. Walcher und S. Mergler erstellt, wurden insbesondere die in dieser Arbeit zitierten Grafiken von C. Budde erstellt bzw. die Daten erhoben. Der Schreib- und Reviewprozess erfolgte in enger Rücksprache zwischen allen beteiligten Autor*innen.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Publikation 1: Walcher L, Budde C, Bohm A, Reinach PS, Dhandapani P, Ljubojevic N, Schweiger MW, von der Waydbrink H, Reimers I, Kohrle J, Mergler S. TRPM8 Activation via 3-Iodothyronamine Blunts VEGF-Induced Transactivation of TRPV1 in Human Uveal Melanoma Cells. *Front Pharmacol* 2018;9:1234.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, sowie die geduldige und genaue Anleitung und Supervision bei meinem Doktorvater Stefan Mergler bedanken. Ohne seine Zuverlässigkeit, Rückfragen und Hilfe wäre diese Arbeit wohl niemals beendet worden. Auch möchte ich ihm vielmals für die Unterstützung in der Zellkulturarbeit danken und das Überlassen des Themas. Die geduldige Einarbeitung in die Zellkultur, Calcium-Imaging und Patch-Clamp Technik weiß ich auch sehr zu schätzen, sowie deine stete Unterstützung bei technischen Problemen und Nachfragen und die Unterstützung in der Auswertung der gewonnenen Daten.

Nina Ljubojevic und Lia Walcher möchte ich für die gute Zusammenarbeit und freundschaftlich Stimmung danken, die den Spaßfaktor deutlich gesteigert haben bei der Durchführung der Experimente.

Der Arbeitsgruppe Jager et al. (Universität Leiden, Niederlande) danke ich für die Bereitstellung der UM 92.1 Zelllinie, sowie der Valtnik und Kollegen für die Durchführung der PCR Analyse und molekulargenetischem Nachweis der TRPV4 Expression in UM 92.1 Zellen.

Meiner Familie und Freunden danke ich für das Durchlesen und Feedback zu dieser Arbeit und für die regelmäßigen Motivationsspritzen.