

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung des Transient-Rezeptor-Potential-
Kationenkanals TRPV4 in Insulin-produzierenden INS-1-
Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Manoj Kakkassery

aus Salzkotten

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I	Abstrakt (deutsch)	
II	Abstract (englisch)	
III	Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung	12
1.1	Endokrines Pankreas	12
1.1.1	Morphologie und Physiologie des Pankreas	12
1.1.2	Physiologische Bedeutung der pankreatischen β -Zellen und Regulation der Insulinfreisetzung	13
1.1.3	Rolle von pankreatischen β -Zellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	14
1.2	Experimentelle Modelle für pankreatische β-Zellen	16
1.3	Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle)	17
1.3.1	Nomenklatur und Eigenschaften	17
1.3.2	Verteilung im Gewebe	20
1.3.3	TRP-Kanäle und Erkrankungen	21
1.3.4	TRPV-Kanäle	21
1.3.5	TRP-Kanäle in β -Zellen	22
1.3.6	Alteration von TRP-Kanälen in β -Zellen des endokrinen Pankreas beim Diabetes mellitus Typ 2	23
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Materialien und Methoden	25
3.1	Materialien	25
3.1.1	Geräte und Labormaterialien	25
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	26
3.1.3	Lösungen und Puffer	27
3.1.4	Primer	29
3.1.5	Antikörper	30
3.1.6	Reagenzien und Detektionsmethoden	30
3.2	Zellkultur	31
3.3	Methoden	31
3.3.1	RT-PCR	31

3.3.2	Western Blot.....	32
3.3.3	Kalziummessungen.....	34
3.3.4	Transfektion der Zellen mit siRNS.....	36
3.3.5	Insulinsekretionsmessung.....	38
3.4	Statistische Analysen	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Charakterisierung der INS-1-Zellen	39
4.1.1	Kultivierung der INS-1-Zellen	39
4.1.2	Morphologie der INS-1-Zellen	39
4.2	Detektion von TRPV4-Kanälen in INS-1-Zellen	41
4.2.1	TRPV4-Expression auf mRNS-Ebene.....	41
4.2.2	TRPV4-Proteinproduktion	41
4.3	Kalziummessungen.....	43
4.3.1	Zell-Vitalitätstestung.....	43
4.3.2	TRPV4-vermittelte Kalziumantwort bei Hyperthermie	44
4.3.3	TRPV4-vermittelte Kalziumantwort bei Hypoosmolarität.....	47
4.3.4	Pharmakologische Aktivierung der TRPV4-Kanäle mittels 4 α -PDD....	49
4.4	Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Regulation der Insulinsekretion in INS-1-Zellen	51
4.5	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	54
5	Diskussion	55
5.1	Detektion von TRPV4-Kanälen in INS-1-Zellen	55
5.2	Kalziummessungen.....	55
5.3	Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen .	56
5.3.1	Hyperthermie.....	56
5.3.2	Hypoosmolarität	57
5.3.3	4 α -PDD	58
5.4	4α-PDD steigert Glukose-abhängig die Insulinsekretion in INS-Zellen	59
5.5	Limitationen der Arbeit.....	59
5.6	Klinische Relevanz und Schlussfolgerungen.....	60
6	Literatur.....	62
7	Anhang	72
7.1	Eidesstattliche Versicherung	72
7.2	Lebenslauf	74

7.3	Publikationsliste.....	75
7.4	Danksagung.....	76

I **Abstrakt (deutsch):**

Einleitung: Der TRPV4-Kanal ist ein Mitglied der Familie der Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle), einer Gruppe nicht-selektiver Kationenkanäle, die in verschiedenen Organen exprimiert werden. Der TRPV4-Kanal ist osmo- und thermosensitiv. Frühere Studien haben gezeigt, dass pankreatische β -Zellen neben TRPV4 auch andere TRP-Kanäle (TRPC1, TRPC4, TRPC6 und TRPM2-5) exprimieren. Insgesamt ist die Funktion der TRP-Kanäle in pankreatischen β -Zellen jedoch nahezu unbekannt. Bisher konnte lediglich in einer einzigen Studie an einer Maus- β -Zelllinie (MIN6) die Rolle des TRPV4-Kanals als Vermittler der durch humanes Insel-Amyloid-Polypeptid (hIAPP) -induzierten intrazellulären Kalziumakkumulation definiert werden. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Vermittlung der hIAPP-induzierten intrazellulären Kalziumakkumulation die einzige Rolle des TRPV4-Kanals in pankreatischen β -Zellen darstellt. Daher wurden funktionelle Untersuchungen des TRPV4-Kanals in einer pankreatischen β -Zelllinie der Ratte durchgeführt zur Charakterisierung dessen weiterer Eigenschaften.

Methoden: Der TRPV4-Kanal wurde mittels RT-PCR auf RNS-Ebene in einer pankreatischen β -Zelllinie der Ratte (INS-1) nachgewiesen. Auf Proteinebene wurde TRPV4 mittels Western Blot detektiert. Die TRPV4-Proteinproduktion in INS-1-Zellen wurde mittels Zielgen-spezifischer siRNS reduziert, um die Funktionalität dieses Kanals zu untersuchen. INS-1-Zellen mit regelrechter endogener Expression des TRPV4-Kanals und Zellen mit reduzierter TRPV4-Proteinproduktion wurden Hyperthermie, Hypoosmolarität sowie pharmakologischen Aktivatoren und Inhibitoren des TRPV4-Kanals sowie Modulatoren anderer TRP-Kanäle ausgesetzt. Die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration und Insulinsekretion durch die oben genannten Modulatoren der TRP-Kanäle wurde ebenfalls untersucht.

Ergebnisse: TRPV4 wurde sowohl auf RNS- als auch auf Proteinebene in INS-1-Zellen detektiert. Hyperthermie (circa 50 °C) induzierte einen irreversiblen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Bei moderater Hyperthermie (circa 27,5 °C) war ebenfalls ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nachweisbar. In INS-1-Zellen mit TRPV4-Proteinproduktion reduziert um 71,3% wurde der Hyperthermie-induzierte Kalziumanstieg nicht mehr detektiert. Hypoosmolarität (145

mosm/l) bewirkte einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der durch EGTA-vermittelte extrazelluläre Kalziumdepletion, sowie durch den TRP-Blocker Ruthenium Red reduziert werden konnte. Der spezifische TRPV4-Aktivator 4 α -PDD sorgte ebenfalls für einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der durch extrazelluläre Kalziumdepletion sowie den Ionenkanalblocker Lanthan(III)-chlorid reduziert werden konnte. Aktivierung des TRPV4-Kanals mit 4 α -PDD stimulierte die Insulinsekretion bei hoher Glukosekonzentration (16,7 mM), jedoch nicht bei niedriger (2,8 mM) Glukosekonzentration. In INS-1-Zellen mit verminderter TRPV4-Proteinproduktion konnte hingegen kein Anstieg der Insulinsekretion nach Inkubation mit dem TRPV4-Aktivator 4 α -PDD in Anwesenheit von 16,7 mM Glukose registriert werden.

Zusammenfassung/Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte der funktionell aktive TRPV4-Kanal in pankreatischen Ratten- β -Zellen (INS-1) auf mRNS- und Proteinebene detektiert werden. Aktivierung des TRPV4-Kanals führte zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen. Als Folge der TRPV4-Aktivierung wurde die Glukose-stimulierte Insulinsekretion der β -Zellen potenziert. Eine Fehlfunktion pankreatischer β -Zellen kennzeichnet Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. Es ist möglich, dass die Expression oder Funktionalität des TRPV4-Kanals in pankreatischen β -Zellen beim Diabetes mellitus möglicherweise gestört ist.

II Abstract (englisch):

Introduction: The TRPV4 channel is a member of the superfamily of transient receptor potential channels (TRP channels), a group of non-selective cation channels that are expressed in numerous tissues. TRPV4 channel is osmo- and thermosensitive. Earlier studies showed that β -cells express several TRP channels: TRPC1, TRPC4, TRPC6 and TRPM2-5, in addition to TRPV4. Little is known about the functional relevance of TRP channels in pancreatic β -cells. To date, there is only one study available, showing a functional relevance of TRPV4 in mediating human islet amyloid polypeptide (hIAPP) increase of intracellular calcium concentration in a mouse pancreatic β -cell line (MIN6). Therefore, we asked the question whether the increase of intracellular calcium in response to hIAPP treatment is the only function of TRPV4 in pancreatic β -cells. To address this question the expression and function of TRPV4 was studied in pancreatic INS-1 β -cell line.

Methods: TRPV4 mRNA expression and protein production in INS-1 cells were detected by RT-PCR or Western Blot, respectively. For analyses of TRPV4 functions, TRPV4 protein production was suppressed by 71.3% using siRNA technique. INS-1 cells with normal endogenous TRPV4 expression and cells with down-regulated TRPV4 protein production were exposed to hyperthermia, hypoosmolarity or were treated with pharmacological activators and/or inhibitors of TRPV4 or other TRP channel modulators. The effects of these stimuli and inhibitors of TRP channels on intracellular calcium concentration and insulin secretion were examined.

Results: TRPV4 was detectable on RNA and protein level in INS-1 cells. Calcium imaging showed an irreversible increase of intracellular calcium concentration caused by hyperthermia (circa 50 °C). At moderate hyperthermia (circa 27.5 °C) an increase of intracellular calcium concentration was also detectable. In cells with TRPV4 protein levels down-regulated by 71.3%, moderate hyperthermia failed to increase intracellular calcium concentration. Hypoosmolarity (145 mosm/l) caused an increase of intracellular calcium concentration that could be reduced by EGTA-mediated extracellular calcium depletion and by a TRP blocker, ruthenium red. 4 α -PDD, a specific TRPV4 activator, was also able to increase intracellular calcium concentration in INS-1 cells. This increase could be reduced by extracellular calcium

depletion and by an ion channel blocker, lanthanum(III) chloride. 4 α -PDD stimulated insulin secretion in INS-1 cells exposed to high glucose concentration (16.7 mM), whereas at low glucose concentration (2.8 mM) 4 α -PDD was ineffective. In contrast to INS-1 cells expressing endogenous TRPV4, INS-1 cells with down-regulated TRPV4 protein production didn't show any increase of insulin secretion while being incubated with 4 α -PDD at 16.7 mM glucose.

Summary/conclusion: The results of the study show that rat pancreatic INS-1 β -cells express TRPV4 channels. Activation of TRPV4 leads to an increase of intracellular calcium concentration in INS-1 cells. This TRPV4-mediated calcium increase triggers insulin secretion in INS-1 cells incubated with high glucose. Whether TRPV4 plays a role in diabetes mellitus, a disease that is characterized by dysfunction of pancreatic β -cells, remains to be further examined in upcoming studies.

III Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl-Borat
4 α -PDD	4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat
ADP	Adenosindiphosphat
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
ATP	Adenosintriphosphat
au	unskalierte Einheit („arbitrary unit“)
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNS	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EET	Epoxyeicosatrien-Säure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
Fura-2/AM	Fura-2/Acetoxymethylester
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
hIAPP	humane Insel-Amyloid-Polypeptide
K _m	Michaelis-Konstante
La ³⁺	Lanthan(III)
mM	millimolar
μ M	mikromolar
mRNS	Boten- („messenger“) Ribonukleinsäure
NET	neuroendokrine Tumore
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PIP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
PKR	Proteinkinase R
PLA ₂	Phospolipase A ₂

PTGS	Posttranskriptionelles Gen-Verstummen („Post-transcriptional Gene Silencing“)
RBP4	Retinol-bindendes Protein 4
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RuR	Ruthenium Red
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler („standard error of the mean“)
siRNS	kleine interferierende („small interfering“) Ribonukleinsäure
TRP	Transient-Rezeptor-Potential-Kanal
TRPV4	Transient-Rezeptor-Potential-Kanal vom Typ Vanilloid-Rezeptor 4
VOCC	spannungsabhängige Kalziumkanäle („voltage-operated calcium channels“)

1 Einleitung

1.1 Endokrines Pankreas

1.1.1 Morphologie und Physiologie des Pankreas

Das Pankreas (griechisch pánkreas, pán für „alles“, kréas für „Fleisch“) ist ein quer im Oberbauch liegendes Drüsenorgan. Die von ihm gebildeten Verdauungsenzyme werden über einen oder zwei Ausführungsgänge in das Duodenum abgegeben. Es ist daher unter anderem eine exokrine Drüse. Diese Verdauungsenzyme spalten Eiweiße, Kohlenhydrate und Fette der Nahrung im Darm in ihre Grundbestandteile und zerkleinern sie in eine von der Darmschleimhaut resorbierbare Größe. Darüber hinaus werden Pankreashormone gebildet, die direkt an das Blut abgegeben werden. Damit ist es gleichzeitig auch eine endokrine Drüse. Dieser endokrine Anteil des Pankreas sind die Langerhans-Inseln, die vor allem für die Regulation der Blutglukosekonzentration sowie von Verdauungsprozessen verantwortlich sind. Die Regulation der Blutglukosekonzentration durch das endokrine Pankreas wird in erster Linie von Insulin und Glukagon übernommen. Pankreatische β -Zellen, die Insulin produzieren, machen circa 48-59% der humanen Inselzellen aus, α -Zellen, die Glukagon produzieren, circa 33-46% und δ -Zellen, die Somatostatin produzieren, circa 8-12% (Cabrera et al. 2006). Außerdem gibt es unter anderem noch PP-Zellen, die pankreatisches Polypeptid freisetzen, und ϵ -Zellen, die Ghrelin produzieren (Cabrera et al. 2006). Während bei der Ratte und der Maus die β -Zellen im Zentrum der Inseln zu finden sind und die α - sowie δ -Zellen in der Peripherie, ist diese Verteilung beim Menschen und Affen nicht mehr klar erkennbar. Alle drei Zelltypen sind beim Menschen und bei Affen sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum der Inseln zu finden (Cabrera et al. 2006). Die endokrinen Zellen des Pankreas interagieren sowohl parakrin als auch autokrin miteinander und darüber hinaus auch endokrin systemisch (Caicedo 2013). So hemmt z. B. Insulin die Sekretion von Glukagon (Bansal et al. 2008). Glukagon stimuliert die Insulinsekretion (Wojtuszczyzn et al. 2008), Somatostatin hemmt die Sekretion von Insulin und Glukagon (Taborsky et al. 1979).

1.1.2 Physiologische Bedeutung der pankreatischen β -Zellen und Regulation der Insulinfreisetzung

Die Hauptfunktion der pankreatischen β -Zellen ist die Insulinproduktion und Insulinfreisetzung zwecks Konstanthaltung der Blutglukose. Die Insulinsekretion wird hauptsächlich über die Blutglukosekonzentration gesteuert (Henquin 2000). Nach Nahrungsaufnahme kommt es zu einer Erhöhung der Blutglukosekonzentration, die zu einer vermehrten Insulinfreisetzung führt (siehe unten). Zu den endokrinen Wirkungen von Insulin gehört unter anderem die Unterstützung der Aufnahme von Glukose in peripheres Gewebe, wie z. B. Muskelgewebe. Dabei spielt der GLUT4-Transporter-vermittelte Mechanismus eine wichtige Rolle (Leto et al. 2012). Darüber hinaus stimuliert Insulin die Glykogensynthese und -speicherung in der Leber sowie im Muskelgewebe. Die Glukoneogenese in der Leber wird durch Insulin gehemmt (Cherrington et al. 1998). Außerdem hemmt Insulin die Lipolyse und stimuliert die Lipogenese und wirkt damit anabol (Jensen et al. 1989). Sowohl in Fettgewebe als auch in Muskeln werden unter Insulineinfluss auch vermehrt Aminosäuren aufgenommen und für die Proteinbiosynthese verwendet (Meek et al. 1998). Des Weiteren fördert Insulin das Zellwachstum und Proliferation (Griffiths 1970). Im Nüchternzustand kommt es zu einer verminderten Insulinsekretion und die oben beschriebenen Insulin-getriggerten anabolen Prozesse kehren sich um (Saltiel et al. 2001).

Die Insulinsekretion hängt entscheidend von der extrazellulären Glukosekonzentration ab. Wie in Hepatozyten wird in den β -Zellen der Glukosetransporter GLUT2 stark exprimiert und sorgt für die Glukoseaufnahme in die Zellen. Die in die pankreatischen β -Zellen aufgenommene Glukose wird durch Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert (erster Schritt der Glykolyse). Als Produkt der oxidativen Glykolyse erhöht sich der ATP/ADP-Gradient. Konsekutiv schliessen ATP-sensitive Kalium (K^+_{ATP})-Kanäle (Ashcroft et al. 1984). Das vor allem durch den Kalium-Gradienten getragene Membranruhepotenzial bricht in Folge dessen ein und spannungsabhängige Kalziumkanäle (VOCCs) vom T-Typ öffnen. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sorgt für die Aktivierung der Kalziumsensoren Synaptotagmin VII und IX (Gauthier et al. 2008) mit nachfolgender Freisetzung von Insulin (Henquin 2000). Innerhalb dieser metabolischen

Kettenreaktion gibt es noch viele modulierende Faktoren. Außerdem werden alternative Aktivierungsmechanismen diskutiert (siehe Kapitel 1.3.5).

1.1.3 Rolle von pankreatischen β -Zellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Erkrankung, die sich durch eine periphere Insulinresistenz und eine Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen auszeichnet. Im Anfangsstadium der Erkrankung kann die periphere Insulinresistenz durch eine Insulinmehrsekretion der β -Zellen des Pankreas kompensiert werden. Infolgedessen können z. B. genügend Glukosetransporter vom insulinabhängigen Typ GLUT4 in die Zellmembran peripherer Zellen eingebaut werden, damit diese Zellen ausreichend mit Glukose versorgt werden. Im Verlauf erschöpft sich jedoch diese Fähigkeit der β -Zellen, Insulin in hohem Maße freizusetzen. Die nun vorhandene Blutinsulinkonzentration ist ähnlich wie beim Stoffwechselgesunden, reicht dennoch nicht mehr aus, um genügend GLUT4-Glukosetransporter in die Zellmembran der peripheren Zellen einzubauen und so ausreichend Glukose ins Zytoplasma zu transportieren (relativer Insulinmangel). Der genaue Mechanismus der Insulinresistenz ist bisher unklar. Möglicherweise spielt dabei auch ein Defekt des GLUT4-Glukosetransporters eine Rolle mit nachfolgender Hyperglykämie und reaktiver Hyperinsulinämie. Die Folge der anhaltend hohen Glukosekonzentration ist eine deletäre glukotoxische Wirkung auf die β -Zellen (Poitout et al. 2008). Als grundlegende Mechanismen werden erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor allem freien Radikalen, diskutiert (Tanaka et al. 1999). Es ist bekannt, dass die pankreatischen β -Zellen eine schlechte ROS-Toleranz besitzen (Prentki et al. 2006). Insbesondere beim Diabetes mellitus Typ 2 sind in den β -Zellen Marker für oxidativen Stress, wie z. B. Peroxide, deutlich erhöht (Tanaka et al. 2002). Umgekehrt führt eine Behandlung der β -Zellen mit dem antioxidativen Peptid Glutathion zur Verbesserung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) (Del Guerra et al. 2005). Auch die Alteration des intrazellulären Kalziums spielt für die Dysfunktion pankreatischer β -Zellen eine Rolle. Grill et al. zeigten, dass eine längere Inkubation pankreatischer β -Zellen in der Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen zu abnormalen intrazellulären Kalziumkonzentrationen führt, die auch nach Normalisierung der Glukosekonzentration persistieren (Grill et al.

2001). Diese Arbeitsgruppe beobachtete drei wesentliche Veränderungen. Erstens hatten β -Zellen erhöhte basale intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, zweitens verloren die β -Zellen ihre Fähigkeit zur physiologischen Glukose-stimulierten Insulinsekretion und drittens kam es zu Störungen der physiologischen Oszillationen der intrazellulären Kalziumkonzentration (Bjorklund et al. 2000) (**Abbildung 1**).

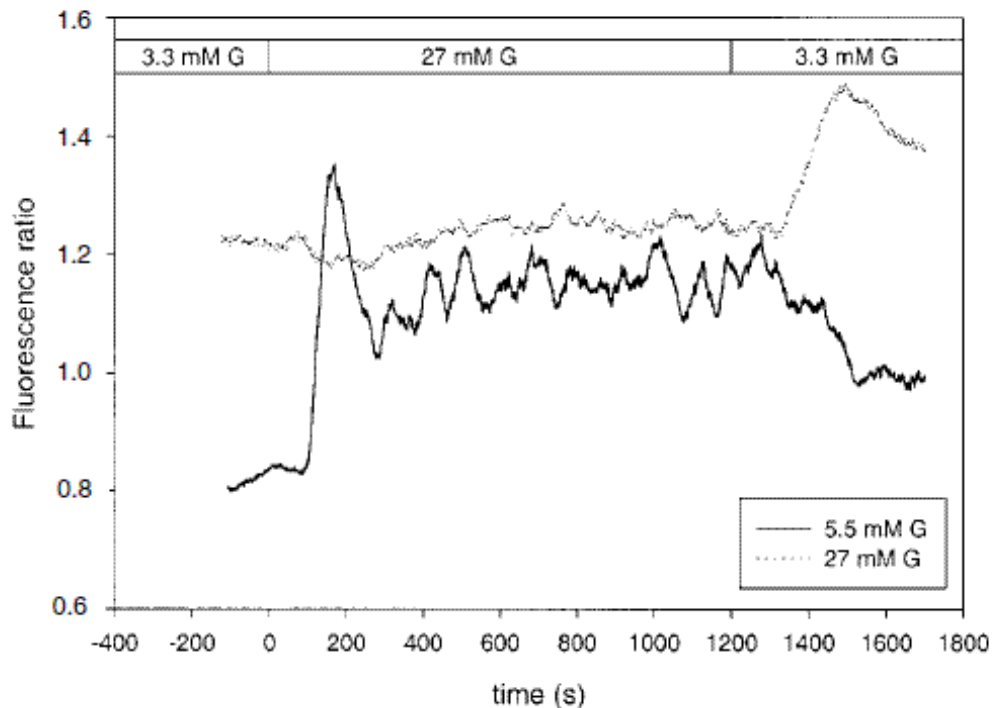


Abb. 1: Effekt von 48-stündiger Kultivierung humaner Inselzellen mit 5,5 und 27 mmol/l Glukose (G) auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Die Kalziumkonzentration ist proportional zur Fluoreszenz (Bjorklund et al. 2000).

Ein Zusammenhang, der erst vor kurzem entdeckt wurde, besteht zwischen der Plasmakonzentration des aus Adipozyten freigesetzten Zytokins Retinol-Binding-Protein 4 (RBP4) und dem Grad der Insulinresistenz. Bei übergewichtigen und Typ 2 diabetischen Patienten korreliert die Plasmakonzentration von RBP4 mit dem Schweregrad der peripheren Insulinresistenz (Graham et al. 2006). Es wurde auch gezeigt, dass RBP4 die Insulinempfindlichkeit der Muskel- und Leberzellen herunterregulieren kann (Graham et al. 2006).

Inkretine, wie Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) und Gastric Inhibitory Peptide (GIP), haben in Studien einen trophischen Einfluss auf pankreatische β -Zellen gezeigt. Sie verstärken die Proliferation der β -Zellen und hemmen ihre Apoptose (Drucker 2006).

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist eine reduzierte Plasmakonzentration beider Inkretine bekannt. Dies ist möglicherweise für die inadäquate Insulinsekretion und Reduktion der β -Zellmasse von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung. GLP-1-Analoga werden daher bereits seit einigen Jahren in der Klinik therapeutisch verwendet, um die Blutzuckerkontrolle zu verbessern. Dies wird dadurch erreicht, dass die pankreatischen β -Zellen nach Supplementation mit Inkretinen (GLP-1-Agonisten) eine adäquate, Glukose-abhängige Insulinsekretion wiedererlangen. Neben diesen pathophysiologischen Zusammenhängen zwischen Inkretinen, Adipokinen und Hyperglykämie werden auch weitere Mechanismen der Dysfunktion der β -Zellen beim Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert. So trägt die Glukolipotoxizität, gekennzeichnet durch hohe Plasmafettsäuren in Kombination mit hohen Glukosekonzentrationen, entscheidend zur sekretorischen Dysfunktion und morphologischer Alteration der β -Zellen bei (Poitout et al. 2008). Die Glukolipotoxizität trägt unter anderem wesentlich zur Apoptose der pankreatischen β -Zellen bei.

Über veränderte Ionenleitfähigkeiten in β -Zellen bei Diabetes mellitus Typ 2 ist noch wenig bekannt. Sei es als Ursache für einen Diabetes mellitus Typ 2 oder als Begleiterscheinung im Laufe der Pathogenese. So prädisponiert zum Beispiel eine Genvariante einer Unterheit des K^+ _{ATP}-Kanals die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 (Gloyn et al. 2003).

1.2 Experimentelle Modelle für pankreatische β -Zellen

Nach dem Chick et al. 1977 erstmals aus einem Ratten-Insulinom immortalisierte β -Zellen (RIN-Zellen) isolieren konnten (Chick et al. 1977), stehen mittlerweile mehrere Zelllinien als pankreatische β -Zell-Modelle zur Verfügung (Hohmeier et al. 2004). So werden augenblicklich außer den RIN-Zellen, die neben Insulin auch Somatostatin, Glukagon und pankreatisches Polypeptid sezernieren, vor allem INS-1-Zellen benutzt. Daneben gibt es weitere experimentell genutzte Zelllinien, z. B. Hamsterzelllinien (HIT) sowie Mauszelllinien (β TC, MIN, NIT-1 und β TC) (Hohmeier et al. 2004). Viele Arbeitsgruppen versuchen gegenwärtig humane β -Zelllinien zu entwickeln, die vollständig differenziert bleiben und ihren β -Zell-Phänotyp behalten. Idee für diesen Ansatz ist die Beobachtung, dass Allograft-Transplantate

(Transplantation von Mensch zu Mensch) ein deutlich höheres Überlebenspotenzial zeigen als Xenografts (Transplantation von einer Spezies zu einer anderen) (Efrat 1998). Bisher führten die Versuche noch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis (Hohmeier et al. 2004).

Zur Untersuchung der GSIS haben sich immortalisierte Zellen aus Ratten-Insulinomen etabliert (Herbst et al. 2002). Diese INS-1-Zelllinie wurde 1992 von der Arbeitsgruppe um Asfari in Genf entwickelt. Dazu wurden durch Bestrahlung Insulinome in Ratten induziert und nach deren Entnahme unter anderem mit 2-Mercaptoethanol weiterbehandelt (Asfari et al. 1992). Die gewonnenen und später weiterentwickelten INS-1-Zellen exprimieren auch GLUT2-Glukosetransporter und die Glukokinase. Sie behalten im physiologischen Rahmen ihre Glukose-Sensitivität. Die maximale GSIS ist geringer als bei frisch isolierten β -Zellen, jedoch höher als bei anderen Zelllinien (z. B. RIN-Zellen). In INS-1-Zellen konnte im Gegensatz zu RIN-Zellen keine signifikante Sekretion von Glukagon, Somatostatin oder pankreatischem Polypeptid nachgewiesen werden (Asfari et al. 1992).

1.3 Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle)

1.3.1 Nomenklatur und Eigenschaften

„Transient receptor potential“ (TRP)-Ionenkanäle werden als eine umfangreiche funktionelle Superfamilie von Ionenkanälen der Zellmembran beschrieben, die augenblicklich in sieben Unterfamilien mit insgesamt 28 Vertretern gegliedert werden (Nilius et al. 2011) (**Abbildung 2**).

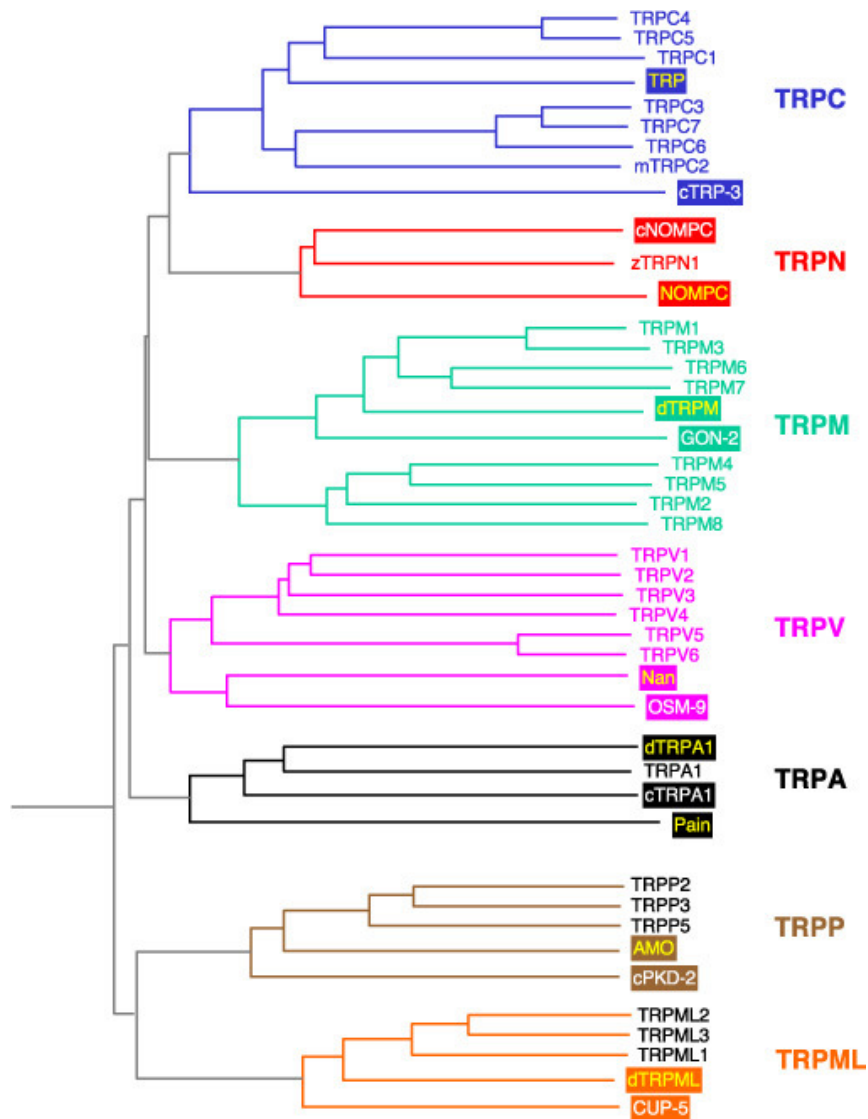


Abb. 2: Dendrogramm der Verhältnisse der TRP-Proteine (Montell 2005).

Die Bezeichnung "transient receptor potential" ist eigentlich die Beschreibung des Phänotyps einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. In den 1960er Jahren wurde eine mutierte Linie von *Drosophila* (trp343) gefunden, deren Photorezeptoren auf Lichtreize nur mit einem transienten, also kurzzeitigen Membranstrom reagierten. Im Wildtyp (nicht mutierte Variante) dagegen hielt der Strom an, solange Licht auf den Photorezeptor traf. Nach langer Suche nach dem verantwortlichen Protein wurde der TRP-Kanal schließlich im Jahre 1992 kloniert (Hardie et al. 1992). Der transiente Strom in den TRP-Mutanten von *Drosophila* wird vom Kanal TRPL (für TRP-like) vermittelt. Erst 2002 wurde für diese funktionelle Gruppe von Ionenkanälen eine einheitliche Nomenklatur aufgestellt (Montell et al.

2002). Diese wurde zwar mittlerweile um einige Subfamilien und TRP-Kanäle erweitert, hat sich insgesamt aber wissenschaftlich durchgesetzt.

Die Aminosäuresequenzhomologie zwischen den Unterfamilien und verschiedenen TRP-Kanälen ist nur mäßig ausgeprägt. Gemeinsam ist allen, dass sie sechs Transmembranregionen besitzen (S1-S6) mit intrazellulären N- und C-Termini (**Abbildung 3**). Zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion findet sich eine Pore, die den Kationenstrom durch die Zellmembran ermöglicht.

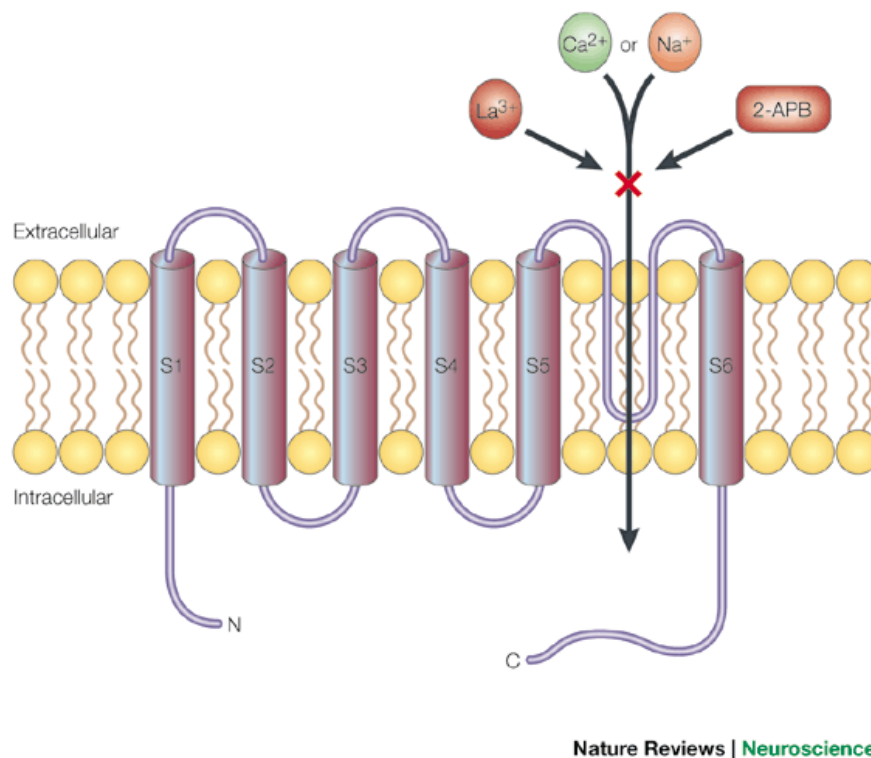


Abb. 3: Architektur der TRP-Kanäle (Clapham et al. 2001).

Auch wenn, wie schon erwähnt, nur eine schwache Aminosäuresequenzhomologie zwischen den einzelnen TRP-Kanälen nachweisbar ist, sind die Aminosäuresequenzen der fünften und sechsten Transmembranregion und vor allem eines Abschnittes des proximalen C-terminalen Schwanzes in allen TRP-Kanälen zu finden. Es scheint so, dass diese Teile der TRP-Kanäle wichtig für die gemeinsame Charakteristik sind. Bisher ist über die genauen Mechanismen aber noch wenig bekannt (Ramsey et al. 2006).

Die herausragende familienübergreifende Eigenschaft der TRP-Kanäle ist ihre Funktion als nicht-selektive Kationenkanäle (Ramsey et al. 2006). Sie sind vor allem für Kalzium aber auch für Natrium permeabel. Zum Beispiel sind außer TRPM4 und TRPM5 alle anderen Subtypen der TRP-Superfamilie für Kalzium durchlässig. Über noch nicht komplett verstandene Mechanismen können einige TRP-Kanäle, wie z. B. TRPM4, auch die transmembranöse Spannung (V_m) regulieren (Launay et al. 2002) und sind zum Teil, wie z. B. TRPM8, auch selbst spannungsabhängig (Brauchi et al. 2004, Voets et al. 2004). TRP-Kanäle reagieren auf eine große Bandbreite von Stimuli, wie z. B. Hitze, Kälte, Zellmembrandehnung, pH-Änderungen und osmotische Änderungen und fungieren somit unter anderem als eine Art zellulärer Sensor (Clapham 2003). Dies legt den Schluss nahe, dass der jeweils physiologisch entscheidende Stimulus zur Aktivierung eines bestimmten TRP-Kanals abhängig von dessen zellulären Kontext ist (Ramsey et al. 2006). Bisher sind verschiedene Arten der Aktivierung bekannt. Zum einen können TRP-Kanäle über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden in dessen Folge zum Beispiel Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) hydrolysiert oder Diacylglycerol (DAG) oder Inositol-1,4,5-triphosphat (PIP_3) produziert werden und sich danach intrazelluläre Kalziumspeicher entleeren (TRPC4) (Clapham 1995). Außerdem können TRP-Kanäle über Liganden aktiviert werden, sei es durch exogene Liganden wie synthetische oder natürliche Stoffe, wie zum Beispiel Capsaicin (TRPV1), Icilin (TRPM8, TRPA1), 2-APB (TRPV1-3), oder endogene Liganden wie Produkte des Lipidstoffwechsel (Vriens et al. 2009, Watanabe et al. 2003). Im Übrigen können einige TRP-Kanäle auch physikalisch über Temperaturänderungen aktiviert werden (TRPV1-4, TRPM8, TRPA1). Die Mechanismen dieser Aktivierung sind bisher noch kaum entschlüsselt. Insgesamt scheinen die Kanäle der TRP-Superfamilie ein wichtiger Faktor vor allem der sensorischen Physiologie zu sein. Das legt den Schluss nahe, dass sie ein Integrator sind, der es Zellen ermöglicht, sich auf veränderte Umgebungsverhältnisse einzustellen (Montell 2005).

1.3.2 Verteilung im Gewebe

TRP-Kanäle sind in fast allen Geweben zu finden. Es ist nicht jeder TRP-Kanal in jeder Zellart und nicht überall in gleich hoher Dichte zu finden, aber es werden immer mehr TRP-Kanäle in verschiedenen Gewebetypen nachgewiesen. Da die Forschung

auf diesem Gebiet ziemlich jung ist, sind die Fortschritte noch rapide. So wurden unter anderem z. B. erstmals in kornealen Epithelzellen TRPC4-Kanäle gefunden, die an der EGF-vermittelten (epidermal growth factor) Zellproliferation beteiligt sind (Yang et al. 2005) sowie auch TRPV1-Kanäle, die an inflammatorischen Prozessen in diesen Zellen beteiligt sind (Mergler et al. 2010, Zhang et al. 2007).

1.3.3 TRP-Kanäle und Erkrankungen

TRP-Kanäle spielen bei vielen Krankheiten eine Rolle (Kiselyov et al. 2007, Nilius et al. 2007). Beispiele für die Beziehungen zwischen einzelnen defekten TRP-Kanälen und daraus resultierenden Krankheiten sind Mutationen im TRPP1-Kanal, die 85% der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankungen (ADPKD) ausmachen (Sutters et al. 2003), und Mutationen im TRPC6-Kanal, die zur fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) führen (Reiser et al. 2005). Auch in der heterogenen Gruppe der neuroendokrinen Tumoren (NET) werden TRP-Kanäle überexprimiert. In solchen Zellen reguliert zum Beispiel TRPM8 die Neurotensinsekretion (Mergler et al. 2007) und TRPV1 die Chromogranin-A-Sekretion (Mergler et al. 2012).

1.3.4 TRPV-Kanäle

Die TRPV-Subfamilie („V“ für „Vanilloid-Rezeptor“) besteht aus den sechs Mitgliedern TRPV1 bis TRPV6, wobei diese noch in zwei Untergruppen mit TRPV1 bis TRPV4 und TRPV5 bis TRPV6 unterteilt werden. TRPV1 bis TRPV4 (ebenso wie TRPM8 und TRPA1) sind sogenannte „Thermosensoren“, da sie über Temperaturänderungen aktiviert werden können (**Abbildung 4**).

Mammalian thermal-sensitive channels

Channel	Threshold	Chemicals that evoke thermal-like response
TRPV1	≥43	Capsaicin
TRPV2	≥52	-
TRPV3	≥30-39	-
TRPV4	≥27	-
TRPM8	23-28	Menthol, icilin
TRPA1	17	Icilin, mustard oil

Drosophila thermal-sensitive channels

Painless (TRPA subfamily)	≥39	-
TRPA1	≥27	-

Abb. 4: Thermosensitive TRP-Kanäle von Säugetieren („mammalian“) und Fliegen mit Temperatur-Schwellenwerten („Threshold“) (Montell 2005).

Aber auch in Geweben, die primär nicht Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, spielen TRPV-Kanäle eine Rolle, so dass die Thermosensitivität nur als eine von vielen Eigenschaften dieser Subfamilie angesehen werden kann. Der erstbeschriebene und am besten untersuchte Kanal dieser Gruppe ist TRPV1, auch bekannt unter dem Namen Capsaicin-Rezeptor. Capsaicin ist der Wirkstoff, der die Schärfe von roten Chillischoten ausmacht, und ist gleichzeitig ein hochspezifischer TRPV1-Agonist. TRPV4 wird im Gegensatz zu TRPV1 auch durch andere Agenzien wie zum Beispiel hypotones Milieu aktiviert. Der Phorbol-ester 4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat (4 α -PDD) dient als hochspezifischer Agonist für die Aktivierung des TRPV4-Kanals (Watanabe et al. 2002). Im Gegensatz zu TRPV1 bis TRPV3 ist der Kanal insensitiv gegenüber dem mäßig selektiven und in seiner Wirkung konzentrationsabhängigen 2-Aminoethoxy-Diphenyl-Borat (2-APB), das agonistisch an den anderen drei Kanälen wirkt (Hu et al. 2004).

1.3.5 TRP-Kanäle in β -Zellen

Es wurden bisher einige TRP-Kanäle in humanen β -Zellen detektiert und teilweise auch schon funktionell charakterisiert (Colsoul et al. 2011). Der erste in β -Zellen

nachgewiesene TRP-Kanal war TRPC1 (Sakura et al. 1997). Bis heute wurden unter anderem TRPC4, TRPC6, TRPM2, TRPM4 sowie TRPM5 gefunden (Uchida et al. 2011). Speziell TRPM4 scheint von besonderer Bedeutung zu sein. Cheng et al. konnten zeigen, dass es zum bisher postulierten Weg der Glukose-stimulierten Insulinsekretion über K^+_{ATP} -Kanäle noch alternative Wege gibt. TRPM4 hat die für diese Klasse ungewöhnliche Eigenschaft, dass er einerseits selbst ein Kalziumsensor ist und andererseits über bisher noch nicht verstandene Mechanismen das Membranruhepotenzial beeinflussen kann in dessen Folge sich VOCCs öffnen und die Insulin-Exozytose initiieren (Cheng et al. 2007). TRPV1 konnte ebenfalls in humanen β -Zellen nachgewiesen. Allerdings blieb die Funktion des Kanals bisher ungeklärt (Akiba et al. 2004).

1.3.6 Alteration von TRP-Kanälen in β -Zellen des endokrinen Pankreas beim Diabetes mellitus Typ 2

Auch über veränderte Ionenleitfähigkeitsmuster beim Diabetes mellitus Typ 2 ist noch nicht viel bekannt. Ein interessanter aber noch wenig verstandener Punkt ist die Rolle von TRPV5 in pankreatischen β -Zellen. TRPV5, aber nicht TRPV6, ist hochgradig in β -Zellen exprimiert und spielt möglicherweise eine Rolle in der Insulinsekretions-Regulation. In „Zucker diabetic fatty rats (ZDF-fa/fa)“, einem etablierten Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 2 (Bray 1977), korreliert der Progress der Erkrankung negativ mit der Expression des TRPV5 (Nijenhuis et al. 2005).

2 Zielsetzung der Arbeit

Es ist bisher wenig bekannt über TRP-Kanäle in β -Zellen und Ihre Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Frühere Studien haben gezeigt, dass pankreatische β -Zellen unter anderem TRP-Kanäle der Subtypen TRPC1, TRPC4, TRPC6 und TRPM2 bis TRPM5 exprimieren. Über den TRPV4 Kanal ist bis auf die Tatsache, dass er die Effekte von hIAPP auf intrazelluläres Kalzium in MIN-6 β -Zellen reguliert, wenig bekannt. Daher soll im Rahmen der Studie die Funktion des TRPV4-Kanals in β -Zellen untersucht werden.

Folgende Aufgaben sollen im Rahmen der Dissertation an einer Insulinproduzierenden INS-1 β -Zelllinie bearbeitet werden:

- morphologische Detektion des TRPV4-Kanals auf RNS- und Proteinebene
- funktionelle Detektion des TRPV4 mittels physikalischen Aktivatoren und pharmakologischen Liganden
- Charakterisierung der Rolle des TRPV4-Kanals für die Regulation des intrazellulären Kalziums
- Definition der Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Regulation der Insulinsekretion

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Labormaterialien

Gerät, Material	Hersteller
Absaugpumpe Mediaport	Servox, Meckenheim
A/D-Wandler ITC-16 computer interface	Heka Elektronik, Lambrecht
Amplifier EPC 8 patch clamp amplifier	Heka Elektronik, Lambrecht
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
CO ₂ -Inkubator Brutschrank	Labortect, Göttingen
Deckgläser (unbeschichtet)	Diamond Coatings, Halesowen
Fastblot Blotting Gerät	Biometra, Göttingen
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapiere	Schleicher & Schuell, Dassel
Gefrierschrank (-20 °C sowie -85 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Illuminationseinheit Polychrome II mit Xenon-Lampe	TILL Photonics, Gräfelfing
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Kühlschrank (4 - 8 °C) Profi line	Liebherr, Biberach an der Riss
Mikroskop Olympus BX50Wi + Objektiv LUMPlan FI, 40×/0.80 W	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus CX2	Olympus, Hamburg
Mikrozentrifuge 5417R	Olympus, Hamburg
Mini-Protean [®] Tetra Electrophoresis System	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran Trans-Blot Transfer	Bio-Rad GmbH, München
Multiwellplatten (6, 12, 24, 96)	Bio-Rad GmbH, München
Neubauer Zählkammer für Zellzahlbestimmung	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
pH Meter 761 Calimatic	Carl Roth, Karlsruhe
Perfusionspumpe Peristaltic pump P-1	Knick, Berlin
Photomultiplier-Kamera-System Hamamatsu C2400	Pharmacia, Schweden
Photometriesystem	Hamamatsu, Japan
	T.I.L.L. Photonics, München

Röntgenfilm Cronex 5	Agfa HealthCare, Köln
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec	Siemens AG, Erlangen
Semi Dry Blotter	Bio-Rad GmbH, München
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Spektrophometer SPECTRA max Plus	Molecular Devices, Ismaning
Standzentrifuge Sigma 6K10	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterilwerkbank/Bench Lamin Air HB 2448	Heraeus GmbH, Hanau
Zellkulturflaschen steril (75 cm ² , 175 cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Relax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellschaber 25cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien

10x Tris/Glycine/SDS Puffer
30% Acrylamide-Mix
4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat (4 α -PDD)
6-Amino-Hexansäure
Accutase
Albumin vom Rinderserum (BSA)
Ammoniumpersulfat (APS)
 β -Mercaptoethanol
Bromphenolblau
Kalziumchlorid (CaCl₂)
D-(+)-Glukose Lösung (45%)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
Fetales Kälberserum (FKS)
Fura-2/Acetoxymethylester (Fura-2/AM)
Glycerol

Hersteller

Bio-Rad GmbH, München
Bio-Rad GmbH, München
Sigma-Aldrich, Steinheim
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Merck, Darmstadt
Gibco Invitrogen, Darmstadt
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim

Hepes 1M	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad GmbH, München
Lanthan(III)-chlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin sowie Streptomycin	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad GmbH, München
Ruthenium Red (RuR)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad GmbH, München
Tris-EDTA Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Färbelösung 0,4%	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	PAA GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 Lösungen und Puffer

Modifizierte Badlösung II (BS II) nach Glassmeier et al. (Glassmeier et al. 1997)

120	mM	NMDG
5,4	mM	CsCl
1	mM	MgCl ₂
10	mM	HEPES-acid
10	mM	Glukose
5	mM	Ca ²⁺

Die Badlösung II ist die Standardbadlösung der Kalziummessungen dieser Arbeit. Die Lösungen wurden nach Herstellung mit Salzsäure (HCl) auf einen annähernd physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Es wurde mit 10 mM eine signifikant höhere Glukosekonzentration ausgewählt als physiologisch in vivo vorkommt, weil die benutzte Zelllinie INS-1 einen höheren Glukoseschwellenwert für die Initiierung der Insulinsekretion hat (Asfari et al. 1992).

Krebs Bicarbonat Puffer (KRB) mit 0,5% Bovinen Serumalbumin (BSA)

126	mM	NaCl
25	mM	NaHCO ₃
2,5	mM	KCl
1,2	mM	MgCl ₂
2,4	mM	CaCl ₂
1,2	mM	NaH ₂ PO ₄
0,5	%	BSA

Krebs-Ringer-HEPES-Pufferlösung (KRH) (pH 7,4)

136	mM	NaCl
4,7	mM	KCl
1	mM	CaCl ₂
1,2	mM	MgSO ₄
1,2	mM	KH ₂ PO ₂
2	mM	NaHCO ₃
10	mM	HEPES

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
12	mM	PO ₄ ³⁻ und HPO ₄ ²⁻

RIPA-Pufferlösung (pH 8,0)

50	nmol/l	Tris-HCl
150	mol/l	NaCl
1,0	%	NP-40

0,5 % Natriumdeoxycholat
 0,1 % SDS
 10 mmol/l NaF
 1 mmol/l Na₃VO₄

RPMI 1640 mit HEPES (PAA Laboratories, Österreich)

10 % Fetales Kälberserum (FCS)
 50 µg/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1 mM Natriumpyruvat
 50 µM 2-Mercaptoethanol
 2 mM L-Glutamin
 2 g/l Glukose

3.1.4 Primer

Tabelle 1: Beschreibung des Primers

Primer	Sense	Anti-sense
TRPV4-cDNS	CATGATGCTGTAGGTCCCTGT	TACCACGGTGGACTACCTGAG

3.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Beschreibung der Antikörper

Material	Spezies/ Wirt	Hersteller	Verdünnung
Primärer polyklonaler Hasen-TRPV4-Antikörper	Hase	Alomone Labs (Jerusalem, Israel)	1:500
Horseradish-peroxidase-(HRP)-konjugierter sekundärer anti-Hase-Antikörper	Ziege	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1:5.000
β -actin-Antikörper	Maus	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	1:10.000
Horseradish-peroxidase-(HRP)-konjugierter sekundärer anti-Maus-Antikörper	Pferd	Cell Signaling, (Danvers, MA, USA)	1:10.000

3.1.6 Reagenzien und Detektionsmethoden

Tabelle 3: Reagenzien und Detektionsmethoden

Material	Hersteller
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Enhanced Avian HS RT-PCR Kit	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Enhanced NuGlo Chemiluminescent Substrate	Alpha Diagnostics International (San Antonia, TX, USA)
„ON-TARGETplus SMARTpool“ TRPV4-siRNS und non-targeting siRNS	Thermo Scientific Dharmacom (Waltham, MA, USA)
HiPerfect Reagenz	Qiagen (Hilden, Deutschland)
DRG Rat Insulin High Range ELISA Kit (EIA3985)“	DRG Instruments (Marburg, Deutschland)

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der INS-1-Zellen erfolgte nach der Methode, die von Mergler und Strowski beschrieben wurde (Mergler et al. 2008). Die INS-1-Zellen wurden von Professor Dr. Pierre Maechler (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die INS-1-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 5 % fetalem Kälberserum und 1% Streptomycin/Penicillin, kultiviert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank in einer Atmosphäre aus 95% Sauerstoff und 5% CO₂ bei 37 °C aufbewahrt. Circa 24 Stunden nach Passagieren begannen die Zellen, sich zu teilen. Nach zwei Tagen wurde jeweils das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst (circa zwei Minuten mit 1 ml Accutase bei 8 cm Kulturschalen). Zuvor wurden die Zellen dreimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM PO₄³⁻ und HPO₄²⁻) gewaschen. Die Accutase-Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen wurden zentrifugiert, um die Accutase zu isolieren. Dem Zellpellet wurde Medium hinzugegeben und es entstand eine Zellsuspension. Diese Zellsuspension wurde dann den Kulturgefäßen mit Glasplättchen und frischem Medium hinzugefügt (Verdünnung 1:10 oder 1:5). Es wurde jeweils eine 6er-Zellkulturplatte mit jeweils 3 Coverslips pro Vertiefung beladen, so dass insgesamt 18 Coverslips zur Verfügung standen, die bei Kalziumexperimenten für 18 Messungen reichten.

3.3 Methoden

3.3.1 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist ein Verfahren der Molekularbiologie, um hochspezifisch RNS bzw. mRNS vervielfältigen und nachweisen zu können. Das Verfahren baut auf der Entdeckung der PCR von Kary Mullis im Jahr 1983 auf, für die er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Mullis nutzte bei dieser Technik DNS-Polymerasen sowie genspezifische komplementäre Oligonukleotide, sogenannte „Primer“. Da die ursprüngliche PCR-Technik nur DNS-spezifisch und nicht fähig war, RNS zu

vervielfältigen, wurde das Verfahren weiterentwickelt. Eine zusätzliche Reverse Transkriptase synthetisiert aus der mRNA erst eine komplementäre DNS (cDNS), damit dann mittels PCR die cDNS vervielfältigt werden kann.

Die RNS wurde isoliert mittels eines „RNeasy-Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Zuerst wurde Standard-cDNS aus 1 µg RNS synthetisiert mittels „Enhanced Avian Myeloblastosis Virus Reverse transcriptase (eAMV-RT)“ aus einem „Enhanced Avian HS RT-PCR Kit“ (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Ein 307-Basenpaar-Fragment für TRPV4-cDNS wurde mittels genspezifischem Primer amplifiziert:

5' (sense): 5' – catgatgctgtaggtccctgt – 3'
3' (antisense): 5' – taccacggtggactacctgag – 3'

Dies geschah in einer PCR-Reaktion mittels „HS RT-PCR-Kit“ (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Dazu wurde die cDNS zunächst für 10 Minuten bei 94 °C denaturiert, gefolgt von 35 Zyklen der Denaturierung bei 94 °C für jeweils 30 Sekunden, gefolgt von 56 °C für 60 Sekunden und Verlängerung für 120 Sekunden bei 68 °C. Die Produkte der PCR wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegel (2%) mit Ethidiumbromid gefärbt. PCR ohne Reverse Transkriptase (RT-) und ohne cDNS (cDNS-) wurden als Negativkontrollen durchgeführt.

3.3.2 Western Blot

Western Blot bezeichnet die Übertragung (engl. „blotting“) von Proteinen auf eine Trägermembran, sei es durch Kapillarwirkung, Diffusion oder Elektrophorese. Dort werden die Proteine anschließend über unterschiedliche, unter anderem immunologische Reaktionen sichtbar gemacht. Genutzt wird die Technik vor allem in der medizinischen und molekularbiologischen Forschung. Der Name Western Blot leitet sich vom verwandten Southern Blot ab, mit dem DNS nachgewiesen werden kann (Southern 1975). Diese 1975 von Edwin Mellor Southern entwickelte Technik hatte so durchschlagenden Erfolg, dass schnell an ähnlichen Methoden auch für Proteine gearbeitet wurde. 1979 gelang Jaime Renart schließlich der erste funktionierende Proteinblot auf Diazobenzoyloxymethyl-Papier als Trägermembran

(Renart et al. 1979). Kurze Zeit später entwickelte Harry Towbin den Proteinblot auf Nitrozellulose (Towbin et al. 1979). Da der DNS-Blot als Southern Blot und in Anlehnung daran der RNS-Blot Northern Blot bezeichnet wurde, nannte W. Neal Burnette den Proteinblot Western Blot (Burnette 1981).

Die Proteine wurden aus INS-1-Zellen isoliert mittels RIPA-Pufferlösung (50 nmol/l Tris-HCl, pH 8,0 mit 150 mol/l NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 10 mmol/l NaF und 1 mmol/l Na₃VO₄). Hinzugefügt wurde ein „Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche Diagnostics, Penzberg). Die Zellen wurden gesammelt und mit RIPA-Pufferlösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zelllysate gereinigt mittels Zentrifugation bei 14.000g für 10 Minuten.

Die Überstände wurden für die Detektion der TRPV4-Kanäle mittels Western Blot gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem „BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) bestimmt. 25 µg des Proteins wurden mit Laemmli-Pufferlösung vermischt, für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend in 12% Tris-HCl SDS-PAGE aufgelöst. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg) transferriert. Danach wurde die unspezifische Bindung von Proteinen für 1 Stunde mittels 5% bovinem Serumalbumin bei Raumtemperatur blockiert. Die Membranen wurden dann mit einem primären polyklonalem Hasen-TRPV4-Antikörper (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) bei 4 °C für 16 Stunden inkubiert. Der Antikörper war im Verhältnis 1:500 verdünnt. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit HRP-konjugiertem sekundärem Anti-Hasen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) inkubiert. Dieser Antikörper war im Verhältnis 1:5.000 verdünnt. Die Chemilumineszenzreaktion wurde unter Nutzung von „Enhanced NuGlo Chemiluminescent Substrate“ (Alpha Diagnostics International, San Antonio, TX, USA) durchgeführt. Die Signale wurden dann mit einem lichtsensitiven Röntgenfilm visualisiert. Die Signalintensität wurde mittels „Quantity One 1-D Analysis Software“ (Bio-Rad Laboratories, München) quantifiziert.

Die Membranen wurden dann für 16 Stunden bei 4 °C mit Antikörper gegen β-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Verdünnung: 1:10.000) zur Kontrolle der

Protein-Beladung inkubiert. Nach der Inkubation mit diesen primären Antikörpern wurden die Membranen für 1 Stunde bei Zimmertemperatur behandelt mit HRP-konjugiertem sekundären anti-Maus-Antikörpern (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) im Verhältnis 1:10.000. Die Chemilumineszenz wurde induziert und gemessen wie oben beschrieben.

3.3.3 Kalziummessungen

In den letzten 25 Jahren hat sich die Kalziummessung, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, entwickelt und etabliert (Almers et al. 1985, Brandman et al. 2007, Grynkiewicz et al. 1985, Tsien et al. 1982). Das Prinzip der Messmethode besteht darin, dass Zellen nach Beladung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der an Kalzium bindet, mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und optische Signale der Zellen wie das Fluoreszenzlicht über einen Photomultiplier erfasst werden. Da die Fluoreszenzintensitäten abhängig von der Bindung des Farbstoffes an Kalzium sind, kann von ihnen auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration rückgeschlossen werden (Grynkiewicz et al. 1985, Tsien et al. 1982).

Für die durchgeführten Kalziummessungen wurde durchgehend der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM (Fura-2/Acetoxymethylester) verwendet, da dessen Metabolit ein günstiges Absorptionsspektrum mit größerer Fluoreszenzintensität gegenüber anderen Farbstoffen wie z.B. Quin-2 hat (Grynkiewicz et al. 1985) und wissenschaftlich etabliert ist (Brandman et al. 2007). Bei der Diffusion in das Zellinnere wird die Estergruppe von zelleigenen Esterasen abgespalten, so dass aus Fura-2/AM dann Fura-2 entsteht und damit die Rückdiffusion verhindert wird. Fura-2 ist wie z. B. Quin-2 (Tsien et al. 1982) ein Fluoreszenzfarbstoff, der in Abhängigkeit von der Bindung an Kalzium seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Fura-2 hat seine Absorptionsmaxima bei 340 nm und 380 nm. Das Emissionmaximum liegt bei circa 510 nm (Grynkiewicz et al. 1985). Während bei der Anregungswellenlänge von 340 nm die Fluoreszenzintensität (Emission bei 510 nm) proportional zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration verläuft, ist sie bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm umgekehrt proportional. Bei einer Wellenlänge von circa 360 nm ist die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unabhängig von der Fluoreszenzintensität (isosbestischer Punkt). Durch diese

Eigenschaften von Fura-2 und der Verhältnisbildung (Ratio) der beiden Fluoreszenzsignale sind auch sehr kleine Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration messbar und es steht eine hochsensitive Messmethode zur Verfügung.

Für diese Messmethode wird dem Medium, in dem die auf Coverslips angewachsenen Zellen liegen, Fura-2/AM in einer Konzentration von 1 μM zugegeben. Nach 30 Minuten im Inkubator bei 37 °C und 5% CO_2 werden die Coverslips mit den Zellen mit der Badlösung des jeweiligen Versuchs mehrmals gewaschen, um überflüssiges extrazelluläres Fura-2/AM und Zellabfälle zu entfernen. Jeweils ein Coverslip wird dann in die vorher mit Badlösung gefüllte Badkammer gebracht. Vor Beginn des Versuchs wurde die Badkammer noch einige Zeit mit Badlösung perfundiert, um eine Adaption der Zellen an die Umgebungsbedingungen zu ermöglichen. Für die Registrierung der fluoreszierenden Zellen wird das Blickfeld mittels einer Blende so eingestellt, dass nur das Fluoreszenzlicht einzelner Zellen im Photomultiplier eingefangen wird. In dieser Arbeit wurden je Versuch zwischen zwei und zehn Zellen gleichzeitig gemessen.

Auf dem PC wurden die aufgenommenen Daten von der TIDA-Software (Version 5.05) in binären Dateien gespeichert. Nach Abschluss einer Versuchsserie wurden die Daten direkt mit Hilfe der TIDA-Software ausgewertet. Dazu wurde in einem ersten Schritt geschaut, ob die jeweilige Messung eine stabile Basislinie vor Intervention zeigte oder ob hier Schwankungen zu sehen waren. Letzteres deutet auf nicht vitale Zellen und damit nicht verwertbare Daten hin. In einem zweiten Schritt wurde darauf geachtet, ob zum erwarteten Eintritt der Interventionslösung (z. B. 4 α -PDD-Lösung) in die Badkammer eine Veränderung der Messkurve zu sehen war. Zusätzlich konnten durch die Ratio-Bildung etwaige Artefakte größtenteils rausgerechnet werden. Manchmal waren isolierte „spikes“ zusehen, die darauf hindeuteten, dass ein fluoreszierendes Teilchen durch die Badkammer geflossen ist. Die Daten einer experimentellen Serie zu einer wissenschaftlichen Fragestellung wurden dann zusammengeführt und gefiltert (Bessel-Filter, Bandblock-Pass, untere/obere Filterfrequenz 7,3/7,4 Hz, einfache Filterung). Die Filterung sorgt für homogenere Daten, indem sie ein etwaiges Grundrauschen rausrechnet.

Anschließend wurden die Daten als ASCII-Datensätze exportiert zur weiteren graphischen und statistischen Analyse.

3.3.4 Transfektion der Zellen mit siRNS

RNS-Interferenz (RNSi) ist ein natürlicher Mechanismus eukaryontischer Zellen, der die Genexpression einzelner Gene und damit indirekt auch die Proteinbiosynthese hemmt. Die Zielstruktur dieser Regulation ist die RNS selbst, sei es post-transkriptionell oder translationell. Gemeinsam ist diesen Mechanismen ein circa 21 bis 25 Nukleotid langes einzelsträngiges RNS-Molekül, das für die Herabregulation verantwortlich ist. Dies geschieht z. B. über Translationsblockade der Ziel-messenger-RNS (mRNS) oder deren Spaltung und ist ein mRNS-spezifischer Vorgang. Diese Art der Regulation spielt eine wichtige Rolle unter anderem in der Abwehr von Viren vor allem in Pflanzen (Jacobsen et al. 1999). Entstanden ist die Technik aus den Arbeiten der Forschergruppe um Napoli und Jorgensen, die 1990 versuchten die Blütenfärbung von Petunien zu erhöhen. Sie brachten die Blütenfärbung beeinflussende Gene in die Pflanzen ein. Entgegen ihrer Annahme waren die daraus resultierenden Pflanzenblüten weniger oder gar nicht gefärbt. Dieses Phänomen nannten sie Cosuppression (Napoli et al. 1990). Weitere Arbeiten über die Jahre zeigten, dass die Gene nicht nur auf Transkriptionsebene reguliert werden, sondern dass zusätzlich die produzierte mRNS in den Zellen schnell abgebaut wird. Dieser Vorgang wurde „Post-Transcriptional Gene Silencing“ (PTGS) genannt. 1998 dann war klar, dass die mRNS selbst an dem Phänomen des PTGS beteiligt ist. Fast gleichzeitig veröffentlichten Andrew Fire und Craig Mello 1998 die Technik der RNS-Interferenz, bei der doppelsträngige RNS (dsRNS) im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu einem effizienten und spezifischen Gen-Knockdown führt (Fire et al. 1998), wofür ihnen 2006 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen wurde. Ein Jahr später konnte der Mechanismus weiter aufgeschlüsselt werden und die Beteiligung von circa 25 Nukleotid langen Molekülen, sogenannten „small interfering RNA“ (siRNS) nachgewiesen werden, die in direktem Zusammenhang mit der Ziel-RNS stehen und der RNS-Interferenz ihre Spezifität verleihen (Hamilton et al. 1999). Es bestand aber das Problem, dass die Technik bis zu diesem Zeitpunkt nicht in Wirbeltieren funktionierte. Die eingeführte dsRNS wird von Zellen der Wirbeltiere nicht toleriert und eine durch Proteinkinase R (PKR)

vermittelte Apoptose initiiert. Sayda Elbashir und Thomas Tuschl veröffentlichten 2001 eine Methode, die Wirbeltierzellen der RNS-Interferenz-Methode ebenfalls zugänglich zu machen (Elbashir et al. 2001). Anstatt längere dsRNS in die Zellen zu schleusen, nutzen sie direkt siRNS mit 21 Nukleotiden. Diese können PKR nicht aktivieren, sind aber ausreichend, um den gewünschten Knockout zu erzielen. Insgesamt ist die RNS-Interferenz ein sinnvolles Instrument für die Forschung, da durch die Zugabe von künstlich hergestellter siRNS, deren Sequenz genau zu einem ausgewählten Gen passt, dieses Gen gezielt ausgeschaltet werden kann. Und auch in der Therapie für virale und neoplastische Erkrankungen gibt es schon Ansätze, sich dieser Methode zu bedienen, um z. B. Virus-RNS unschädlich zu machen.

„ON-TARGETplus SMARTpool“ TRPV4-siRNS und non-targeting siRNS (Thermo Scientific Dharmacon, Waltham, MA, USA) wurden genutzt. Die SMARTpool-Technologie kombiniert vier hochpotente siRNS, die das natürliche posttranskriptionale Gen-Verstummen („silencing“) imitieren. Das Zusammenwirken der siRNS reduziert die Konzentration der einzelnen siRNS. Damit werden sogenannte „off-target“-Effekte reduziert. „Off-target“-Effekte entstehen z. B. wenn eine Diskrepanz („mismatch“) zwischen siRNS und Ziel-mRNS auftritt, bei dem eine Übereinstimmung einer geringen Anzahl an aufeinander folgenden Nukleotide reicht, um eine unspezifische Gen-Suppression zu induzieren (Jackson et al. 2003). Da des Weiteren gleichzeitig vier verschiedene mRNS-Regionen anvisiert werden, werden falsch-negative Ergebnisse reduziert. Das Design der siRNS sorgt zusätzlich für eine hohe Spezifität der jeweiligen siRNS.

INS-1-Zellen wurden in 6-Well-Zellplatten ausplattiert mit Cover-slips (für die Kalziummessungen) oder in 24-Well-Zellplatten (für Insulinsekretionsmessungen). Die Zellen wurden mit 100 nM Zielgen-spezifischer TRPV4-siRNS oder 100 nM unspezifischer (non-targeting) siRNS mittels HiPerfect Reagenz (Qiagen, Hilden) unter Beachtung der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolle transfiziert. Danach wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert. Ob die Expression des TRPV4-Proteins erfolgreich unterdrückt wurde, wurde mittels Western Blot kontrolliert.

3.3.5 Insulinsekretionsmessung

INS-1-Zellen wurden in 24-Well-Zellplatten ausplattiert mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ pro Well und für 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden dann für 1 Stunde in glukosefreier Krebs-Ringer-HEPES-Pufferlösung (KRH) vorinkubiert. Zusammensetzung von KRH: 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₂, 2 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES (pH 7,4). Danach wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und in der gleichen Lösung inkubiert, die nun entweder 2,8 mM oder 16,7 mM Glukose enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit DMSO versetzt mit 5 µM 4α-PDD oder nur mit 0,1% DMSO (Kontrolle) für 60 Minuten inkubiert. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel. Es ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und damit auch mit Badlösungen, die auf aqua dest. basieren. In der Wissenschaft ist es etabliert als Lösungsmittel für Pharmaka, die sich nicht in Wasser lösen. Nach der Inkubation wurde die KRH-Pufferlösung gesammelt und bei 240 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und zur Insulinbestimmung wurde ein „DRG Rat Insulin High Range ELISA Kit (EIA3985)“ (DRG Instruments, Marburg) benutzt. Die untere Nachweisgrenze lag bei 15 µg/l bei einem vom Hersteller angegebenen Messbereich von 3 – 150 µg/l, einer Sensitivität von 1,5 µg/l und einer Spezifität von 100%.

3.4 Statistische Analysen

Für die graphische Aufarbeitung der Messergebnisse wurde die Software Sigmaplot Version 9.01 (Systat Software, Erkrath) benutzt. Die statistischen Analysen wurden mittels der Software GraphPad Prism Version 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Aus den einzelnen Messegebnissen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen oder Standardfehler berechnet. Statistische Signifikanzen wurden mittels des zweiseitigen Student's t-test geprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der INS-1-Zellen

4.1.1 Kultivierung der INS-1-Zellen

Die Zellen wuchsen nach Passagierung und verdünnter Ausplattierung erst in kleinen Inseln und erreichten in der Regel am zweiten oder dritten Tag nach Teilung eine Dichte von 80 bis 90%. In diesem Stadium wurden die Zellen für die Messungen verwendet.

4.1.2 Morphologie der INS-1-Zellen

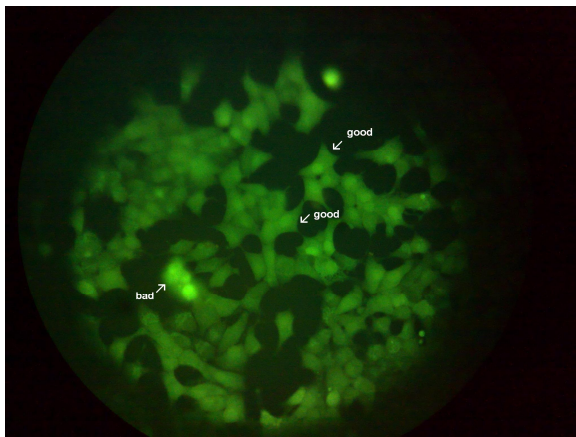
INS-1-Zellen bildeten schon am zweiten Tag nach Teilung Zellausläufer aus und waren am Boden der Zellkulturschale adhärent. Innerhalb der Zellinseln waren Zell-Zell-Kontakte klar erkennbar (**Abbildung 5**).



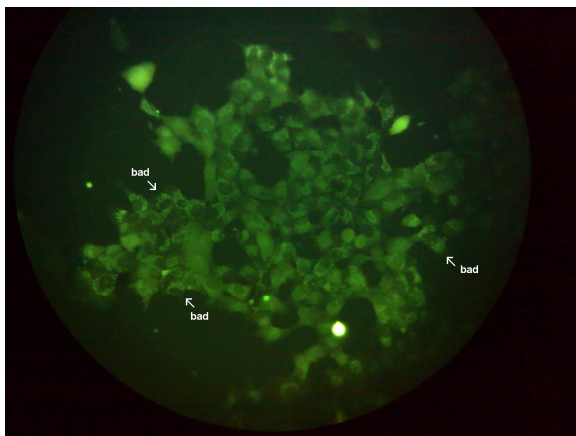
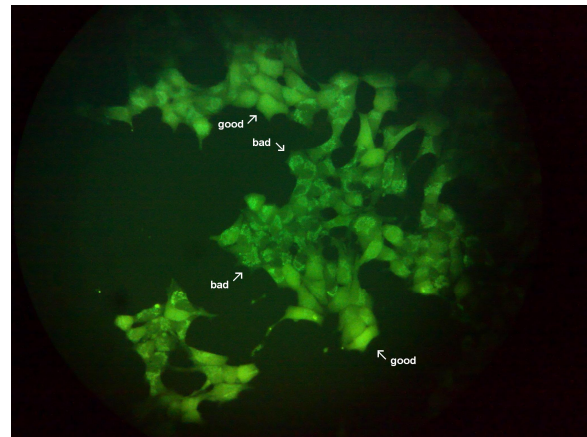
Abb. 5: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von kultivierten Insulin-produzierenden INS-1-Zellen (Mikroskop: Olympus BX50Wi, Objektiv: LUMPlan FI, 40×/0.80 W).

In **Abbildung 5** ist ein frühes Stadium nach Passagierung mit klar erkennbaren vereinzelt Zellinseln und schon ausgebildeten Zellausläufern zu sehen. Um die Vitalität beurteilen zu können, wurden INS-1-Zellen nach Fura-2-Färbung (1 μ M) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm Wellenlänge (510 nm Emission) quantitativ beurteilt. Die Fura-2-Färbung wurde als Marker der intrazellulären Kalziumverteilung verwendet. Es zeigte sich dabei in jedem Messfeld eine Vitalität von mindestens 80%. In **Abbildung 6A** sind viele gleichmäßig gefärbte fluoreszierende Zellen zu sehen. Es handelt sich dabei um vitale Zellen (good). Die sehr hell und unscharf leuchtenden Zellen (bad) sind für die Fluoreszenz-Messung nicht geeignet, da es sich vermutlich um abgestorbene Zellen handelt. In **Abbildung 6B** sind in dieser Mikroskopaufnahme deutlich mehr avitale Zellen (bad) und deutlich weniger vitale Zellen (good) zu sehen. Die avitalen Zellen sind an ihrem inhomogenen, körnigen Fluoreszenzmuster zu erkennen und zeigten in Testmessungen keine messbaren Kalziumantworten (siehe Kapitel 4.3.1). Diese Zellen wurden daher für Untersuchungen nicht verwendet. In **Abbildung 6C** sind schliesslich fast nur avitale Zellen (bad) zu sehen, die für die Untersuchungen nicht geeignet waren.

A)



B)



C)

Abb. 6 (A-C): Mit Fura-2/AM gefärbte INS-1-Zellen visualisiert bei Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 510 nm. Der zeitliche Abstand zwischen den Aufnahmen war etwa 20 Minuten. Nach circa 60 Minuten waren die Zellen für die Messungen nicht mehr verwendbar (Mikroskop: Olympus BX50Wi, Objektiv: LUMPlan FI, 40 \times /0.80 W).

4.2 Detektion von TRPV4-Kanälen in INS-1-Zellen

4.2.1 TRPV4-Expression auf mRNA-Ebene

In einem ersten Schritt wurde mittels RT-PCR mRNA für TRPV4-Kanäle nachgewiesen (Abbildung 7). Nach elektrophoretischer Auftrennung des RT-PCR-Produktes auf einem Agarosegel (2%) und Färbung mittels Ethidiumbromid zeigte sich die erwartete Bande (307 bp). In den negativen Kontrolllexperimenten zum Ausschluss einer Kontamination (PCR ohne Reverse Transkriptase und RT-PCR mit Wasser anstatt cDNS) wurden keine Produkte generiert (erkennbarer Verlust der Banden im Agarosegel).

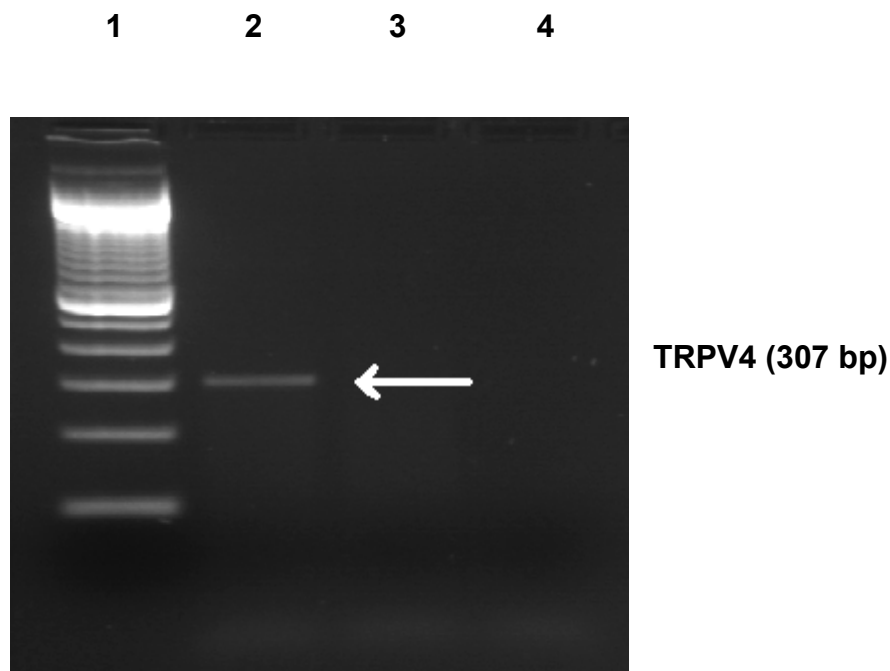
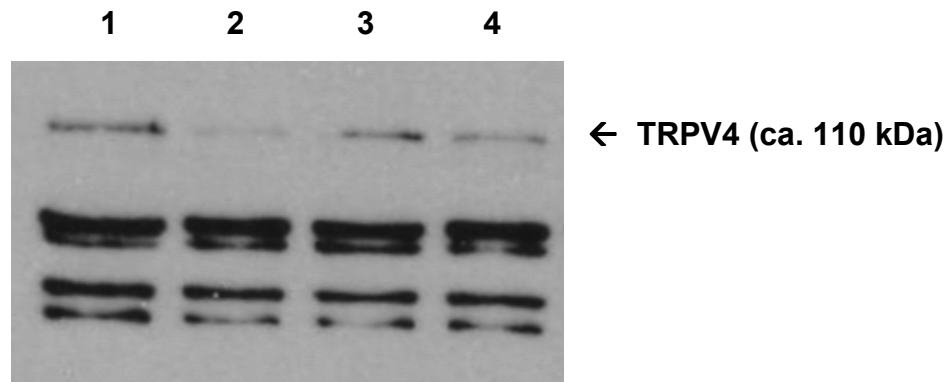


Abb. 7: Detektion von TRPV4 in INS-1-Zellen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Die Größe der Bande betrug 307 bp (weißer Pfeil). 1) Molekularer Marker 2) Mittels genspezifischem Primer amplifizierte TRPV4-cDNS 3) PCR ohne Reverse Transkriptase 4) RT-PCR mit Wasser anstelle von cDNS

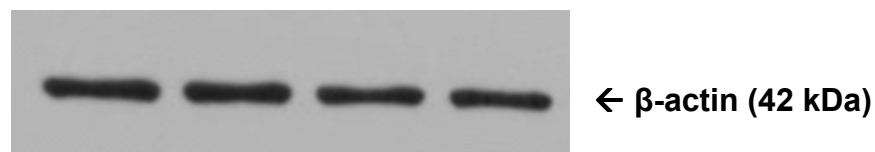
4.2.2 TRPV4-Proteinproduktion

In einem weiteren Schritt wurde der TRPV4-Kanal auf Proteinebene in INS-1-Zellen mittels Western Blot detektiert. Nach der Inkubation mit einem TRPV4-spezifischen

Antikörper zeigten sich mehrere Banden (**Abbildung 8A**). Zur Differenzierung welche Bande dem TRPV4-Kanal zuzuordnen ist, wurde die siRNS-Technik genutzt. Dazu wurden die Zellen mit Zielgen-spezifischer TRPV4-siRNS oder mit unspezifischer (non-targeting) siRNS für 48 Stunden transfiziert. Es zeigte sich eine selektive Abschwächung des Signals bei ca. 110 kDa nach Transfektion der INS-1 Zellen mit genspezifischer TRPV4-siRNS ($p = 0,0159$) (**Abbildung 8A**). Dabei konnte die TRPV4-Proteinproduktion in den TRPV4-siRNS-Zellen um 71,3% auf 28,7% reduziert werden (Expression des TRPV4 in den Kontrollzellen transfiziert mit non-targeting siRNS wurde willkürlich auf 100% gesetzt) (**Abbildung 8C**) im Vergleich zur Kontrolle. Der Mittelwert lag bei 0,256 arbitrary units (au) \pm 0,1014 au Standardfehler für nt-siRNS-Zellen ($n = 4$) und bei 0,07338 au \pm 0,04237 au Standardfehler für TRPV4-siRNS transfizierte INS-1-Zellen ($n = 4$). Die quantitative Beurteilung der aufgetragenen Proteinmenge und die Effizienz der TRPV4-Suppression wurden auch gegen β -actin normalisiert. Der β -actin-spezifische Antikörper erzeugte erwartungsgemäß eine Proteinbande von 42 kDa, die mittels Western Blot detektiert werden konnte (**Abbildung 8B**).



A)



B)

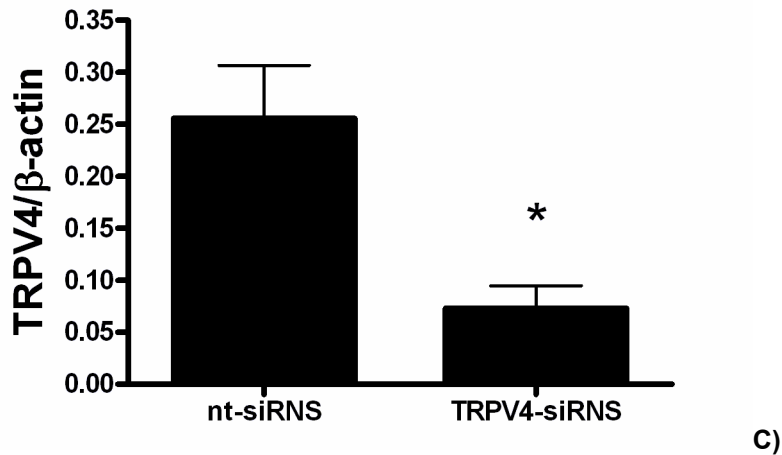


Abb. 8: A) Detektion von TRPV4 in INS-1-Zellen auf Proteinebene. Die TRPV4-Proteinsynthese wurde mittels TRPV4-siRNS reduziert. Spur 1 und 3: non-targeting siRNS (Kontrolle). Spur 2 und 4 TRPV4-siRNS B) Detektion von β -actin zur Normalisierung der Proteinmenge C) Quantitative Beurteilung der maximalen Suppression der TRPV4-Proteinproduktion nach 48 Stunden Inkubation der INS-1-Zellen mit TRPV4-siRNS. Die TRPV4-Proteinmenge wurde gegen β -actin normalisiert. Die Balken stellen Mittelwerte und Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

4.3 Kalziummessungen

4.3.1 Zell-Vitalitätstestung

Die Zellvitalität wurde nach einem von Herrn Dr. S. Mergler etablierten Protokoll beurteilt (Mergler et al. 2012). Den Zellen wurde nach 300 Sekunden extrazelluläres Kalzium mittels kalziumfreier Lösung und EGTA-Zugabe (1 mM) entzogen. EGTA ist ein Chelatbildner, der freie Kalziumteilchen bindet und so die freie Kalziumkonzentration senkt (Hubbard et al., 1968). Vitale Zellen reagieren auf den extrazellulären Kalziumentzug mit Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das ist Ausdruck der Fähigkeit der Zellen, Kalzium nach extrazellulär transportieren zu können. Nach Auswaschen der EGTA-Lösung bzw. extrazellulärer Kalziumzugabe steigt bei vitalen Zellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration mit zeitlicher Verzögerung wieder an. Avitale Zellen haben diese Fähigkeit verloren und reagierten nicht oder nur wenig auf die EGTA-Lösung ($p < 0,05$ im Vergleich mit vitalen Zellen; im Student's t-test 600 Sekunden nach Beginn

der Kalziummessung bzw. 300 Sekunden nach Zugabe von EGTA ermittelt) und anschließendes Auswaschen (Abbildung 9).

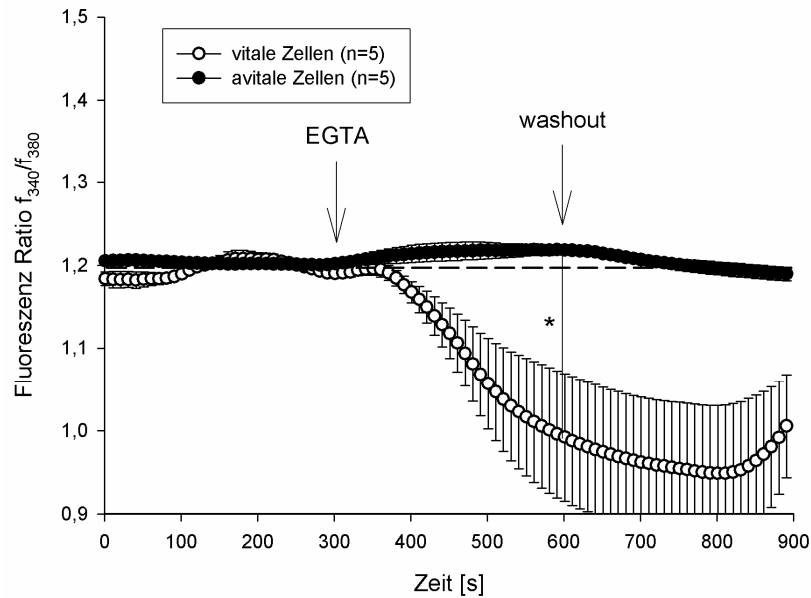


Abb. 9: Effekt einer extrazellulären Kalziumreduktion mittels einer nach 300 Sekunden applizierten kalziumfreien EGTA-Messlösung (1 mM) auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen gemessen nach 600 Sekunden. Die Kreise stellen Mittelwerte und die Balken Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Vor den folgenden Versuchsserien wurden die Zellen auf die intrazellulären Kalziumänderungen nach extrazellulärer Kalziumdepletion, wie oben beschrieben, getestet und unbrauchbare Zellen (siehe oben) verworfen. Nur Zellen mit deutlich reproduzierbarer Kalziumantwort wurden für die weiteren Messungen benutzt.

4.3.2 TRPV4-vermittelte Kalziumantwort bei Hyperthermie

Es ist bekannt, dass einige TRP-Kanäle, wie z. B. TRPV1-4, TRPM8 sowie TRPA1 temperatursensitiv sind. TRPV1-4 haben Temperatur-Schwellenwerte größer oder gleich 27 °C. TRPM8 wird zwischen 23 °C und 28 °C aktiviert, TRPA1 schon bei 17 °C. Um die Reaktion der INS-1 Zellen auf Temperaturänderungen zu testen und somit die thermosensitiven TRP-Kanäle funktionell nachzuweisen, wurde in einer

Versuchsserie die Temperatur der Badlösung systematisch verändert. Nach 240 Sekunden wurde erhitzte Lösung direkt in die Badkammer pipettiert, nachdem die Perfusionspumpe abgestellt wurde. In einer ersten Versuchsserie wurde die Temperatur von circa 20 °C (Raumtemperatur) auf circa 50 °C erhöht (Mittelwert 50,13 °C, Standardabweichung $\pm 2,6$ °C, n = 3 Versuche). Gemessen wurden die Effekte auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Zum Vergleich wurden Kontrollmessungen bei konstanter Temperatur durchgeführt (Zimmertemperatur, circa 20 °C). Die Kalziumfluoreszenzmessungen beider Messreihen wurden nach 600 Sekunden statistisch ausgewertet (**Abbildung 10**).

Nach Zugabe der erhitzten Badlösung stieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration an. Der Anstieg war im Vergleich zur Ausgangskonzentration auch nach Abkühlen des extrazellulären Milieus noch sichtbar (p = 0,0002).

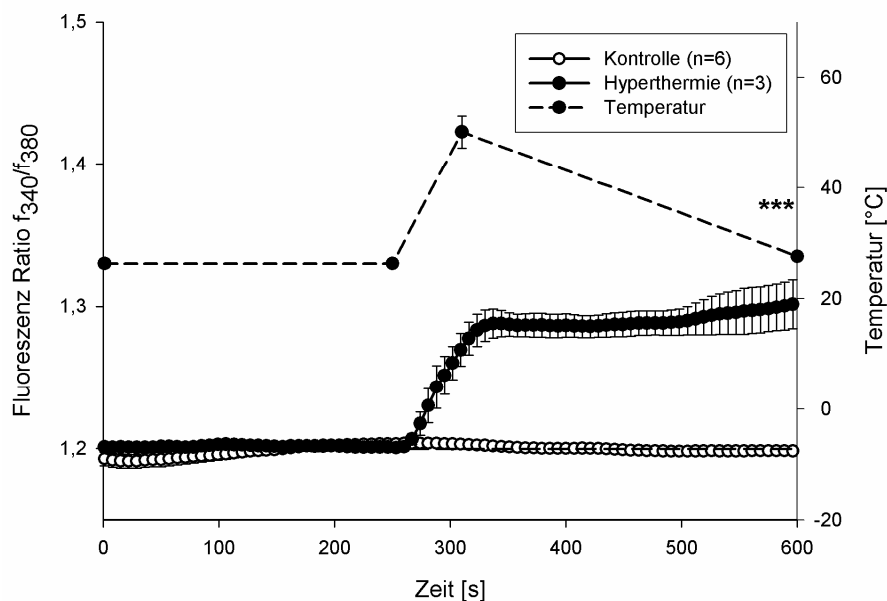


Abb. 10: Effekt von Hyperthermie, hervorgerufen nach 240 Sekunden, auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen ermittelt nach 600 Sekunden. Die Kreise stellen Mittelwerte und die Balken Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test nach 600 Sekunden ermittelt (***) p < 0,001).

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die Expression des TRPV4-Kanals auf RNS-Ebene sowie die Proteinproduktion in INS-1-Zellen mittels siRNS-Technik reduziert. Die Effizienz der TRPV4-Suppression auf Proteinebene wurde mittels

Western Blot (siehe Kapitel 4.2.2) beurteilt. Um TRPV4 mit einem typischen Temperaturschwellenwert von 27 °C spezifisch zu aktivieren, wurden INS-1-Zellen anschließend nach 240 Sekunden milder Hyperthermie ausgesetzt (Mittelwert 27,6 °C, Standardabweichung $\pm 0,2$ °C, n = 4 Versuche) und der Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen (**Abbildung 11**).

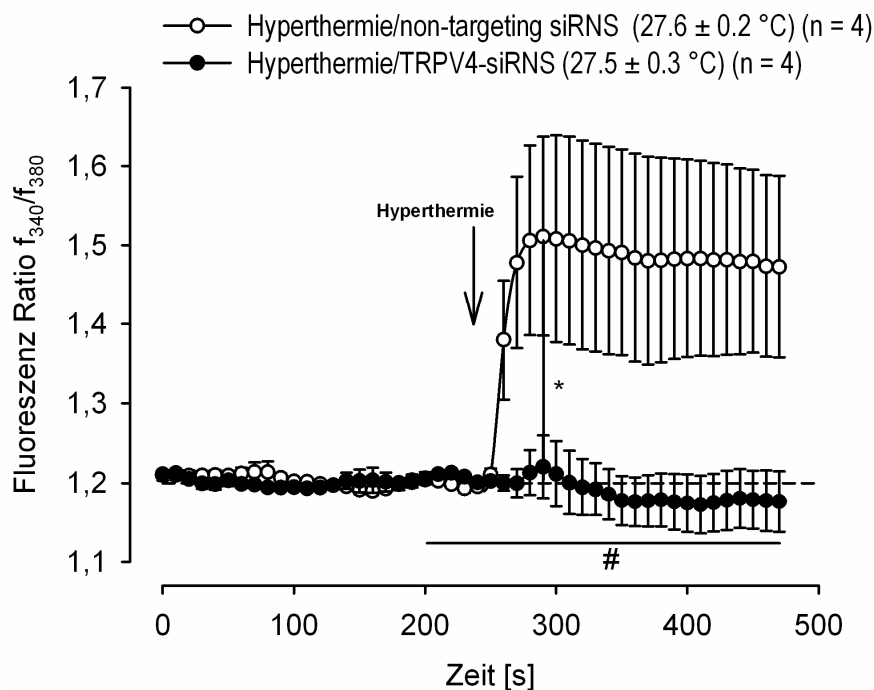
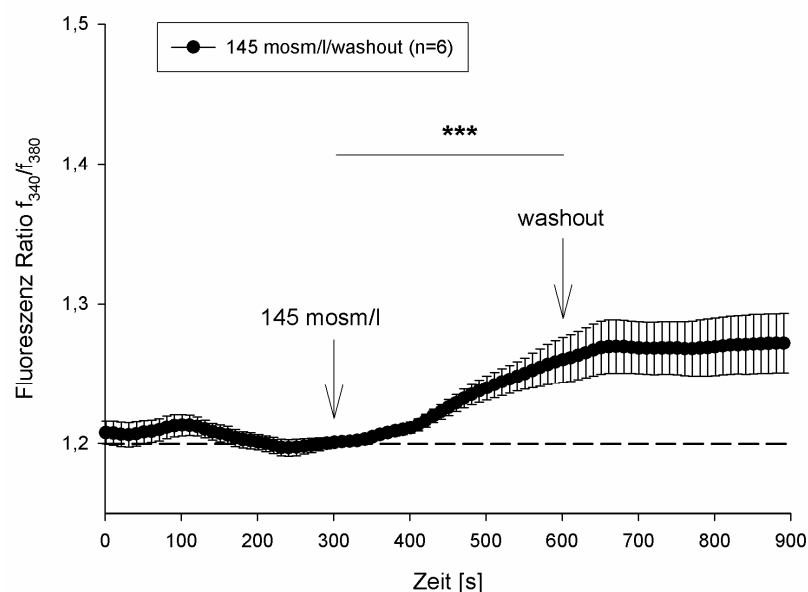


Abb. 11: Effekt von milder Hyperthermie, hervorgerufen nach 240 Sekunden, auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen mit regelrechter endogener TRPV4-Expression und nach 71,3%iger Suppression der TRPV4-Expression (TRPV4-siRNS-Vorbehandlung) gemessen nach 290 Sekunden. Die Kreise stellen Mittelwerte und die Balken Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test nach 290 bzw. 470 Sekunden ermittelt (# nicht signifikant, * $p < 0,05$).

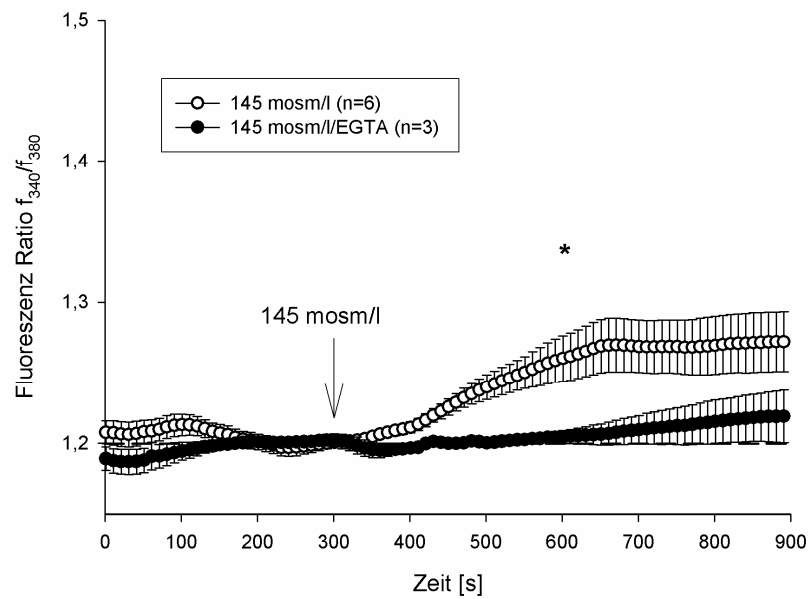
In der Kontrollgruppe (INS-1-Zellen transfiziert mit unspezifischer non-targeting siRNS; Mittelwert 27,5 °C, Standardabweichung $\pm 0,3$ °C, n = 4 Versuche) zeigte sich ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach 290 Sekunden ($p = 0,039$). In der Versuchsreihe mit INS-1-Zellen mit um 71,3% supprimierter TRPV4-Proteinproduktion wurde hingegen kein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nachgewiesen ($p = 0,5527$, 470 Sekunden versus 200 Sekunden).

4.3.3 TRPV4-vermittelte Kalziumantwort bei Hypoosmolarität

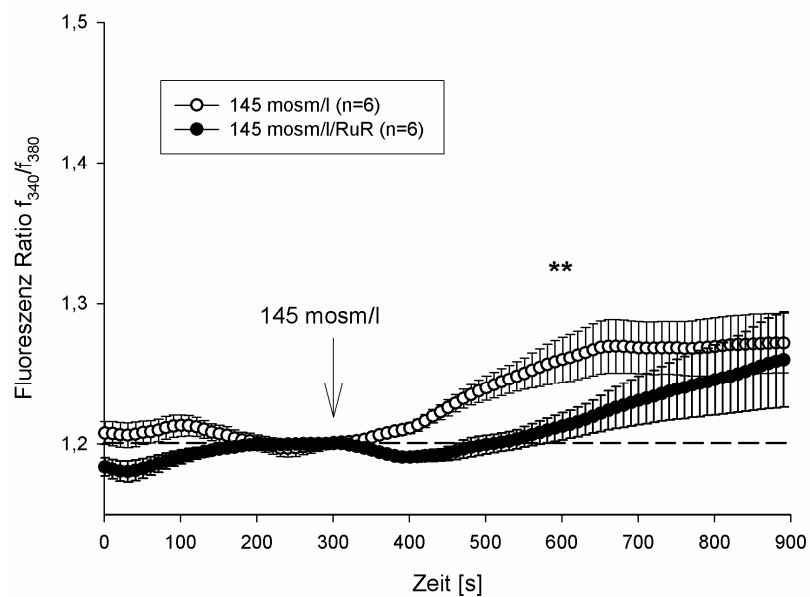
Da in der Literatur auch eine Aktivierung des TRPV4-Kanals durch Veränderungen der osmotischen Verhältnisse bekannt ist (Clapham 2003, Ramsey 2006), wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Wirkung von Hypoosmolarität auf das intrazelluläre Kalzium in INS-1-Zellen untersucht. Die Osmolarität der Badlösung wurde nach 300 Sekunden von 290 mosm/l auf 145 mosm/l gesenkt. Anschließend wurde in einer ersten Versuchsreihe mit einer isoosmolaren Lösung (290 mosm/l) ausgewaschen (washout). In einer weiteren Versuchsreihe wurde EGTA (1 mM) in die Badlösung zur Bindung des freien extrazellulären Kalziums zugegeben. In einer weiteren Versuchsreihe wurde Ruthenium Red (RuR, 10 μ M) in die Badlösung gegeben. RuR ist ein TRP-Kanalblocker, der vor allem mit TRPV1-6 aber auch mit TRPM8 interagiert. An TRPV4 wirkt RuR antagonistisch mit einer EC_{50} von 1 μ M (Voets et al., 2002). Die Untersuchungen wurden nach 600 Sekunden statistisch ausgewertet. Im ersten Versuch stieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Zugabe der hypoosmolaren Lösung an ($p = 0,0003$) (**Abbildung 12A**). Im kalziumfreien Inkubationsmedium zeigte sich ein geringerer Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($p = 0,0132$) (**Abbildung 12B**). Der TRP-Blocker RuR bewirkte einen verzögerten und auch geringeren intrazellulären Kalziumanstieg ($p = 0,0011$) (**Abbildung 12C**).



A)



B)



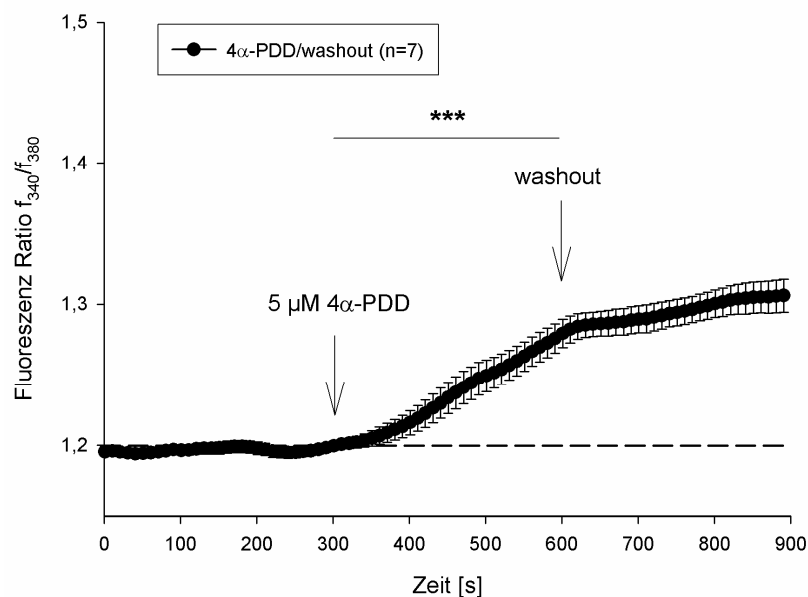
C)

Abb. 12 (A-C): Effekt von Hypoosmolarität auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen. A) Hypoosmolare Lösung (145 mosm/l) appliziert nach 300 Sekunden mit anschließendem washout nach 600 Sekunden B) Kalziumdepletion mit EGTA (1 mM) zugegeben nach 300 Sekunden C) Effekte des TRP-Kanalblockers RuR (10 μ M) zugegeben nach 300 Sekunden auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Die Kreise stellen Mittelwerte und die Balken Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test nach 600 Sekunden ermittelt (* $p > 0,05$, * $p > 0,001$).**

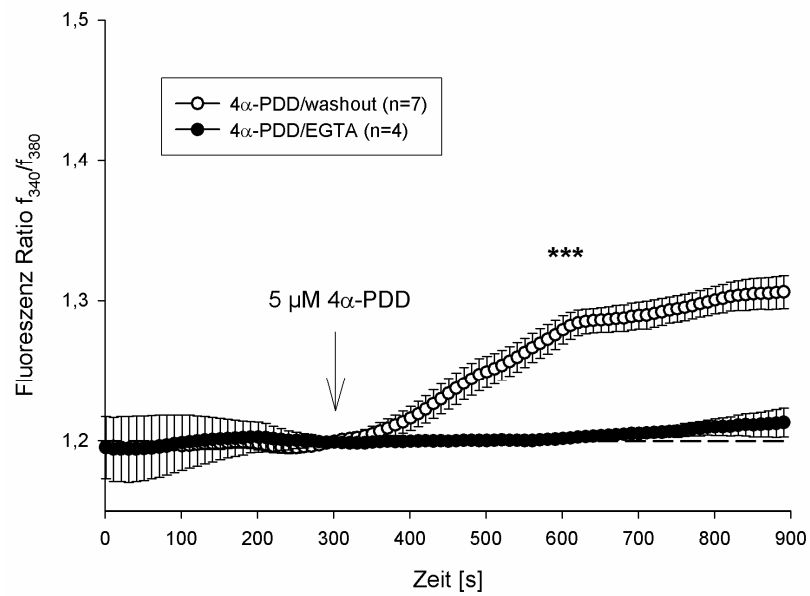
4.3.4 Pharmakologische Aktivierung der TRPV4-Kanäle mittels 4 α -PDD

In einem weiteren Schritt wurden die Effekte des spezifischen TRPV4-Aktivators 4 α -PDD auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration untersucht. Hierbei wurde nach 300 Sekunden Inkubationszeit 4 α -PDD (Endkonzentration von 5 μ M) in die Badlösung gegeben. In einer ersten Versuchsreihe wurde nach 600 Sekunden 4 α -PDD mit reiner Badlösung wieder ausgewaschen, in einer zweiten Versuchsreihe wurde EGTA (1 mM) in die Badlösung zur Bindung des freien extrazellulären Kalziums gegeben. In einer dritten Versuchsreihe wurde Lanthan(III)-chlorid (100 μ M) als Ionenkanalblocker appliziert. Die Kalziummessungen wurden nach 600 Sekunden statistisch ausgewertet.

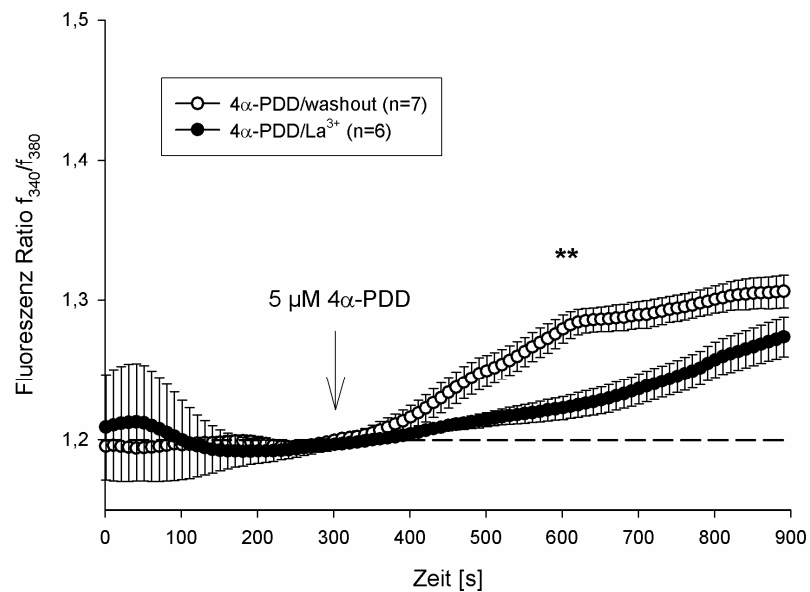
Im ersten Versuch stieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Zugabe von 4 α -PDD in die Inkubationslösung an ($p < 0,0001$) (**Abbildung 13A**). In EGTA-kalziumdepletierter Lösung zeigte sich im Vergleich zum ersten Versuch kein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($p = 0,0003$) (**Abbildung 13B**). Bei Nutzung des Ionenkanalblockers Lanthan(III)-chlorid zeigte sich ein verzögerter und auch geringerer intrazellulärer Kalziumanstieg ($p = 0,0014$) (**Abbildung 13C**).



A)



B)



C)

Abb. 13 (A-C): Effekt des spezifischen TRPV4-Aktivators 4 α -PDD auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen. A) 4 α -PDD (Endkonzentration 5 mM) appliziert nach 300 Sekunden mit anschließendem washout nach 600 Sekunden B) Kalziumdepletion mit EGTA (1 mM) zugegeben nach 300 Sekunden C) Applikation des Ionenkanalblockers Lanthan(III)-chlorid (100 μ M) zugegeben nach 300 Sekunden. Die Kreise stellen Mittelwerte und die Balken Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test nach 600 Sekunden ermittelt (** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$).

4.4 Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Regulation der Insulinsekretion in INS-1-Zellen

Anschließend wurden die Effekte des pharmakologischen TRPV4-Agonisten 4 α -PDD (5 mM) auf die Insulinsekretion untersucht. Die Insulinsekretion wurde sowohl bei niedriger (2,8 mM) als auch bei hoher (16,7 mM) Glukosekonzentration nach 60 Minuten Inkubationszeit gemessen. Bei 2,8 mM Glukosekonzentration zeigte 4 α -PDD keinen Effekt auf die Insulinsekretion ($p = 0,8213$). Bei 16,7 mM Glukose konnte 4 α -PDD die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen von $19,06 \pm 3,191$ ng/ml/60 min auf $30,15 \pm 1,792$ ng/ml/60 min potenzieren (Mittelwerte plus Standardfehler, Student's t-test: $p = 0,0072$) (Abbildung 14). Daher scheint die pharmakologische TRPV4-Aktivierung eine Glukose-abhängige Stimulation der Insulinsekretion zu bewirken.

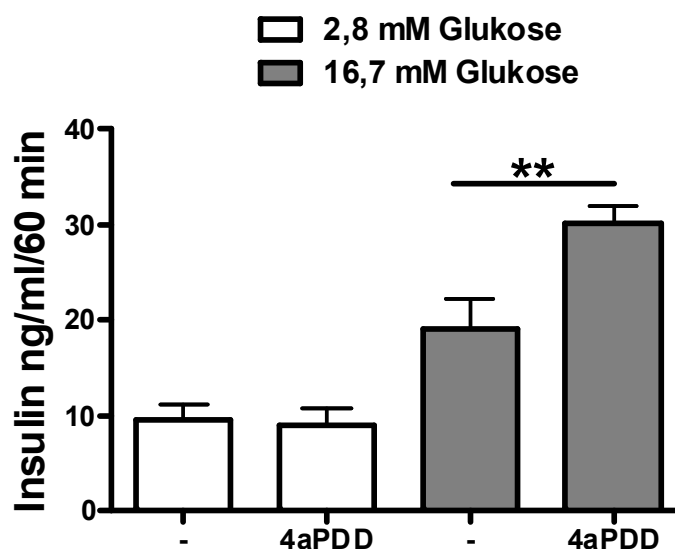


Abb. 14: Quantitative Beurteilung der Insulinsekretion bei einer Glukosekonzentration von 2,8 mM sowie 16,7 mM, mit und ohne 4 α -PDD. Die Balken stellen Mittelwerte und Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (** $p < 0,01$).

Es ist nicht ausgeschlossen, dass der pharmakologische TRPV4-Aktivator 4 α -PDD auch über andere TRP-Kanäle die Insulinsekretion beeinflussen kann. Daher wurde die Rolle des TRPV4-Kanals für die Regulation der Insulinsekretion in INS-1-Zellen, die einem Zielgen-spezifischen TRPV4-siRNS-Silencing unterzogen wurden (siehe

Kapitel 4.2.2), untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit unspezifischer „non-targeting-siRNS“ transfiziert wurden. Alle Zellen wurden mit 4 α -PDD (5 μ M) inkubiert. Erwartungsgemäß potenzierte 4 α -PDD die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in Zellen, die mit non-targeting siRNS transfiziert worden waren ($p = 0,0034$). In Zellen mit reduzierter TRPV4-Proteinproduktion konnte jedoch keine Steigerung der Insulinsekretion nach Inkubation mit 4 α -PDD beobachtet werden ($p = 0,5645$) (Abbildung 15). Daher sind die Effekte des TRPV4-Aktivators 4 α -PDD auf die Insulinsekretion in der Tat auf eine spezifische und selektive Aktivierung des TRPV4-Kanals zurückzuführen.

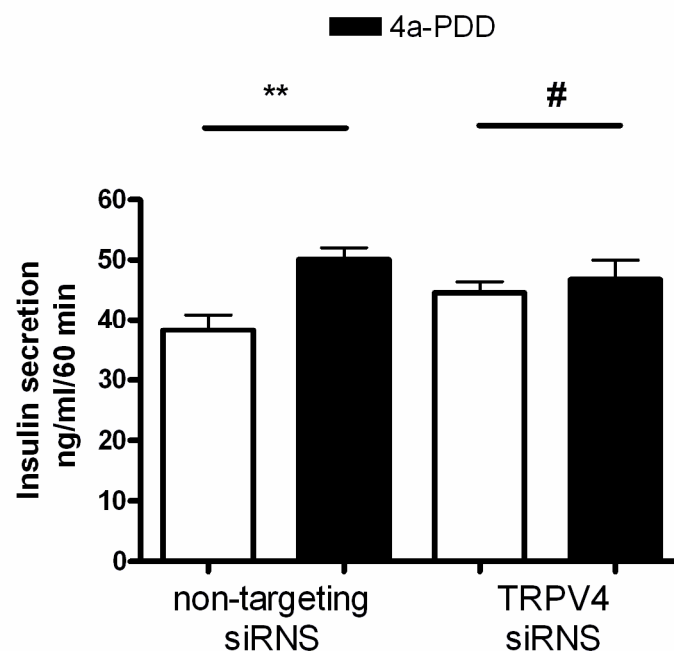


Abb. 15: Quantitative Beurteilung der Effekte von 4 α -PDD auf die Insulinsekretion in INS-1-Zellen nach vorheriger Behandlung mit non-targeting siRNS oder TRPV4-siRNS (Suppression der TRPV4-Expression um 71,3%) . Die Balken stellen Mittelwerte und Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (# nicht signifikant, ** $p < 0,01$).

In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob der generelle TRP-Blocker RuR (5 μ M) die 4 α -PDD-stimulierte Insulinsekretion beeinflussen kann.

Bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM zeigte sich bei Zugabe von 4 α -PDD (5 μ M) eine erhöhte Insulinsekretion ($p = 0,0003$). RuR (5 μ M) blockierte die 4 α -PDD-induzierte Stimulation der Insulinsekretion ($p = 0,0002$) (Abbildung 16).

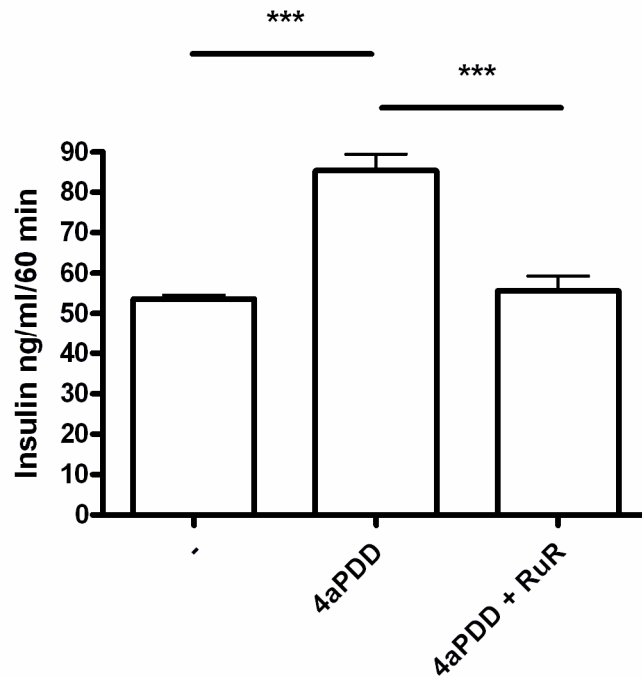


Abb. 16: Quantitative Beurteilung der Effekte von 4 α -PDD auf die Insulinsekretion in Abwesenheit oder Anwesenheit des TRP-Blockers RuR. Linker Balken: Kontrollmessung. Mittlerer Balken: Effekt von 4 α -PDD (5 μ M) auf die Insulinsekretion. Rechter Balken: Effekt von 4 α -PDD (5 μ M) auf die Insulinsekretion in Anwesenheit von RuR (5 μ M). Die Balken stellen Mittelwerte und Standardfehler dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (***) ($p < 0,001$).

Diese Daten legen nahe, dass die Aktivierung des TRPV4-Kanals die Glukose-stimulierte Insulinsekretion potenzieren kann.

4.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

1. Die mRNA-Expression und Proteinproduktion des TRPV4-Kanals konnte mittels RT-PCR und Western Blot gezeigt werden. Bei Zellen, die mit Zielgen-spezifischer TRPV4-siRNA transfiziert wurden, konnte eine 71,3%ige Reduktion der TRPV4-Proteinproduktion im Western Blot gezeigt werden.
2. Bei den Kalziummessungen konnte eine spezifische TRPV4-vermittelte Kalziumantwort nach moderater Hyperthermie gezeigt werden. Dieser Kalziumanstieg konnte in Zellen, die eine 71,3%ige Reduktion der TRPV4-Proteinproduktion aufwiesen, deutlich reduziert werden.
3. Bei weiteren Kalziummessungen konnte eine TRPV4-vermittelte Kalziumantwort in hyposmolarer Messlösung gezeigt werden, die mit dem TRP-Blocker unterdrückt werden konnte.
4. Auch eine spezifische pharmakologische Aktivierung des TRPV4 mit dem Phorbol-ester 4α -PDD führte zu einem Kalziumanstieg, der mit dem Ionenkanalblocker Lanthan(III)-chlorid reduziert werden konnte.
5. Die Wiederholung der in Punkt 3 und 4 genannten Messungen in kalziumfreier Lösung führte zu keinem signifikanten intrazellulären Kalziumanstieg. Dies zeigt, dass TRPV4 ein kalziumleitender Kanal ist.
6. Die pharmakologische Aktivierung des TRPV4-Kanals mit 4α -PDD führte bei hoher Glukosekonzentration auch zu einer Erhöhung der Insulinsekretion. Diese Wirkung war in INS-1-Zellen mit reduzierter TRPV4-Proteinproduktion nicht mehr nachweisbar.

5 Diskussion

5.1 Detektion von TRPV4-Kanälen in INS-1-Zellen

Es ist bekannt, dass in pankreatischen β -Zellen TRP-Kanäle exprimiert werden (Colsoul et al. 2011). Casas et al. konnten 2008 mittels RT-PCR und siRNS-Technik als Erste den TRPV4-Kanal in der pankreatischen Maus- β -Zelllinie MIN6 nachweisen. Sie zeigten, dass hIAPP über eine TRPV4-Aktivierung die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen kann. Sie wiesen auch nach, dass TRPV4-siRNS-Silencing die hIAPP-induzierte Zytotoxizität partiell aufheben kann (Casas et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde der TRPV4-Kanal in der pankreatischen Ratten- β -Zelllinie INS-1 mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Im Western Blot zeigten sich mehrere Banden, so dass erst nach TRPV4-siRNS-Silencing und einem weiteren Western Blot der TRPV4-Kanal auf Proteinebene sicher detektiert werden konnte. Das ermittelte Molekulargewicht von 110 kDA ist im Einklang mit der Literatur (Hills et al. 2012) und entspricht auch der Beschreibung des Herstellers. Es konnte somit erstmals der TRPV4-Kanal in INS-1-Zellen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden.

5.2 Kalziummessungen

Prinzipiell ist es möglich, dass zu hohe Fura-2-Konzentrationen durch die Pufferkapazität des Farbstoffs für Kalzium den Metabolismus der Zellen verändern. Es konnte aber gezeigt werden, dass Fura-2-Konzentrationen von unter 10 μ M bzw. unter 6 μ M keinen signifikanten Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben (Noble et al. 1991, Timmerman et al. 1986). In der vorliegenden Dissertation wurde Fura-2 in deutlich niedrigeren Konzentrationen von maximal 1 μ M eingesetzt. Eine weitere Störgröße könnte ein irreversibles Ausbleichen des Farbstoffes bei Tageslicht darstellen. Durch zu langes Einwirken der Anregungsquelle werden Metabolite wie z. B. freie Radikale produziert, welche den Farbstoff zerfallen lassen (Almers and Neher, 1985). Um diesem Ausbleicheffekt während der Fluoreszenzmessungen vorzubeugen, wurde ausschließlich im abgedunkelten Raum gearbeitet und das Licht der Anregungsquelle zwischen den Versuchen abgeblendet.

5.3 Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration in INS-1-Zellen

5.3.1 Hyperthermie

Montell beschrieb in seiner Übersichtsarbeit von 2005, dass es eine Reihe von thermosensitiven TRP-Kanälen gibt. TRPV1-4, TRPM8 sowie TRPA1 Kanäle sind thermosensitiv (Montell 2005). Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente bei einer Hyperthermie von bis zu circa 50 °C zeigen einen irreversiblen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der trotz Abkühlung der Badlösung auf circa 26 °C bestehen bleibt. Bei diesen hohen Temperaturen ist neben der Aktivierung von allen oben genannten thermosensitiven TRP-Kanälen bis auf TRPV2 (Schwellenwert >52 °C) auch eine Reihe von weiteren, unspezifischen Effekten denkbar. Deswegen wurde in einem weiteren Versuch die Temperatur in einen moderaten Bereich von circa 27,5 °C erhöht. Hier zeigte sich unter dieser moderater Hyperthermie ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums in INS-1-Zellen. Bei Säugetieren wird in diesem Temperaturbereich neben dem TRPV4-Kanal (Schwellenwert ≥ 27 °C) nur noch der TRPM8-Kanal (Schwellenwert 23-28 °C) aktiviert. In der Literatur ist bisher kein Nachweis von TRPM8-Kanälen in pankreatischen β -Zellen dokumentiert (Nilius et al. 2011). Zur Erhärtung der These, dass der Hyperthermie-induzierte intrazelluläre Kalziumanstieg über den TRPV4-Kanal vermittelt ist, wurde die Proteinsynthese des TRPV4-Kanals mittels TRPV4-siRNS-Silencing unterdrückt. Unter diesen Bedingungen war kein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu vermerken. Zusammengefasst deuten die Experimente darauf hin, dass der TRPV4-Kanal zumindest in einem Temperaturbereich von 20 °C (Zimmertemperatur der Experimente) bis circa 27,5 °C an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt ist. Silva-Alves et al. beschrieben 2008, dass Glukose in isolierten Ratten-Pankreas-Inseln metabolische Hyperthermie induziert (Silva-Alves JM 2008). Denkbar wäre, dass der TRPV4-Kanal auf diesen hyperthermischen Reiz reagiert und modulierend bzw. unterstützend auf die K^+_{ATP} -Kanal-gesteuerte Insulinsekretion wirkt.

5.3.2 Hypoosmolarität

Neben Montell beschrieben auch Liedtke et al. eine Osmosensitivität für TRPV4-Kanäle (Liedtke et al. 2000, Montell 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine hypotone Lösung mit 145 mosm/l benutzt. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums. Beim Auswaschen mit isoosmolarer Lösung (290 mosm/l) zeigten die Zellen keinen weiteren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen noch reagibel und vital sind. In einem weiteren Versuch wurde mittels EGTA und kalziumfreier Lösung ein kalziumfreies extrazelluläres Milieu erzeugt. Unter diesen Bedingungen war nur noch ein minimaler intrazellulärer Kalziumanstieg nachweisbar. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration über die Zellmembran hinweg geschehen ist und nicht auf eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zurückzuführen ist. Die durch Hypoosmolarität induzierten Effekte konnten durch den TRP-Blocker RuR reduziert werden. RuR ist in mikromolarer Konzentration ein TRPV4-Inhibitor. Allerdings blockiert RuR unter anderem auch spannungsabhängige Kalziumkanäle (voltage-operated calcium channels) (Voets et al. 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegen im Einklang mit den Untersuchungen von Voets et al. (Plant et al. 2007, Voets et al. 2002). Der von Plant et al. postulierte Weg der intrazellulären Signalkaskade beinhaltet eine Zellschwellung als Folge einer hypoosmolaren Stimulation. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Zellschwellung u. a. Phospholipase A₂ (PLA₂) aktiviert wird (Hoffmann 2000). Watanabe et al. zeigten, dass eine Inhibition von PLA₂ eine Aktivierung von TRPV4 durch Zellschwellung verhindert (Watanabe et al. 2003). PLA₂ setzt aus Phospholipiden der Zellmembran Arachidonsäure frei. In einem weiteren Schritt wird aus der Arachidonsäure mittels Cytochrom P450 Epoxygenase Epoxyeicosatrien-Säure (EET) metabolisiert, welche entweder direkt oder indirekt den TRPV4-Kanal aktivieren kann (Watanabe et al. 2003).

Kritisch gesehen werden muss bei den vorliegenden Ergebnissen die unphysiologisch extrem niedrige Osmolarität. Daher wird gefordert, dass weitere

Studien mit nur leicht hypoosmolarer Lösung (z.B. 270 mosm/l) durchgeführt werden sollten.

5.3.3 4 α -PDD

4 α -PDD ist ein sehr gut etablierter spezifischer TRPV4-Aktivator (Watanabe et al. 2002). Die hier vorliegenden Versuche zeigen, dass auch in INS-1-Zellen eine intrazelluläre Kalziumerhöhung mittels 4 α -PDD induziert werden kann. Die Versuche im kalziumfreien Milieu zeigten keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, was dafür spricht, dass der 4 α -PDD-vermittelte Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration über die Zellmembran hinweg geschieht und nicht auf eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zurückzuführen ist. Trotz Blockierung der TRPV4-Kanäle mit dem Ionenkanalblocker Lanthan(III)-chlorid führte 4 α -PDD zu einem geringeren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Neben der hochspezifischen Aktivierung des TRPV4-Kanals ist für 4 α -PDD eine geringe aktivierende Wirkung auf den TRPV1-Kanal beschrieben (Bhave et al. 2003). 4 α -PDD hat insgesamt aber wenige biologische Nebeneffekte (Plant et al. 2007).

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass 4 α -PDD und Hyperthermie die gleichen Aktivierungsmechanismen benutzen, die unabhängig von denen von Hypoosmolarität und Arachidonsäure-Metaboliten wie EET sind. Es ist bekannt, dass der spezifische TRPV1-Aktivator Capsaicin an eine Tyrosin-Serin-Sequenz zwischen dem zweiten und dritten Transmembran-Segment des TRPV1-Kanals bindet (Jordt et al. 2002). Vriens et al. suchten analog hierzu eine ähnliche Bindungsstelle für den TRPV4-Kanal und fanden eine Tyrosin-Serin-Sequenz am N-terminalen Ende des dritten Transmembran-Segmentes. Eine Mutation des Tyrosins an dieser Stelle führte zu einem Verlust der Aktivierbarkeit des TRPV4-Kanals durch 4 α -PDD und Hyperthermie, nicht aber zum Verlust der Aktivierbarkeit durch Hypoosmolarität und Arachidonsäure-Metabolite (Vriens et al. 2004). Des Weiteren ist möglicherweise ein Hyperthermie-aktivierender, bisher nicht identifizierter endogener Lipidmediator involviert (Guler et al. 2002).

5.4 4 α -PDD steigert Glukose-abhängig die Insulinsekretion in INS-Zellen

In weiteren Versuchen wurden die Auswirkungen der TRPV4-Aktivierung auf die Insulinsekretion der INS-1-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der spezifische TRPV4-Aktivator 4 α -PDD bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM eine erhöhte Insulinsekretion bewirkt. Da bei einer niedrigen Glukosekonzentration von nur 2,8 mM keine 4 α -PDD-induzierte gesteigerte Insulinsekretion nachweisbar war, lässt sich vermuten, dass die TRPV4-Aktivierung durch 4 α -PDD zwar nicht der alleinige Stimulus für die Insulinsekretion, aber zumindest ein modulierender Faktor ist. Um nachzuweisen, dass diese Effekte auf eine Aktivierung des TRPV4-Kanals zurückzuführen sind, wurde wiederum mittels TRPV-siRNS-Silencing die TRPV4-Proteinproduktion um 71,3% reduziert. Unter diesen Bedingungen war bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM kein 4 α -PDD-induzierter Anstieg der Insulinsekretion nachweisbar. Dieser Umstand spricht umso mehr dafür, dass 4 α -PDD über eine TRPV4-Aktivierung die Insulinsekretion erhöht. Auch die Ergebnisse in Versuchen mit dem TRP-Blocker RuR deuten in diese Richtung.

5.5 Limitationen der Arbeit

Es ist schwierig, intakte β -Zellen aus dem Pankreas zu isolieren. Im Pankreas sind weitere Zellarten vorhanden, so dass man aus der Präparation des Pankreas mehrere sekretorisch aktive Zellarten bekommt. Das eindeutige Identifizieren von einzelnen β -Zellen aus einem Gemisch an mehreren sekretorisch-aktiven und anderen Zellarten ist schwierig. Die Arbeiten wurden daher an Insulinproduzierenden INS-1-Zellen durchgeführt. Diese immortalisierte und sehr gut experimentell etablierte Zelllinie hat im Vergleich zu isolierten pankreatischen β -Zellen den Vorteil, dass die Untersuchungsergebnisse geringere Schwankungen haben, wodurch die Zahl der Experimente überschaubar ist. Darüber hinaus lassen sich β -Zellen schwierig isolieren. In klonalen Insulinproduzierenden Zelllinien lassen sich direkte Effekte der zu testenden Agenzien in Insulinproduzierenden Zellen untersuchen. Hierin liegt auf der anderen Seite jedoch eine wesentliche Schwäche der immortalisierten Zelllinien. Aufgrund fehlender parakriner Interaktion mit anderen Zelltypen der Langerhans-Inseln (Caicedo 2013), wie z. B. Glukagonproduzierenden α -Zellen, sind die Ergebnisse nur bedingt auf eine in vivo-Situation übertragbar.

5.6 Klinische Relevanz und Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an kultivierten INS-1-Zellen führten zur Erkenntnis, dass erstmals ein funktioneller Nachweis der Beteiligung des TRPV4-Kanals an der Insulinsekretion getätigt werden konnte. So konnte mit Kalzium- und Insulinsekretionsmessungen gezeigt werden, dass nach Aktivierung des TRPV4-Kanals ein Kalziumeinstrom von extrazellulär in die Zellen hinein stattfindet, der wiederum die Insulinsekretion bei hoher Glukosekonzentration stimuliert. Klinisch relevant wäre zunächst die Kenntnis etwaiger endogener Modulatoren des TRPV4-Kanals.

In diesem Zusammenhang beschrieben Ye et al., dass der TRPV4-Kanal einen Einfluss auf die Energiehomöostase hat (Ye et al. 2012). Die Studie zeigte, dass eine Blockade des TRPV4-Kanals Mäuse vor einer Diät-induzierten Adipositas und Insulinresistenz schützt. Des Weiteren haben TRPV4-gendefiziente Mäuse eine reduzierte Nüchtern- und Glukose-induzierte Insulinsekretion (Ye et al. 2012). Da Hyperinsulinämie ein Merkmal der Insulinresistenz ist, wurde vermutet, dass niedrige Plasmainsulinkonzentrationen in TRPV4-defizienten Mäusen eine Folge einer erhöhten Insulinsensitivität sind. Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten allerdings in die Richtung, dass eine Aktivierung des TRPV4-Kanals die Insulinsekretion von β -Zellen potenziert, so dass die niedrigeren Plasmainsulinkonzentrationen in TRPV4-defizienten Mäusen eher Folge der reduzierten TRPV4-Expression sind.

Bisher ist eine solche Wirkung vom TRPM2-Kanal (Uchida et al. 2011) und TRPM4-Kanal bekannt (Cheng et al. 2007).

In Hinblick auf die Ergebnisse von Silva-Alves et al. kann bezüglich der intrazellulären Signalkaskaden vermutet werden, dass z. B. bei der Glukosemetabolisierung entstehende Wärme (Silva-Alves JM 2008) als Aktivator der TRPV4-Kanäle fungiert und über diesen Weg die Insulinsekretion moduliert. Des Weiteren ist auch eine Aktivierung der PLA₂ über Hypoosmolarität und Zellschwellung zu diskutieren, die schliesslich zur Freisetzung von EET führt, die wiederum ein Aktivator des TRPV4-Kanals ist. Ein interessanter Aspekt ist die Glukose-abhängige Stimulation der Insulinfreisetzung. Bei niedriger Glukosekonzentration (vergleichbar mit moderater

Hypoglykämie) führt die pharmakologische TRPV4-Aktivierung nicht zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Der stimulierende Effekt der TRPV4-Aktivators tritt erst bei einer hohen Glukosekonzentration auf. Aus klinischer Sicht wäre eine solche Glukose-Abhängigkeit wünschenswert. So wären z. B. lebensbedrohliche Hypoglykämien nach Aktivierung des TRPV4-Kanals nicht zu erwarten. Die erwünschte Stimulation der Insulinfreisetzung träte erst bei hohen Blutglukosekonzentrationen auf. Eine solche Glukose-Abhängigkeit wird zunehmend von den neuen Antidiabetika gefordert. Einige davon (Inkretine) spielen zunehmend eine größere Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Allerdings muss erneut betont werden, dass die Ergebnisse der Dissertation lediglich in vitro durchgeführt worden sind und eine Übertragbarkeit in vivo nur bedingt möglich ist.

Insgesamt betrachtet konnten in der vorliegenden Arbeit TRPV4-Kanäle in pankreatischen β -Zellen detektieren werden. Dieser Ionenkanal ist funktionell aktiv. Stimulation des TRPV4-Kanals führt zu intrazellulärer Kalziumakkumulation in den Zellen. Als Folge der TRPV4-Aktivierung wird die Insulinsekretion der β -Zellen getriggert. Ob bei Diabetes mellitus, welcher sich durch eine Fehlfunktion der β -Zellen auszeichnet, der TRPV4-Kanal eine Rolle spielt, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

6 Literatur

1. AKIBA Y, KATO S, KATSUBE K, et al. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321(1):219-25.
2. ALMERS W, NEHER E. The Ca signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading. *FEBS Lett* 1985;192(1):13-8.
3. ASFARI M, JANJIC D, MEDA P, LI G, HALBAN PA, WOLLHEIM CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992;130(1):167-78.
4. ASHCROFT FM, HARRISON DE, ASHCROFT SJ. Glucose induces closure of potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 1984;312(5993):446-8.
5. BANSAL M, MARWICK TH. Natriuretic peptides and filling pressure at rest and stress. *Heart Fail Clin* 2008;4(1):71-86.
6. BHAVE G, HU HJ, GLAUNER KS, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12480-5.
7. BJORKLUND A, LANSNER A, GRILL VE. Glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ abnormalities in human pancreatic islets: important role of overstimulation. *Diabetes* 2000;49(11):1840-8.
8. BRANDMAN O, LIOU J, PARK WS, MEYER T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. *Cell* 2007;131(7):1327-39.

9. BRAUCHI S, ORIO P, LATORRE R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(43):15494-9.
10. BRAY GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 1977;36(2):148-53.
11. BURNETTE WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112(2):195-203.
12. CABRERA O, BERMAN DM, KENYON NS, RICORDI C, BERGGREN PO, CAICEDO A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7):2334-9.
13. CAICEDO A. Paracrine and autocrine interactions in the human islet: More than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(1):11-21.
14. CASAS S, NOVIALS A, REIMANN F, GOMIS R, GRIBBLE FM. Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. *Diabetologia* 2008;51(12):2252-62.
15. CHENG H, BECK A, LAUNAY P, et al. TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 2007;41(1):51-61.
16. CHERRINGTON AD, EDGERTON D, SINDELAR DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* 1998;41(9):987-96.
17. CHICK WL, WARREN S, CHUTE RN, LIKE AA, LAURIS V, KITCHEN KC. A transplantable insulinoma in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(2):628-32.

18. CLAPHAM DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80(2):259-68.
19. CLAPHAM DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426(6966):517-24.
20. CLAPHAM DE, RUNNELS LW, STRUBING C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(6):387-96.
21. COLSOUL B, VENNEKENS R, NILIUS B. Transient receptor potential cation channels in pancreatic beta cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2011;161:87-110.
22. DEL GUERRA S, LUPI R, MARSELLI L, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54(3):727-35.
23. DRUCKER DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006;3(3):153-65.
24. EFRAT S. Development of engineered pancreatic beta-cell lines for cell therapy of diabetes. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33(1-2):45-52.
25. ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15(2):188-200.
26. FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
27. GAUTHIER BR, WOLLHEIM CB. Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(6):E1279-86.

28. GLASSMEIER G, STRUBING C, RIECKEN EO, et al. Electrophysiological properties of human carcinoid cells of the gut. *Gastroenterology* 1997;113(1):90-100.
29. GLOYN AL, WEEDON MN, OWEN KR, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(2):568-72.
30. GRAHAM TE, YANG Q, BLUHER M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354(24):2552-63.
31. GRIFFITHS JB. The effect of insulin on the growth and metabolism of the human diploid cell, WI-38. *J Cell Sci* 1970;7(2):575-85.
32. GRILL V, BJORKLUND A. Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S122-4.
33. GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260(6):3440-50.
34. GULER AD, LEE H, IIDA T, SHIMIZU I, TOMINAGA M, CATERINA M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 2002;22(15):6408-14.
35. HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286(5441):950-2.
36. HARDIE RC, MINKE B. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1992;8(4):643-51.

37. HENQUIN JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000;49(11):1751-60.
38. HERBST M, SASSE P, GREGER R, YU H, HESCHELER J, ULLRICH S. Membrane potential dependent modulations of calcium oscillations in insulin-secreting INS-1 cells. *Cell Calcium* 2002;31(3):115-26.
39. HILLS CE, BLAND R, SQUIRES PE. Functional expression of TRPV4 channels in human collecting duct cells: implications for secondary hypertension in diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:936518.
40. HOFFMANN EK. Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem* 2000;10(5-6):273-88.
41. HOHMEIER HE, NEWGARD CB. Cell lines derived from pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228(1-2):121-8.
42. HU HZ, GU Q, WANG C, et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 2004;279(34):35741-8.
43. JACKSON AL, BARTZ SR, SCHELTER J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21(6):635-7.
44. JACOBSEN SE, RUNNING MP, MEYEROWITZ EM. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 1999;126(23):5231-43.
45. JENSEN MD, CARUSO M, HEILING V, MILES JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989;38(12):1595-601.
46. JORDT SE, JULIUS D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 2002;108(3):421-30.

47. KISELYOV K, SOYOMBO A, MUALLEM S. TRPpathies. *J Physiol* 2007;578(Pt 3):641-53.
48. LAUNAY P, FLEIG A, PERRAUD AL, SCHARENBERG AM, PENNER R, KINET JP. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 2002;109(3):397-407.
49. LETO D, SALTIEL AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(6):383-96.
50. LIEDTKE W, CHOE Y, MARTI-RENOM MA, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 2000;103(3):525-35.
51. MEEK SE, PERSSON M, FORD GC, NAIR KS. Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects. *Diabetes* 1998;47(12):1824-35.
52. MERGLER S, SINGH V, GROTZINGER C, KACZMAREK P, WIEDENMANN B, STROWSKI MZ. Characterization of voltage operated R-type Ca²⁺ channels in modulating somatostatin receptor subtype 2- and 3-dependent inhibition of insulin secretion from INS-1 cells. *Cell Signal* 2008;20(12):2286-95.
53. MERGLER S, SKRZYPSKI M, SASSEK M, et al. 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(1):233-46.
54. MERGLER S, STROWSKI MZ, KAISER S, et al. Transient receptor potential channel TRPM8 agonists stimulate calcium influx and neurotensin secretion in neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology* 2007;85(2):81-92.

55. MERGLER S, VALTINK M, COULSON-THOMAS VJ, et al. TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2010;90(6):758-70.
56. MONTELL C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005;2005(272):re3.
57. MONTELL C, BIRNBAUMER L, FLOCKERZI V, et al. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 2002;9(2):229-31.
58. NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990;2(4):279-89.
59. NIJENHUIS T, VALLON V, VAN DER KEMP AW, LOFFING J, HOENDEROP JG, BINDELS RJ. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest* 2005;115(6):1651-8.
60. NILIUS B, OWSIANIK G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011;12(3):218.
61. NILIUS B, OWSIANIK G, VOETS T, PETERS JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):165-217.
62. NOBLE D, POWELL T. The slowing of Ca²⁺ signals by Ca²⁺ indicators in cardiac muscle. *Proc Biol Sci* 1991;246(1316):167-72.
63. PLANT TD, STROTMANN R. Trpv4. *Handb Exp Pharmacol* 2007(179):189-205.
64. POITOUT V, ROBERTSON RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008;29(3):351-66.

65. PRENTKI M, NOLAN CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116(7):1802-12.
66. RAMSEY IS, DELLING M, CLAPHAM DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006;68:619-47.
67. REISER J, POLU KR, MOLLER CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005;37(7):739-44.
68. RENART J, REISER J, STARK GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(7):3116-20.
69. SAKURA H, ASHCROFT FM. Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 1997;40(5):528-32.
70. SALTIEL AR, KAHN CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414(6865):799-806.
71. SILVA-ALVES JM M-GT, OLIVEIRA JS, COSTA-SILVA C, BRETZ P, ARAUJO S, FERREIRA E, COIMBRA C, SOGAYAR MC, REIS R, MARESGUIA ML, SANTORO MM. Glucose-induced heat production, insulin secretion and lactate production in isolated Wistar rat pancreatic islets. *Thermochimica Acta* 2008;474(1-2):67-71.
72. SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98(3):503-17.
73. SUTTERS M, GERMINO GG. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med* 2003;141(2):91-101.

74. TABORSKY GJ, JR., SMITH PH, PORTE D, JR. Differential effects of somatostatin analogues on alpha- and beta-cells of the pancreas. *Am J Physiol* 1979;236(2):E123-8.
75. TANAKA Y, GLEASON CE, TRAN PO, HARMON JS, ROBERTSON RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19):10857-62.
76. TANAKA Y, TRAN PO, HARMON J, ROBERTSON RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12363-8.
77. TIMMERMAN MP, ASHLEY CC. Fura-2 diffusion and its use as an indicator of transient free calcium changes in single striated muscle cells. *FEBS Lett* 1986;209(1):1-8.
78. TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4.
79. TSIEN RY, POZZAN T, RINK TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982;94(2):325-34.
80. UCHIDA K, TOMINAGA M. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocr J* 2011;58(12):1021-8.
81. VOETS T, DROOGMANS G, WISSENBACH U, JANSSENS A, FLOCKERZI V, NILIUS B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 2004;430(7001):748-54.
82. VOETS T, PRENEN J, VRIENS J, et al. Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 2002;277(37):33704-10.

83. VRIENS J, APPENDINO G, NILIUS B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 2009;75(6):1262-79.
84. VRIENS J, WATANABE H, JANSSENS A, DROOGMANS G, VOETS T, NILIUS B. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):396-401.
85. WATANABE H, DAVIS JB, SMART D, et al. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 2002;277(16):13569-77.
86. WATANABE H, VRIENS J, PRENEN J, DROOGMANS G, VOETS T, NILIUS B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 2003;424(6947):434-8.
87. WOJTUSCISZYN A, ARMANET M, MOREL P, BERNEY T, BOSCO D. Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia* 2008;51(10):1843-52.
88. YANG H, MERGLER S, SUN X, et al. TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(37):32230-7.
89. YE L, KLEINER S, WU J, et al. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 2012;151(1):96-110.
90. ZHANG F, YANG H, WANG Z, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *J Cell Physiol* 2007;213(3):730-9.

7 Anhang

7.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Manoj Kakkassery, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung des transienten Rezeptorpotential-Kationenkanals TRPV4 in Insulin-produzierenden INS-1-Zellen“ 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 Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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 an etwaigen erfolgten Publikationen

Manoj Kakkassery hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Autoren: M. Skrzypski*, **M. Kakkassery***, S. Mergler, K.W. Nowak, C. Grötzinger, M.Z. Strowski

* geteilte Erstautorenschaft

Titel: **Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms**

Zeitschrift: eingereicht in März 2013 bei FEBS Letters ; Impact Factor: 3,538 (2011)

Beitrag im Einzelnen:

Unter meiner Anleitung bestanden die Leistungen des Promovenden in Bezug auf die Veröffentlichung darin, dass er circa 50% der Experimente selbstständig durchgeführt, die Daten eigenständig interpretiert und aufgearbeitet sowie die Ergebnisse im Rahmen von z. B. Labormeetings präsentiert hat. Der Promovend trug zu circa 30% zur Erstellung des Manuskriptes bei inklusive Erstellung der zur Veröffentlichung geeigneten Grafiken.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

7.2 Lebenslauf

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

7.3 Publikationsliste

1. **Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms**

M. Skrzypski^{a,b*}, **M. Kakkassery^{a*}**, S. Mergler^c, K.W. Nowak^b, C. Grötzinger^a,
M.Z. Strowski^{a,#}

*equal contribution

^aDepartment of Hepatology and Gastroenterology & the Interdisciplinary Centre of Metabolism: Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Charité - University Medicine Berlin, 13353 Berlin, Germany, ^bDepartment of Animal Physiology and Biochemistry, Poznań University of Life Sciences, 60-637 Poznań, Poland, ^cDepartment of Ophthalmology, Charité - University Medicine Berlin, 13353 Berlin, Germany

FEBS Letters (submitted); Impact Factor: 3,538 (2011)

7.4 Danksagung

Für die Begleitung meiner Dissertation habe ich vielen Menschen zu danken.

In erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Mathias Strowski. Seine Hilfe bei der Ausarbeitung der Fragestellung und Umsetzung der Ideen war entscheidend für das Gelingen der Dissertation. Mit unermüdlicher Geduld hat er mir wertvolle Ratschläge und immer wieder neue Denkanstöße gegeben, die mich Schritt für Schritt ans Ziel gebracht haben.

Ebenso danke ich Dr. phil. nat. Dipl.-Phys. Dipl.-Biol. Stefan Mergler, der mir schon vor Aufnehmen der Dissertation die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens gezeigt hat. Insbesondere seine Wertlegung auf sauberes, nachvollziehbares Arbeiten habe mein weiteres wissenschaftliches Handeln geprägt.

Ein großer Dank geht auch an Marek Skrzypski, der mich bei den molekularbiologischen Experimenten unterstützt hat. Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Carsten Grötzinger für die Möglichkeit, die Einrichtungen in seinem Forschungslabor nutzen zu dürfen. Schlussendlich gebührt ein Dank an den Institutsleiter der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Herrn Professor Dr. med. Bertram Wiedenmann, für die exzellente Infrastruktur, die es möglich machte, ein Klima der wissenschaftlichen Neugier entstehen zu lassen.

Abschließend möchte ich nicht nur in Bezug auf die hier vorliegende Dissertation meiner Familie und meinen Freunden für den in mich gesetzten Glauben danken. Ohne ihren Halt wäre dieses Werk nicht möglich gewesen.