

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur Rolle des Ionenkanals TRPM5  
in humanen Prostata-Zellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tamara Junius  
aus Hagen

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.07.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Bildverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Ziel der Dissertation</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>13</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.1 DNA- und RNA-Standardmethoden .....	35
3.1.1 Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	35
3.1.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription .....	36
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	37
3.1.4 Verdau der Plasmid-DNA .....	38
3.1.5 Aufreinigung von DNA-Proben.....	39
3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	40
3.1.8 Polymerase-Kettenreaktion .....	42
3.1.9 Quantitative Echtzeit-PCR .....	44
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	46
3.2.1 Transformation chemokompetenter Zellen mit Plasmidvektoren .....	46
3.3 Zellbiologische Methoden.....	49
3.3.1 Kultivierung von Zellen .....	49
3.3.2 Auftauen von kultivierten Zellen.....	49
3.3.3 Einfrieren von kultivierten Zellen.....	50
3.3.4 Bestimmung der Zellzahl .....	50
3.3.5 Stabile Transfektion humaner Zellen .....	51
3.3.6 Fixierung von Zellen für die Konfokalmikroskopie.....	53
3.4 Konfokale Laserscan-Mikroskopie .....	54
3.5 Stimulationsversuche humaner Zellen mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron .....	54
3.5.1 Herstellung von mit Aktivkohle gestripptem Fetalem Kälberserum .....	55
3.6 Anhang: Verwendetes Material .....	56
3.6.1 Bakterienstämme .....	56
3.6.2 Chemikalien und Reagenzien.....	56
3.6.3 Enzyme.....	58
3.6.4 Geräte.....	58
3.6.5 Kits.....	60

3.6.6	Lösungen und Puffer .....	60
3.6.7	Molekulargewichtsstandards .....	61
3.6.8	Oligonukleotide .....	62
3.6.9	Produktgrößen .....	62
3.6.10	Vektorkonstrukte .....	63
3.6.11	Verbrauchsmaterialien .....	63
3.6.12	Zelllinien .....	64
3.6.13	Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	64
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
4.1	Expression von <i>TRPM5</i> und <i>PSA</i> in verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien .....	65
4.1.1	Expressionsanalyse von <i>TRPM5</i> und <i>PSA</i> mithilfe der PCR .....	65
4.1.2	Analyse der Expressionsstärke von <i>PSA</i> und <i>hK2</i> mittels qRT-PCR .....	70
4.2	Generierung von mit <i>TRPM5</i> stabil transfizierten Zelllinien .....	72
4.3	Stimulierbarkeit nativer und stabil transfizierter Prostata-Karzinom Zellen mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron .....	75
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
5.1	Expression von <i>TRPM5</i> und <i>PSA</i> in der Prostata .....	83
5.2	Lokalisation des <i>TRPM5</i> -Ionenkanals in Prostatakarzinom-Zellen .....	86
5.3	Einfluss von <i>TRPM5</i> auf die <i>PSA</i> -Sekretion in der Prostata .....	87
5.3.1	Erste Versuchsreihe .....	88
5.3.2	Zweite Versuchsreihe .....	89
5.3.3	Mittelwert beider Versuchsreihen .....	90
5.3.4	Standardabweichung .....	92
5.3.5	Doppelseitiger t-Test .....	94
5.4	Gewonnene Erkenntnisse .....	96
5.4.1	Expressionsnachweis von <i>TRPM5</i> , <i>PSA</i> und <i>hK2</i> in LNCaP-Zellen .....	96
5.4.2	<i>TRPM5</i> befindet sich in der äußeren Zellmembran .....	96
5.4.3	<i>PSA</i> -Sekretion ist in LNCaP-Zellen abhängig von der DHT-Stimulation .....	97
5.4.4	<i>TRPM5</i> beeinflusst wahrscheinlich die <i>PSA</i> -Sekretion .....	98
5.5	Schlussfolgerungen .....	99
5.5.1	Wiederholung der DHT-Stimulationsversuche zu relevanten Zeitpunkten und gemeinsame Betrachtung mehrerer Tumormarker .....	99
5.5.2	Elektrophysiologische Untersuchungen von <i>TRPM5</i> in der Prostata .....	102
5.5.3	Möglicher Wirkmechanismus von <i>TRPM5</i> und <i>TRPM4</i> für die <i>PSA</i> -Sekretion in der Prostata .....	104

5.5.4	Untersuchung weiterer potentieller Funktionen von TRPM5 in der Prostata .....	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>129</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AR	Androgen-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-R.	ATP-Rezeptor
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cADPR	zyklische ADP-Ribose (engl. <i>Cyclic ADP-ribose</i> )
CAN	engl. <i>calcium activated non-selective monovalent cation</i> -Kanäle
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
cLSM	Konfokales Laserscan-Mikroskop (engl. <i>confocal laser scanning microscope</i> )
cm	Zentimeter
COPD	Chronisch Obstruktiven Atemwegserkrankung
CP	engl. <i>crossing point</i>
c-terminal	carboxyterminal (Ende der Peptidkette mit freier Carboxylgruppe)
DAG	Diacylglycerin
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DRU	Digitale rektale Untersuchung
DPBS	<i>Dulbecco's</i> Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> )
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et altera</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FDA	engl. <i>US Food and Drug Administration</i>
fPSA	freies PSA
fT3	freies Triiodthyronin
fT4	freies Thyroxin
g	Gramm; bei Zentrifugation: Erdbeschleunigung
G-418	Geneticin
eGFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
GH	Somatotropin (engl. <i>growth hormone</i> )
GLUT2	Glukosetransporter 2
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i> )
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hK2	Humanes Kallikrein 2
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O bidest.	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> -R.	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>ATP</sub>	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kb	Kilobasenpaar(e) = 1000 bp
kDA	KiloDalton = 1000 Dalton
lat.	lateinisch
M	Molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i> )
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murines Leukämievirus (engl. <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> )
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Mucin 5AC	MUC5AC
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAADP	Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher (engl. <i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger</i> )
nm	Nanometer
n-terminal	aminoterminal (Ende der Peptidkette mit freier Aminogruppe)
OD	optische Dichte
p. A.	analysenrein (lat. <i>pro analysi</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLCβ2	Phospholipase C β2
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PCA3	Prostatakarzinom-Gen 3 (engl. <i>Prostate Cancer Gene 3</i> )
PS	Penicillin-Streptomycin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen (hK3)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur; bei PCR: Reverse Transkriptase
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>



TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	engl. <i>transient receptor potential</i> -Ionenkanäle
TRUS	Transrektaler Ultraschall
U	Unit(s)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VDCC	spannungsabhängiger Calciumkanal (engl. <i>voltage-dependent calcium channel</i> )
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Übersicht über die Ergebnisse aus der Quantitativen Echtzeit-PCR von <i>PSA</i> und <i>hK2</i> .....	71
Tabelle 4.2: Doppelseitiger t-Test mit den Mittelwerten der <i>PSA</i> -Konzentrationen der LNCaP-Zellen.....	82
Tabelle 5.1: Expression von TRPM5-long, TRPM-short, <i>PSA</i> und <i>hK2</i> im Prostatakarzinom .....	85

## Bildverzeichnis

Abbildung 2.1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP Superfamilie.....	14
Abbildung 2.2: Allgemeiner Aufbau der membranüberspannenden TRP-Kanäle.....	15
Abbildung 2.3: Öffnungsmechanismus mechanosensitiver TRP-Kanäle über eine Signalkaskade. ....	19
Abbildung 2.4: Gewebespezifische mRNA-Expression von <i>TRPM5</i> . ....	22
Abbildung 2.5: Signaltransduktion der Wahrnehmung von bitter, süß und umami über TRPM5. ....	24
Abbildung 2.6: Signaltransduktionsweg der Insulinsekretion. ....	28
Abbildung 2.7: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischer Hautkrebs). ....	31
Abbildung 3.1: Beispiel für eine spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	40
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese. ....	41
Abbildung 3.3: Schritte der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA-Proben. ....	42
Abbildung 3.4: Vervielfältigungs-Plot einer quantitativen Echtzeit-PCR.....	45
Abbildung 3.5: Vektorkarte des im Konstrukt verwendeten pcDNA3-Plasmids. ....	47
Abbildung 3.6: Aufbau der kodierten Proteine der drei Plasmidkonstrukte PLE, PSE und PE. ....	48
Abbildung 3.7: Selektionierung mit Geneticin (G-418). ....	53
Abbildung 4.1: Auszug der <i>TRPM5</i> -Gensequenz zwischen Exon 16 und Exon 19...	66
Abbildung 4.2: Lange Spleißvariante von TRPM5. ....	67
Abbildung 4.3: Kurze Spleißvariante von TRPM5. ....	68
Abbildung 4.4: cDNA-Sequenz von <i>PSA</i> mit den Bindestellen der Primer-Paare. ....	69
Abbildung 4.5: Abbildung 4.5: <i>PSA</i> mithilfe der Primer <i>KLK3_F</i> und <i>KLK3_R</i> .....	69
Abbildung 4.6: Stabil transfizierte LNCaP-Zellen mit den Plasmidkonstrukten PLE, PSE und PE.....	74
Abbildung 4.7: Stabil transfizierte BM1604-Zellen mit den Plasmidkonstrukten PLE, PSE und PE.....	75
Abbildung 4.8: Erste Versuchsreihe zur Bestimmung der PSA-Mittelwerte in LNCaP-Zellen mit und ohne Stimulation durch 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron. ....	77
Abbildung 4.9: Zweite Versuchsreihe zur Bestimmung der PSA-Mittelwerte in LNCaP-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation sowie ohne Stimulation der Zellen. ....	79
Abbildung 4.10: Berechnete PSA-Mittelwerte der LNCaP-Zellen aus den beiden Versuchsreihen. ....	81
Abbildung 5.1: Modell zur physiologischen Funktion von TRPM4 und TRPM5 in der Prostata auf Grundlage eines Protonengradienten.....	107
Abbildung 5.2: Modell zur physiologischen Funktion von TRPM4 und TRPM5 in der Prostata auf Grundlage einer Depolarisation der Zellmembran.....	109

# 1 Ziel der Dissertation

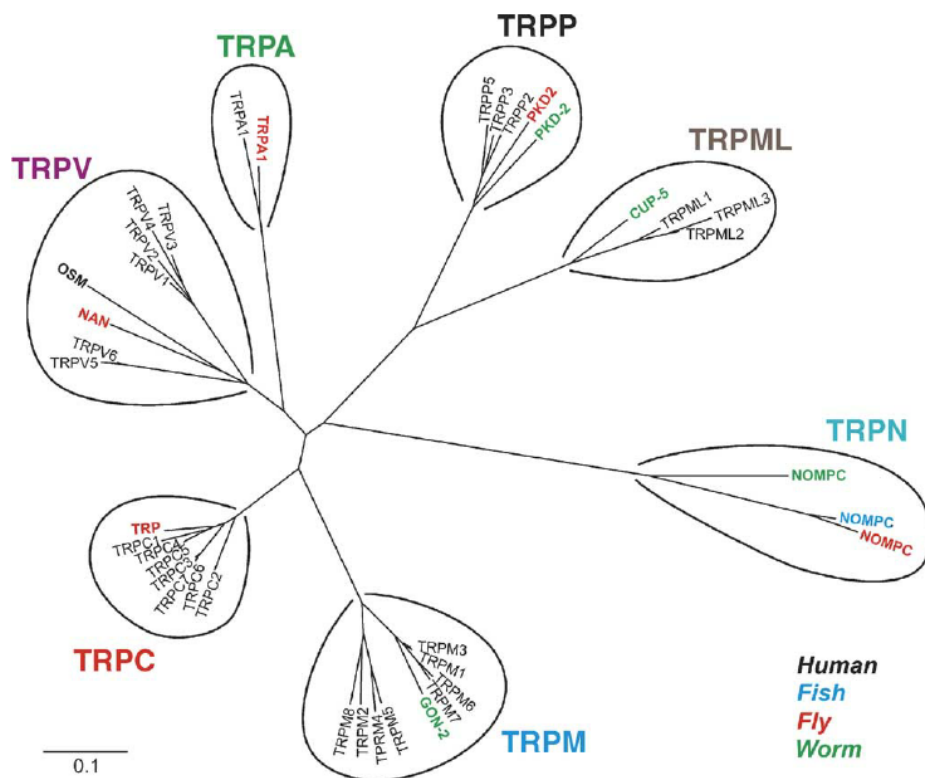
Ziel der Dissertation war es, herauszufinden, ob TRPM5 bei der PSA-Sekretion in der Prostata eine physiologische Funktion übernimmt. Sollte dies der Fall sein, war es zudem von Interesse, inwiefern der funktionelle TRPM5-Ionenkanal in der Signalkaskade hierfür involviert ist und ob er die Freisetzung des Tumormarkers aus den Prostataepithelzellen modifiziert. Diese Fragestellung entstand daher, da TRPM5 bekanntermaßen bei weiteren Sekretionsprozessen beteiligt ist. So modifiziert er beispielweise die Freisetzung des  $\beta$ -pankreatischen Insulins sowie des Gelbildners Mucin im Verdauungs- und Respirationstrakt. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen beiden, indem drei verschiedene Zelllinien aus dem Prostatakarzinom mit TRPM5 stabil transfiziert wurden. Vor diesem Schritt wurde mittels PCR überprüft, ob sowohl *TRPM5* als auch *PSA* in den untersuchten Zellen exprimiert wird. Denn nur wenn dies der Fall ist, kann der physiologische Zusammenhang beider analysiert werden. PSA ist ein Serummarker für die Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms. Seine Verwendung hierfür ist allerdings umstritten, da er zwar organspezifisch, nicht aber spezifisch für das Prostatakarzinom ist. Somit ist es von Interesse, weitere Tumormarker zu finden, um damit die Diagnostik des Prostatakarzinoms eventuell zu optimieren. Aus diesem Grund wurde die Expressionsstärke von *PSA* sowie *hK2*, ebenfalls ein Tumormarker für das Prostatakarzinom, mittels quantitativer Echtzeit-PCR überprüft. Zudem wurden die nativen sowie die stabil transfizierten Zellen mit dem Steroidhormon DHT stimuliert. Dies sollte die Zellen zur PSA-Sekretion anregen. Falls es einen physiologischen Zusammenhang zwischen dem TRPM5-Ionenkanal und der Sekretion von PSA geben sollte, war zu erwarten, dass die Zellen, welche den funktionellen Ionenkanal überexprimieren, höhere PSA-Konzentrationen aufweisen als die nativen Zellen, welche lediglich das endogen vorhandene TRPM5 exprimieren.

## 2 Literaturdiskussion

Damit ein Organismus adäquat auf Reize in seiner Umwelt reagieren, Signale innerhalb der Zelle verarbeiten und zwischen Zellen kommunizieren kann, ist ein selektiver Transport nötig, der Stoffe aus der Zelle heraus beziehungsweise hinein leitet. Transportproteine sind hierbei von grundlegender Bedeutung. Sie überspannen die Plasmamembran und ermöglichen, dass größere oder hydrophile Substanzen die Zellmembran passieren. Zusätzlich kommen Transportproteine in der Membran von Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor und dienen dort dem selektiven Stofftransport zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Zu den Transportproteinen gehören eine Vielzahl verschiedenster Ionenkanäle, die sich in der Regel in Folge eines extra- oder intrazellulären Stimulus öffnen oder schließen. Sie lassen sich anhand ihres Aufbaus oder ihrer Funktion in verschiedene Superfamilien einteilen.

Eine dieser Superfamilien bilden die *transient receptor potential*-Ionenkanäle (TRP). Basierend auf der Homologie ihrer Aminosäuresequenz werden sie in sieben Subfamilien eingeteilt: TRPC („*canonical*“), TRPV („*vanilloid*“), TRPM („*melastatin*“), TRPA („*ankyrin*“), TRPN („*NOMPC, no mechanopotential*“), TRPML („*mucolipin*“) und TRPP („*polycystin*“) (Montell, 2001; Montell *et al.*, 2002; Clapham *et al.*, 2003a). Mit der Ausnahme von TRPN finden sich alle dieser Klassen bei Säugetieren (Clapham, 2003b; Montell *et al.*, 2005), weshalb die phylogenetische Distanz der TRPN-Ionenkanäle zu den anderen Subfamilien am größten ist (siehe Abbildung 2.1). Kodiert werden die TRP-Ionenkanäle durch mehr als 30 Gene (Clapham *et al.*, 2003a).

Der molekulare Aufbau der TRP Superfamilie ist durch bestimmte charakteristische Merkmale gekennzeichnet (siehe Abbildung 2.2): Um einen funktionsfähigen TRP-Ionenkanal auszubilden, lagern sich die Proteine zu Homo- beziehungsweise Heterotetrameren zusammen (Clapham, 2003b; Ramsey *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). Hierbei scheinen eine C-terminal gelegene *coiled coil*-Region, sowie die TRP-Domäne und die Ankyrin-Repeats von Bedeutung zu sein, die eine Assemblierung der Untereinheiten zu Tetrameren ermöglichen (Fleig und Penner, 2004; Rohaces *et al.*, 2005; Gaudet, 2008, 2009).

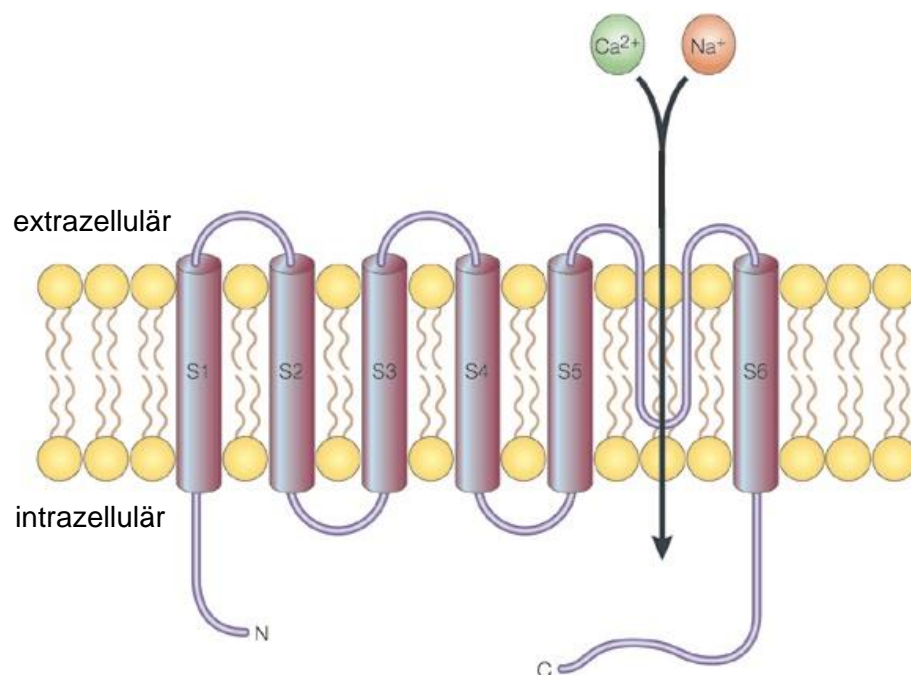


**Abbildung 2.1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP Superfamilie.**

Zu sehen ist die Verwandtschaftsbeziehung zwischen den sieben Subfamilien der TRP-Ionenkanäle. Hierbei stellen die Längen der verbindenden Balken die phylogenetische Distanz zwischen den verschiedenen Subfamilien dar. Für die Erstellung des Stammbaumes wurden die entsprechenden Gene in verschiedenen Organismen betrachtet (Mensch, Fisch, Fliege, Wurm) und deren Sequenz miteinander verglichen (Pedersen *et al.*, 2005).

Die einzelnen Untereinheiten besitzen sechs Transmembrandomänen (S1–S6), welche die Zellmembran überspannen. Zwischen dem fünften (S5) und sechsten (S6) Segment bildet sich eine Porendomäne, die im Tetramer den selektiven Transport von Kationen ermöglicht (Pedersen *et al.*, 2005; Venkatachalam und Montell, 2007). Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende befinden sich intrazellulär, wobei ihre Länge zwischen den Mitgliedern der TRP-Familie variiert. Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die aus ungefähr 25 Aminosäuren bestehende TRP-Domäne, welche C-terminal gelegen ist und sich mit Ausnahme von TRPA1 und TRPP in allen TRP-Genen findet (Clapham, 2003b; Montell, 2005; Ramsey *et al.*, 2006). Diese TRP-Domäne beinhaltet eine TRP-Box 1 (EWKFAR) sowie eine Prolin-reiche TRP-Box 2, welche zwischen verschiedenen TRP-Kanälen variabel sind (Montell, 2005). Für einige Mitglieder der TRP-Ionenkanäle konnte gezeigt werden, dass die TRP-Domäne nicht nur für die Assemblierung zum Tetramer, sondern auch für die Regulation des Kanals sowie für die Bindung des den Ionenkanal regulierenden Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) essentiell ist (Rohaces *et al.*, 2005). Abgesehen von TRPM-, TRPP- und TRPML-Kanälen enthalten alle TRPs mehrere N-terminal gelegene Ankyrin-Repeats (Venkatachalam und Montell, 2007; Nilius und

Owsianik, 2011), wohingegen TRPC-, TRPM- und manche TRPV-Kanäle Prolin-reiche Regionen C-terminal der sechsten Transmembrandomäne aufweisen (Clapham *et al.*, 2003a; Ramsey *et al.*, 2006). Einzelne Ankyrine bestehen aus einem 33 Aminosäuren langen repetitiven Motiv, das kurze und lange Alpha-Helices bildet, die wiederum durch eine kurze Schleife miteinander verbunden sind (Li *et al.*, 2006). Die so entstehenden Ankyrin-Repeats dienen als Proteinwechselwirkungs-Motive, die verschiedene Zellfunktionen, wie beispielsweise Ionentransport, Signaltransduktion, Zytoskelett-Wechselwirkungen und entzündliche Prozesse vermitteln (Mosavi *et al.*, 2004; Gaudet, 2008).



**Abbildung 2.2: Allgemeiner Aufbau der membranüberspannenden TRP-Kanäle.**

Schematisch dargestellt ist die Architektur der TRP-Ionenkanäle, welche mit sechs Transmembrandomänen (S1-S6) die Plasmamembran überspannen. Die Pore wird durch Aminosäuren zwischen S5 und S6 gebildet, über welche die verschiedenen Kationen in die Zelle geleitet werden können. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende befindet sich intrazellulär (nach Clapham *et al.*, 2001).

Alle TRP-Kanäle leiten Kationen und führen bei Aktivierung zur Depolarisation der Zellmembran, wobei sie in der relativen Permeabilität für die verschiedenen Kationen variieren (Nilius und Owsianik, 2011). Mit der Ausnahme von TRPM4 und TRPM5 sind sie alle Calcium-permeabel, weshalb es über die Ionenkanäle vermittelt zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration kommt (Nilius *et al.*, 2005a; Nilius *et al.*, 2005c). Wenn diese auf etwa 100 nM ansteigt, führt dies zu einer Fülle an zellulären Antworten (Wu *et al.*, 2010).

Vor über 30 Jahren wurde das erste Mitglied der TRP Superfamilie in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Montell *et al.*, 1985; Montell *et al.*, 1989). Dort ist der intakte Ionenkanal für das Sehen unabdingbar. In *trp* Mutanten zeigen die Fotorezeptoren bei andauernder Exposition gegenüber hellem Licht ein temporär verringertes Rezeptorpotential. Dabei kommt es durch intensives Licht zur Blendung, da der anhaltende Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den Ionenkanal und die anschließende Ca<sup>2+</sup>-abhängige Adaptation an das Licht gestört sind (Hardie *et al.*, 2001). Neben *trp* vermitteln in *Drosophila* zwei weitere TRP-Ionenkanäle (*trpl* und *trpy*) (Clapham *et al.*, 2003a) das Sehen.

Anhand ihrer Sequenzhomologie lassen sich die sieben Subfamilien der TRP-Ionenkanäle in zwei Großgruppen unterteilen (Fleig und Penner, 2004). Bei der ersten Großgruppe handelt es sich um TRPC, TRPM und TRPV. Sie weisen die höchste Sequenzhomologie zueinander und den zuerst entdeckten TRP-Kanälen auf. Die TRPC („*canonical*“)-Ionenkanäle besitzen sieben verschiedene Mitglieder und zeigen den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den TRP-Kanälen von *Drosophila* auf (Ramsey *et al.*, 2006). Zudem ist TRPC1 das erste Mitglied der TRP-Familie in Säugern, über den bekannt war, dass er einen Ionenkanal ausbildet (Zhu *et al.*, 1996; Zitt *et al.*, 1996). Die Gruppe der TRPM („*melastatin*“)-Ionenkanäle besteht aus acht Mitgliedern, wobei das namensgebende TRPM1 initial während eines Screens von humanen Melanomkorrelierten mRNAs entdeckt wurde. Dabei wies der Ionenkanal in metastasierten Melanomzellen eine verringerte Expression im Vergleich zu nicht-metastasierten Melanomzellen auf (Duncan *et al.*, 1998). Die TRPV („*vanilloid*“) Subfamilie hat sechs Mitglieder, wobei der Vanilloid-Rezeptor (TRPV1) der am besten untersuchte Ionenkanal dieser Klasse ist (Caterina und Julius, 2001). Er wird durch die Vanilloid-Komponente Capsaicin aktiviert (Caterina *et al.*, 1997) und ist für Temperaturen über 43 °C sensitiv. Der Second Messenger PIP<sub>2</sub> moduliert hierbei die Temperatur, ab welcher der Kationenkanal aktiviert wird (Prescott und Julius, 2003). Zudem scheint die TRPV Subfamilie in Zusammenhang mit der Wahrnehmung von Schmerz zu stehen (Ramsey *et al.*, 2006).

Die zweite Großgruppe, welche einen geringeren Verwandtschaftsgrad zur ersten Gruppe aufweist, umfasst TRPP, TRPML, TRPA und TRPN. Die TRPP („*polycystin*“) Subfamilie wurde nach der Erkrankung benannt, welche mit ihren Ionenkanälen assoziiert ist. Die Autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit wird durch Mutationen in *TRPP1* oder *TRPP2* verursacht und führt zu einer Veränderung in der Polarisation und Funktion der Nierenepithelzellen. Mäuse, denen beide Gene fehlen,



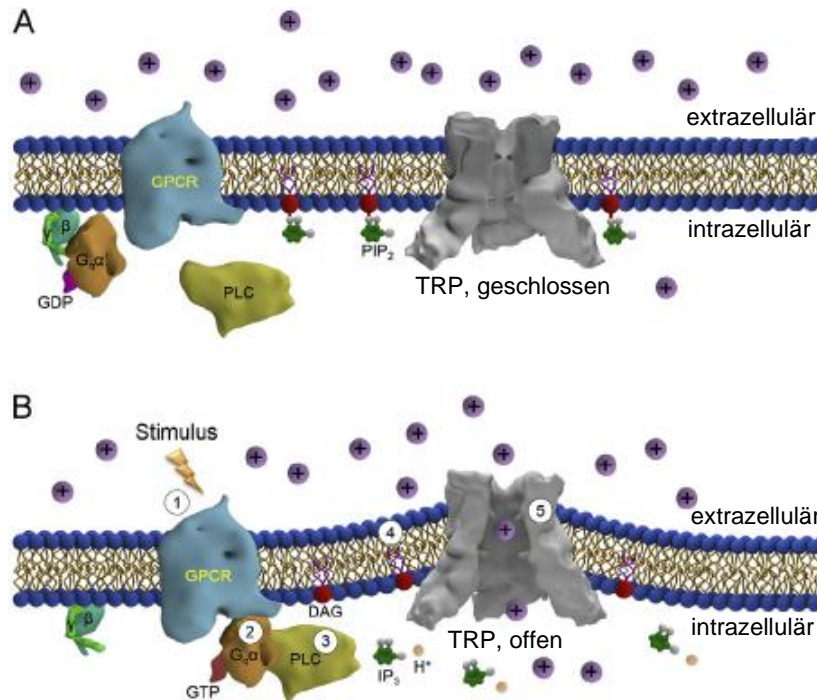
sterben bereits *in utero* mit kardialen Septum-Defekten sowie zystischen Veränderungen in ihren Nephronen und pankreatischen Gängen (Wu *et al.*, 1998; Boulter *et al.*, 2001). TRPML („*mucolipin*“)-Ionenkanäle sind vermutlich auf intrazelluläre Vesikel beschränkt. Mutationen in *TRPM1* verursachen eine neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit, die als Mukolipidose Typ IV bezeichnet wird (Sun *et al.*, 2000). In der TRPA Subfamilie ist bisher nur ein Mitglied bekannt. Dieses wird in nozizeptiven Zellen exprimiert durch starke Kälte aktiviert (Story *et al.*, 2003). Die letzte Gruppe bilden die TRPN („*NOMPC, no mechanopotential*“)-Ionenkanäle. Ihre Expression konnte bisher lediglich im Zebrafisch *Danio rerio*, im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, in der Fliege *Drosophila melanogaster* sowie dem Krallenfrosch *Xenopus* nachgewiesen werden (Pedersen *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass diese Subfamilie in Säugetieren nicht vorkommt (Sidi *et al.*, 2003; Hardie, 2007).

TRP-Ionenkanäle dienen als molekulare Sensoren, welche auf eine Vielzahl an Stimuli aus ihrer Umgebung reagieren. Zu diesen Stimuli zählen Licht (Montell *et al.*, 1989; Hardie *et al.*, 1992), Geruchsstoffe (Liman *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2010), Geschmacksstoffe (Zhang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2010), Säuren (Jordt *et al.*, 2010), akustische Stimuli (Sidi *et al.*, 2003; Kamikouchi *et al.*, 2009), verschiedene Temperaturen (Caterina *et al.*, 1997; McKemy *et al.*, 2002), Schwerkraft (Sun *et al.*, 2009) sowie mechanische Kräfte (Walker *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013). Allerdings vermitteln sie nicht nur die Wahrnehmung verschiedenster äußerer Reize, sondern reagieren auch auf interne Stimuli. Ein Beispiel hierfür ist TRPP2, welches vermutlich den Flüssigkeitsstrom in Nierentubuli wahrnimmt (Nauli *et al.*, 2003). Mutationen in dem dazugehörigen Gen sowie in dem Gen des damit verwandten TRPP1 sind die Hauptursache für die Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (Consortium, 1995; Mochizuki *et al.*, 1996). Auch in weiteren Erkrankungen sind Mutationen in den TRP-Ionenkanälen von Bedeutung. Zu diesen Ionenkanalerkrankungen gehören unter anderem die Fokal Segmentale Glomerulosklerose 2, welche durch eine *TRPC6* Mutation verursacht wird, der Progressive Familiäre Herzblock Typ 1, der aufgrund einer Mutation des *TRPM4*-Ionenkanals entsteht sowie der Amyotrophe Lateralsklerose-Parkinsonismus/-Demenz-Komplex, der wiederum durch Mutationen in *TRPM2* oder *TRPM7* verursacht wird (Wu *et al.*, 2010). In verschiedensten Krebsformen scheinen veränderte Expressionsniveaus von TRP-Kanälen eine Rolle zu spielen. So sind sie unter anderem bei der Entstehung verschiedener Hirntumore (Schonberg *et al.*, 2012),

hämatologischer Malignome (Morelli *et al.*, 2013), maligner Melanome (Duncan *et al.*, 1998; Fang und Setaluri, 2000), von Brustkrebs (Bolanz *et al.*, 2008; Aydar *et al.*, 2009) und Prostata-Karzinomen (Prevarskaya *et al.*, 2007a; van Haute *et al.*, 2010; Gkika und Prevarskaya, 2011) involviert. Die genannten und viele weitere Erkrankungen, welche aufgrund von Mutationen oder Dysregulationen in TRP-Ionenkanälen entstehen, verdeutlichen ihre fundamentale Bedeutung in physiologischen Prozessen verschiedenster Organfunktionen. Somit ist ihre Erforschung grundlegend dafür, die Pathophysiologie der jeweiligen Krankheit zu verstehen, um dazu passende therapeutische Ansätze für ihre Behandlung zu entwickeln.

Hierbei stellt sich die Frage, wie es zum Öffnen des TRP-Ionenkanals als Reaktion auf einen Stimulus aus der Umgebung oder dem Inneren des Organismus kommt. In einer Studie zum Öffnungsmechanismus wurde gezeigt, dass die meisten TRP-Ionenkanäle mechanosensitiv sind. Hierbei werden sie entweder direkt durch mechanische Kräfte von außen geöffnet, ohne eine Signaltransduktionskette zu involvieren. Alternativ hierzu werden sie über mehrere Schritte aktiviert, ohne dass der primäre Stimulus mechanischer Natur ist (Liu und Montell, 2015). Dieser Öffnungsmechanismus ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

Ein Beispiel für einen derartigen mechanischen Öffnungsmechanismus über mehrere Schritte liefert die Fototransduktion in *Drosophila*, bei der ein nicht-mechanischer Stimulus (Licht) eine Signalkaskade triggert. In den Fotorezeptorzellen erfasst das Sehpigment Rhodopsin einzelne Photonen und amplifiziert das Lichtsignal über einen Weg, welcher ein heterotrimeres G-Protein sowie die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) beinhaltet (Montell, 2012; Hardie, 2014). Die aktivierte PLC wiederum spaltet PIP<sub>2</sub>, welche eine Komponente der Plasmamembran ist. Durch die Hydrolyse dieses Phospholipids entstehen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerin (DAG) sowie ein Proton. Die Entfernung der sperrigen Kopfgruppe von PIP<sub>2</sub> verursacht eine Kontraktion der Zellmembran (Hardie und Franze, 2012). Mithilfe dieser fotomechanischen Antwort werden in Folge die TRP- und TRPL-Kanäle in *Drosophila* geöffnet. Prinzipiell hat somit jeder TRP-Kanal, welcher durch eine Signaltransduktionskaskade aktiviert wird, die zur Spaltung von PIP<sub>2</sub> führt oder auf eine andere Weise die Zusammensetzung der Membranlipide ändert, das Potential, mechanosensitiv zu sein. Da die meisten TRP-Kanäle, welche zur TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP und TRPML Subfamilie gehören, über einen Mechanismus aktiviert werden, der eine solche Hydrolyse beinhaltet, sind sie potentielle Kandidaten des beschriebenen Öffnungsmechanismus.



**Abbildung 2.3: Öffnungsmechanismus mechanosensitiver TRP-Kanäle über eine Signalkaskade.**

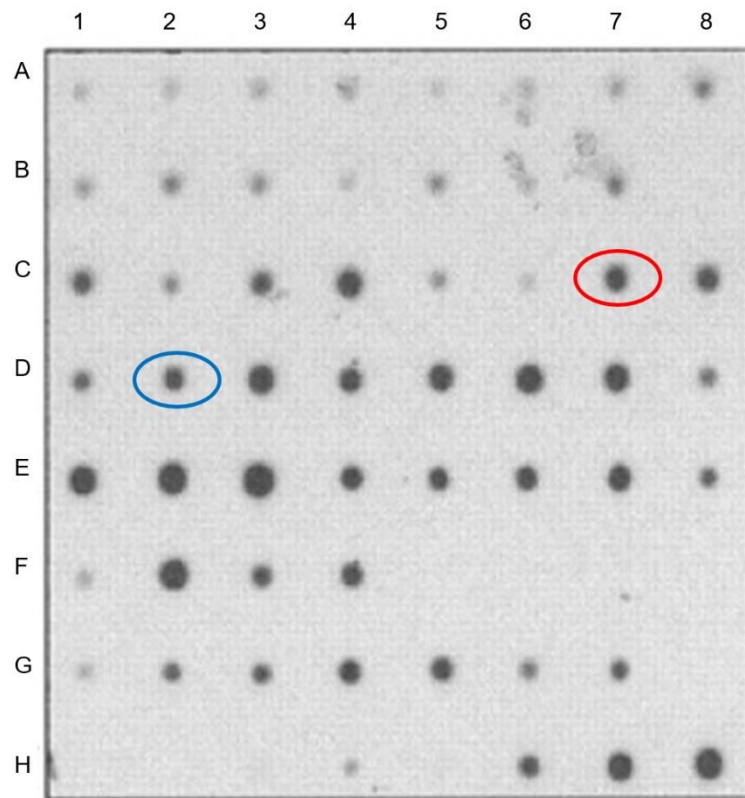
Zu sehen ist das Modell für einen möglichen Mechanismus, wie sich mechanosensitive TRP-Ionenkanäle über mehrere Schritte öffnen. (A) Ohne einen Stimulus ist der TRP-Kanal geschlossen. (B) Durch die Aktivierung einer Signalkaskade wird der TRP-Kanal geöffnet. Ein nicht-mechanischer Stimulus aktiviert den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Das heterotrimere G-Protein ( $G_q$ ) bindet an GPCR, was zum Austausch von GDP durch GTP sowie der Dissoziation der  $\beta\gamma$  von der  $G_q\alpha$  Untereinheit führt. Durch Interaktion mit  $G_q\alpha$ -GTP wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Dies führt zur Hydrolyse von  $PIP_2$ , wodurch  $IP_3$ , DAG und  $H^+$  entstehen. Die Membran dehnt sich durch die Entfernung der Kopfgruppe von  $PIP_2$ . Diese mechanische Kraft öffnet schließlich den TRP-Kanal, was zum Einstrom von Kationen in die Zelle führt (nach Liu und Montell, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde der TRPM5-Ionenkanal in humanen Prostatakarzinom-Zellen untersucht. Er gehört zur TRPM Subfamilie, welche insgesamt acht Mitglieder umfasst und nach dem Transkript des ersten Mitglieds namens *Melastatin* benannt wird. TRPM Proteine besitzen die zuvor beschriebene C-terminale TRP-Domäne, doch ihnen fehlen die Ankyrin-Repeats am N-terminalen Ende. Das N-terminale Ende von TRPM ist deutlich länger als die korrespondierenden Regionen der TRPC und TRPN Mitglieder. Hier befindet sich eine Region aus etwa 700 homologen Aminosäuren, die ausschließlich in der TRPM Subfamilie vorkommt. Die biologische Bedeutung dieser Region ist bisher allerdings unbekannt (Wu *et al.*, 2010). Anhand der Homologie ihrer Aminosäuresequenz lässt sich diese Subfamilie in drei Hauptgruppen einteilen: TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 und TRPM6/TRPM7. Die TRPM2- und TRPM8-Ionenkanäle lassen sich diesen Gruppen nicht zuordnen, da ihre Sequenzhomologie deutlich niedriger ist (Clapham *et al.*, 2003b; Fleig und Penner,

2004). Eine große Besonderheit besitzen die Mitglieder TRPM2, TRPM6 und TRPM7, welche als sogenannte „Chanzymes“ sowohl Eigenschaften von Ionenkanälen (englisch „channels“) als auch von Enzymen (englisch „enzymes“) verkörpern. Ihre Enzymfunktion wird durch eine C-terminal gelegene Aminosäuresequenz ermöglicht, die für die enzymatisch aktive Proteindomäne kodiert (Montell *et al.*, 2002b; Montell, 2005). Während TRPM2 als ADP-Ribose-Pyrophosphatase fungiert (Perraud *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2004), dienen die beiden anderen „Chanzymes“ TRPM6 und TRPM7 als  $\alpha$ -Kinasen (Runnels *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2003). Eine weitere Besonderheit der TRPM Subfamilie lässt sich bei den Mitgliedern TRPM4 und TRPM5 finden. Sie stellen die einzigen Mitglieder der gesamten TRP-Familie dar, die lediglich für monovalente Kationen durchlässig sind (Hofmann *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2003). Demnach sind beide für  $\text{Ca}^{2+}$  impermeabel, werden allerdings durch einen schnellen und starken Anstieg an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (Hofmann *et al.*, 2003; Liu und Liman, 2003; Prawitt *et al.*, 2003). Zudem wird ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Desensibilisierung durch  $\text{PIP}_2$  aufgehoben (Zhang *et al.*, 2005; Nilius *et al.*, 2006). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften werden sie der Gruppe der CAN (engl. *calcium activated non-selective monovalent cation*)-Kanäle zugeordnet. Des Weiteren sind beide präferentiell sensitiv für Temperaturen zwischen 15 °C und 35 °C (Talavera *et al.*, 2005). Während TRPM4 durch intrazelluläres ATP inhibiert wird, fungiert in TRPM5 ein intrazellulär saurer pH-Wert als Inhibitor (Nilius *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). TRPM5 wird schneller aktiviert und inaktiviert als TRPM4. TRPM4 auf der anderen Seite wird durch die Phosphorylierung der Proteinkinase C moduliert, wodurch seine Sensitivität gegenüber intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  verstärkt wird (Nilius *et al.*, 2005a). Trotz ihrer funktionellen Ähnlichkeiten ist die Aminosäuresequenz von TRPM4 und TRPM5 lediglich zu 40 % identisch (Wu *et al.*, 2010).

Entdeckt wurde TRPM5 während der funktionellen Analyse der chromosomalen Region 11p15.5, welche mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und verschiedenen Neoplasien, wie beispielsweise Wilms Tumoren, rhabdoiden Tumoren und Rhabdomyosarkomen, assoziiert ist. Das BWS ist eine genetisch bedingte Wachstumsstörung, die unter anderem durch Makroglossie, Exomphalus, Gigantismus sowie das gehäufte Auftreten maligner Tumore gekennzeichnet ist. Diese initialen Studien definierten die Grundstruktur des *TRPM5* Gens (Prawitt *et al.*, 2000; Enklaar *et al.*, 2000). Das Gen überspannt 24 Exons mit einer Größe von 18,5 kb, wohingegen das dazugehörige Transkript eine Größe von 4,5 kb besitzt. Prawitt *et al.* (2000) zeigten auf, dass vom humanen Transkript zwei verschiedene Spleißvarianten

existieren, wobei das Exon 18 alternativ gespleißt wird. Hierbei enthält die lange Spleißvariante, im Nachfolgenden als TRPM5-long bezeichnet, das Exon 18, sodass das zu kodierende Protein 1165 Aminosäuren lang ist. TRPM5-long besitzt sechs Transmembrandomänen und kann daher den funktionellen Kationenkanal ausbilden. Der kurzen Spleißvariante fehlt das Exon 18, wodurch es zum Einbau eines frühzeitigen Stopp-Codons kommt, und wird im Nachfolgenden TRPM5-short genannt. Durch das frühzeitige Stopp-Codon ist das entsprechende Polypeptid mit 872 Aminosäuren deutlich kürzer. Daher besitzt TRPM5-short nur vier Transmembrandomänen, sodass sich bei dieser Spleißvariante vermutlich kein funktioneller Ionenkanal ausbilden kann. In entsprechenden Untersuchungen in der Maus konnte dagegen lediglich eine Spleißvariante von *Trpm5* ausfindig gemacht werden. Das murine *Trpm5*-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und kodiert für ein 4,4 kb langes Transkript, welches 24 Exons überspannt. Das murine Protein bildet ebenfalls einen funktionstüchtigen Ionenkanal mit sechs Transmembrandomänen aus (Enklaar *et al.*, 2000) und entspricht funktionell somit dem humanen TRPM5-long. Letzteres zeigt eine weit verbreitete Expression in einer Vielzahl von humanen Geweben. Signifikante mRNA Expressionssignale wurden beim Menschen mithilfe des *multiple tissue Northern (MTN) blots* in der adulten Niere, Leber, Herz, Gehirn, Dünndarm, Colon, Lunge, Pankreas, Prostata und glandulären Drüsen detektiert, sowie in der fetalen Niere, Leber, Milz und Thymus (Prawitt *et al.*, 2000) (Abbildung 2.4). In weiteren Studien konnte mithilfe von SYBR Green und TaqMan quantitativen PCR-Analysen eine weit verbreitete mRNA-Expression in humanen Geweben bestätigt werden. Hier zeigte sich die höchste Expression im Darm, Pankreas, Prostata, Niere und Hypophyse. Zudem wurde eine signifikante Expression im Magen, in mononukleären Zellen des peripheren Blutes sowie im Knochenmark aufgezeigt (Fonfria *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Prawitt *et al.* (2000) und Fonfria *et al.* (2006) wurde in einer weiteren Studie mithilfe von Northern Blots lediglich eine mRNA-Expression in der Maus in Geschmackssinneszellen und Geweben von Dünndarm, Magen, Uterus und Hoden nachgewiesen (Pérez *et al.*, 2002).

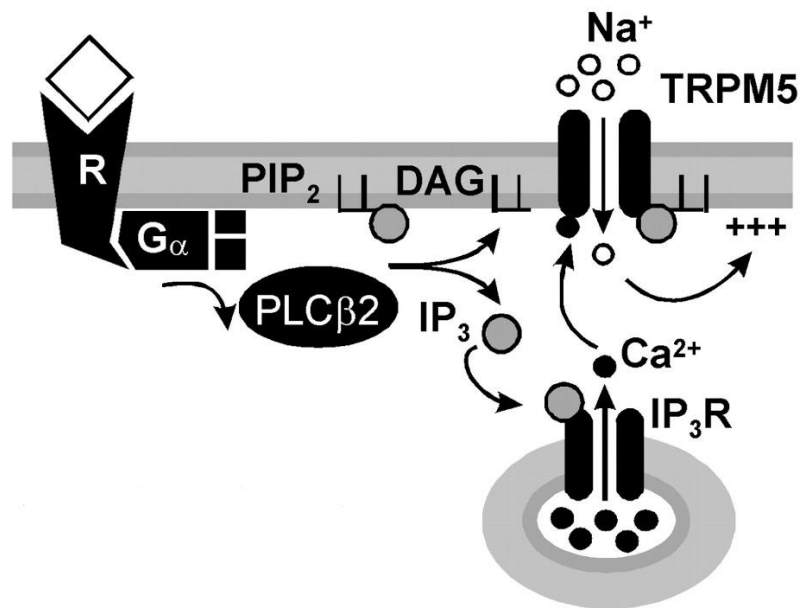


	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Gesamtes Gehirn	Amygdala	Nucleus caudatus	Cerebellum	Cortex cerebri	Frontal-lappen	Hippocampus	Medulla oblongata
B	Occipital-lappen	Putamen	Substantia nigra	Temporal-lappen	Thalamus	Nucleus accumbens	Rückenmark	
C	Herz	Aorta	Skelettmuskel	Colon	Harnblase	Uterus	Prostata	Magen
D	Hoden	Ovar	Pankreas	Hypophyse	Nebenniere	Schilddrüse	Speicheldrüse	Milchdrüse
E	Niere	Leber	Dünndarm	Milz	Thymus	Periphere Leukozyten	Lymphknoten	Knochenmark
F	Appendix	Lunge	Trachea	Plazenta				
G	Fetales Gehirn	Fetales Herz	Fetale Niere	Fetale Leber	Fetale Milz	Fetaler Thymus	Fetale Lunge	
H	Hefe Gesamt-RNA 100 ng	Hefe rRNA 100 ng	<i>E. coli</i> rRNA 100 ng	<i>E. coli</i> DNA 100 ng	Poly r(A) 100 ng	Humane Cot-1 DNA 100 ng	Humane DNA 100 ng	Humane DNA 500 ng

**Abbildung 2.4: Gewebespezifische mRNA-Expression von *TRPM5*.**

Dargestellt sind die Ergebnisse des von Prawitt und Mitarbeitern durchgeführten *multiple tissue Northern (MTN) blots*, welcher zur Detektion der mRNA-Expression von *TRPM5* diente. Rechts dargestellt sind die Bezeichnungen der untersuchten Gewebe, deren entsprechende Hybridisierungsergebnisse links zu sehen sind. Ein starkes Hybridisierungssignal zeigt sich in der adulten Niere (E1), Leber (E2), Dünndarm (E3), Lunge (F2), Pankreas (D3, blau umrandet) und Drüsengewebe (D4-D7) sowie in der fetalen Niere (G3), Milz (G5) und Thymus (G6). In der Prostata (C7, rot umrandet) sieht man im Vergleich zum Pankreas ein eher mittelstarkes Hybridisierungssignal (nach Prawitt *et al.*, 2000).

Nachfolgend zu diesen Expressionsergebnissen wurde die funktionelle Bedeutung von TRPM5 in verschiedenen Geweben untersucht. Zunächst wurde seine Funktion in Zellen, welche Rezeptoren für die Geschmackswahrnehmung der drei Geschmacksrichtungen bitter, süß und umami co-exprimieren, entdeckt (Pérez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Dort kommt der TRPM5-Ionenkanal an der basolateralen Membran der Zellen vor (Zhang *et al.*, 2007; Kaske *et al.*, 2007). In diesen ist er für die Signaltransduktion, welche die Bindung der biochemischen Geschmacksstoffe an ihre Rezeptoren mit einem elektrischen Signal koppelt, unerlässlich (siehe Abbildung 2.5). Zunächst bindet ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR, englisch *G-protein coupled receptor*) Geschmacksstoffe der drei Geschmacksqualitäten, wodurch das G-Protein Gustducin aktiviert wird und dissoziiert (Lindemann, 2001; Margolskee, 2002). Dessen  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit aktivieren die Phospholipase C  $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2), welche den *second messenger* PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub> spaltet (Hwang *et al.*, 1990; Bernhardt *et al.*, 1996; Spielman *et al.*, 1996; Rossler *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999). Das entstandene IP<sub>3</sub> bindet an seinen intrazellulären IP<sub>3</sub>-Rezeptor, wodurch es zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus Speichern des endoplasmatischen Retikulums kommt. Der rasche Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert TRPM5, wodurch es zum Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen und somit zur Depolarisation der Zellmembran kommt (Liu *et al.*, 2003). Folglich wird der Neurotransmitter Adenosintriphosphat (ATP) aus den Zellen sekretiert und das gustatorische Signal über afferente Neuronen an das Zentrale Nervensystem (ZNS) weitergeleitet (Zhang *et al.*, 2007). Somit sind die Membrandepolarisation sowie die ATP-Freisetzung aus der Zelle von einem funktionellen TRPM5-Gen abhängig (Huang und Roper, 2010). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich weniger sensitiv gegenüber den Geschmackswahrnehmungen bitter, süß und umami sind, wobei sie weiterhin die Fähigkeit besitzen, saure und salzige Geschmacksrichtungen wahrzunehmen (Zhang *et al.*, 2003; Damak *et al.*, 2006). In publizierten Studien wurde außerdem aufgedeckt, dass TRPM5 vermutlich auch bei der Signaltransduktion von Fettsäuren und hochsalzigen Geschmacksqualitäten von Bedeutung ist, wobei die Wahrnehmung der hohen Salzkonzentrationen über Zellen vermittelt werden, die normalerweise die Geschmacksqualität bitter vermitteln (Liu *et al.*, 2011; Oka *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013).



**Abbildung 2.5: Signaltransduktion der Wahrnehmung von bitter, süß und umami über TRPM5.**

Zu sehen ist der Signaltransduktionsmechanismus, über welchen die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami vermittelt wird. Nach der Bindung des Geschmacksstoffes an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor wird das G-Protein Gustducin aktiviert. Dieses dissoziiert und aktiviert die Phospholipase C $\beta$ 2. Infolgedessen kommt es zur Hydrolyse von PIP $_2$  zu DAG und IP $_3$ . IP $_3$  wiederum führt zur Freisetzung von Ca $^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und darüber zur Aktivierung von TRPM5. Dies führt zum Einstrom von Na $^{+}$  und darüber zur Depolarisation der Geschmackssinneszelle. Die Depolarisation löst die Sekretion von ATP aus, wodurch das gustatorische Signal über afferente Neuronen zum ZNS weitergeleitet wird (Liu und Liman, 2003).

Neben den genannten Mechanismen bei der Geschmackswahrnehmung sind noch weitere Charakteristika über den Ionenkanal bekannt. TRPM5 ist strukturell dem Kälte-aktivierten TRPM8-Ionenkanal sehr ähnlich und besitzt zudem mit den Hitze-aktivierten TRPV-Kanälen strukturelle Ähnlichkeiten. Dies lässt vermuten, dass die Aktivität des TRPM5-Ionenkanals ebenfalls Temperatur-empfindlich ist. In der Tat fördern warme Temperaturen seine Aktivierung (Talavera *et al.*, 2005). Die extreme Temperaturempfindlichkeit dieser TRP-Kanäle wurde auf ihre geringe Spannungsabhängigkeit zurückgeführt (Nilius *et al.*, 2005b). Dabei wirkt Hitze auf die Ionenkanäle, indem sie den Mittelpunkt zur spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung negative Spannungen für TRPV1 und TRPM5 und positive Spannungen für TRPM8 verschiebt. Dies führt zu entgegengesetzten thermischen Empfindlichkeiten der genannten Kanäle (Voets *et al.*, 2004; Talavera *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu TRPV1 reicht Hitze allein nicht zur Aktivierung von TRPM5 aus, da es auch bei warmen Temperaturen erhöhte Ca $^{2+}$ -Konzentrationen für seine Aktivierung benötigt (Talavera *et al.*, 2005). Die Temperaturempfindlichkeit von TRPM5 führte zu der Frage, ob die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami durch kalte Temperaturen reduziert wird. Elektrophysiologische Aufnahmen aus Mäusen zeigen, dass die Wahrnehmung des süßen Geschmacks hochsensitiv gegenüber Temperaturänderungen ist,



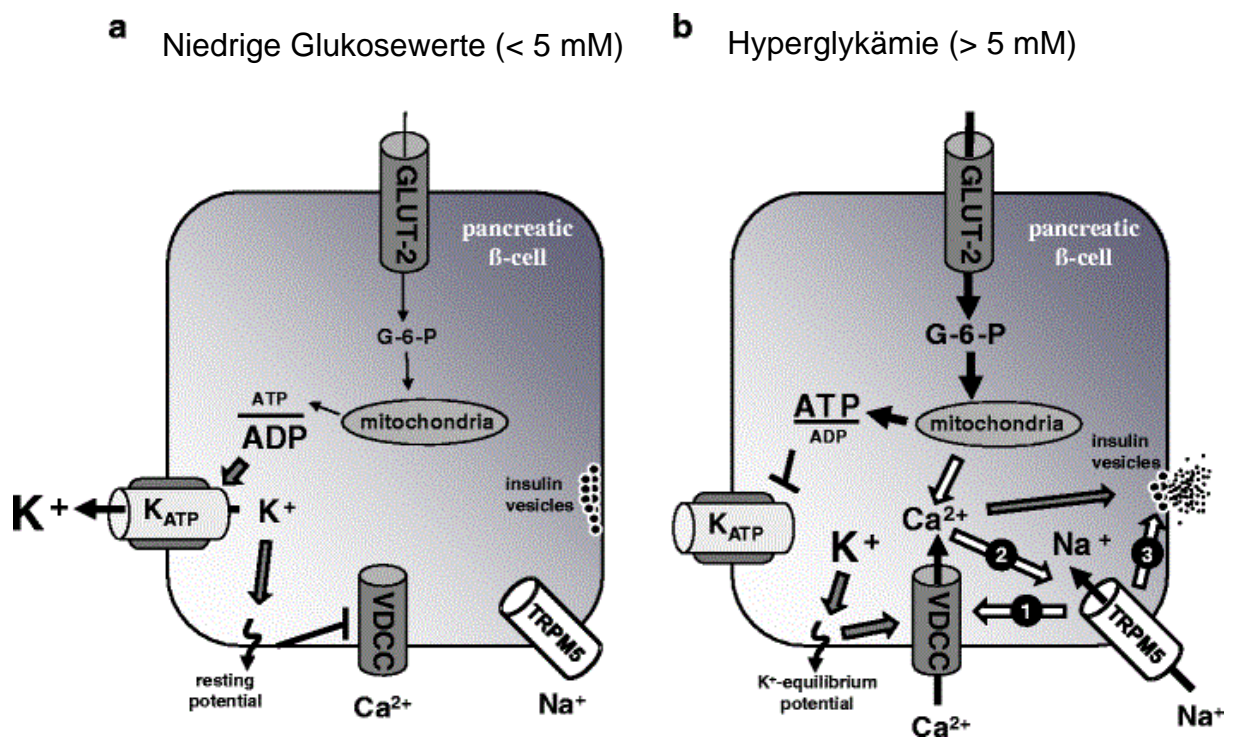
wohingegen die Geschmacksqualitäten bitter und umami nicht beeinflusst werden (Talavera *et al.*, 2005).

Des Weiteren ist TRPM5 für verschiedene Vorgänge im Magen-Darm-Trakt sowie eventuell in den Atemwegen essentiell. Hierzu zählt die TRPM5-abhängige Sekretion von Mucin 5AC (MUC5AC) in den Becherzellen des Colons, welche durch ATP induziert wird (Mitrovic *et al.*, 2013). Der aktivierte TRPM5-Kanal führt über seinen Na<sup>+</sup>-Einstrom dazu, dass der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter (NCX) aufgrund der veränderten intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Antiport in die Zelle transportiert. Dieser extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Einstrom triggert schließlich die Freisetzung des Gelbildenden MUC5AC aus seinen Speichergranula (Mitrovic *et al.*, 2013). Da MUC5AC nicht nur im Gastrointestinaltrakt sondern auch in den Atemwegen die Hauptkomponente des Mucus bildet (Rose und Voynow, 2006), könnte auch in diesen Organsystemen TRPM5 für den Signaltransduktionsmechanismus von Bedeutung sein. Dies könnte für die Behandlung der Chronisch Obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD), des Asthma bronchiale und der Cystischen Fibrose entscheidend sein, da eine gesteigerte Schleimproduktion entscheidend für den Pathomechanismus dieser Erkrankungen ist. Zudem sind Schleim-produzierenden Tumore und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn mit einer gestiegenen beziehungsweise verminderten Mucin-Synthese und -Freisetzung verbunden (Corfield *et al.*, 2001). Innerhalb des respiratorischen und olfaktorischen Epithels wird *TRPM5* in mindestens zwei morphologisch und funktionell unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert. In solitären Chemorezeptoren könnte der TRPM5-Ionenkanal nachfolgend zu aktivierten Rezeptoren, welche bittere Geschmacksstoffe wahrnehmen, dazu dienen, inhalierte Moleküle wahrzunehmen (Lin *et al.*, 2008). Daneben ist bekannt, dass *TRPM5* im Dünndarm und Magen exprimiert wird und hier vermutlich nach der Nahrungsaufnahme eine Rolle in der Chemosensation spielt (Pérez *et al.*, 2002; Kokrashvili *et al.*, 2009). Die Expression wurde in endokrinen Zellen des Duodenums nachgewiesen, welche zudem die endogenen Opioide  $\beta$ -Endorphin und Met-Enkephalin exprimieren.  $\beta$ -Endorphin scheint als Antwort auf hypertonische Stimuli freigesetzt zu werden, wobei diese Freisetzung von einem intakten *TRPM5*-Gen abhängig ist. Allerdings ist der Aktivierungsmechanismus von TRPM5 in diesem Kontext und wie dieser Signalweg bei der Regulation der Verdauungsfunktion mitwirkt, bisher unbekannt. Auch bei der Linolsäure induzierten Freisetzung von Cholezystokinin aus enteroendokrinen Zellen ist der TRPM5-Ionenkanal von Bedeutung (Shah *et al.*, 2011) Cholezystokinin ist ein

Peptidhormon, welches nach seiner Sekretion unter anderem den Gallefluss steigert und die Peristaltik des von Dün- und Dickdarm stimuliert (Romanski und Bochenek, 1983; Bruch *et al.*, 1978).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass *TRPM5* in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert wird (Prawitt *et al.*, 2003; Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Diese Zellpopulation ist verantwortlich für die Synthese und Sekretion des Proteohormons Insulin (Stefan *et al.*, 1982; Rahier *et al.*, 1983; Clark *et al.*, 1988), welches als einziges Hormon in der Lage ist, den Blutglukosespiegel zu senken. Dies geschieht, indem Insulin an Rezeptoren in Muskel-, Fett- und Leberzellen bindet und darüber die Aufnahme, Speicherung und Metabolisierung von Glukose ermöglicht. Doch nicht nur Glukose, sondern auch weitere Nahrungsbestandteile, Hormone und Neurotransmitter können zur Sekretion des Hormons führen (Ahrén *et al.*, 2008; Newsholme *et al.*, 2010). Somit ist Insulin insbesondere für die Homöostase des Glukosespiegels im Blut unerlässlich, was sich an den Erkrankungen Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 widerspiegelt. Diabetes mellitus Typ 1 entsteht aufgrund einer Zerstörung der  $\beta$ -pankreatischen Zellen, die einen absoluten Insulin-Mangel zur Folge hat. Diese immunologische Erkrankung hat meist die Bildung von Autoantikörpern zur Grundlage, welche gegen Insulin selbst oder Komponenten des Glukose-Stoffwechsels gerichtet sind. Diabetes mellitus Typ 2 hingegen ist eine sehr häufige Erkrankung, bei der es aufgrund einer zunehmenden Insulinresistenz zu einem relativen Insulinmangel kommt. Diese Form entsteht unter anderem aufgrund von Bewegungsmangel und Adipositas, hat allerdings auch eine stärkere genetische Assoziation als der Typ 1 (Ozougwu *et al.*, 2013). Obwohl beiden Erkrankungen ein unterschiedlicher Pathomechanismus zugrunde liegt, sind ihre Folgen sehr ähnlich. Im Zentrum steht das gestörte homöostatische Gleichgewicht des Blutglukosespiegels, welches durch massive Blutzuckerentgleisungen gekennzeichnet ist sowie seine weitreichenden Folgen auf das Gefäß- und Organsystem. Somit ist das Verständnis über den Mechanismus, welcher zur Sekretion von Insulin führt, entscheidend für die Entwicklung einer pharmakologischen Therapie dieses Krankheitsbildes. Der Glukose-induzierte Signaltransduktionsweg zur Sekretion von Insulin ist mittlerweile gut verstanden. Hierbei muss man zwischen zwei Wegen unterscheiden, die in Abbildung 2.6 zu sehen sind. Beim sogenannten Hauptweg kommt es zunächst aufgrund von ansteigenden Blutglukosewerten über den GLUT-2 Transporter zur Aufnahme des Kohlenhydrates in die  $\beta$ -pankreatische Zelle. Die intrazelluläre Glukose wird nun zum Energieträger ATP metabolisiert (Cook *et al.*, 1988). Aufgrund des veränderten

ATP/ADP-Verhältnisses schließen sich die ATP-sensitiven  $K^+$  ( $K_{ATP}$ )-Kanäle, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind (Ashcroft *et al.*, 1984; Cook und Hales, 1984). Dies führt zur Membrandepolarisation und in Folge zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCCs, englisch *voltage dependent calcium channels*), sodass es zum Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration kommt (Safayhi *et al.*, 1997). Dies resultiert schließlich in der pulsatilen Freisetzung von Insulin aus seinen Vesikeln, indem diese mit der Membran fusionieren (Gilon *et al.*, 1993; Lang, 1999). Zusätzlich zum bekannten Hauptweg wurde vermutet, dass es einen  $Na^+$ -permeablen Hintergrundstrom geben muss, um die Membrandepolarisation beim Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu verstärken (Ashcroft und Rorsman, 1989). Es wurde ein  $K_{ATP}$ -unabhängiger Nebenweg entdeckt, welcher vermutlich in der zweiten Phase der Glukoseantwort von Bedeutung ist und hier die Effizienz der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Insulinsekretion verstärkt (Henquin, 2000). Die im ATP-Stoffwechsel entstehende zyklische ADP-Ribose (cADPR) sowie das Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) (Ikehata *et al.*, 1998; Yagui *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999) verstärken die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus seinen intrazellulären Speichern. In diesem Zusammenhang fanden zwei unabhängige Arbeitsgruppen heraus, dass das funktionelle TRPM5 für eine effiziente Insulinfreisetzung notwendig ist (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Durch den raschen  $Ca^{2+}$ -Anstieg in den  $\beta$ -Zellen kommt es zur Aktivierung des TRPM5-Ionenkanals. Dies wiederum führt zu einem  $Na^+$ -Einstrom, welcher die Zellmembran weiter depolarisiert und so zu einer optimalen Öffnung der VDCCs führt. Auf diese Weise wird die Sekretion des Insulins feinjustiert. Aber auch über die im Hauptweg geöffneten VDCCs kommt es über den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg direkt zur Aktivierung des TRPM5-Ionenkanals. Des Weiteren verstärkt TRPM5 die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, indem es einen direkten Einfluss auf die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran zu haben scheint. Als Antwort auf die orale oder intraperitoneale Verabreichung von Glukose zeigten *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Mäuse folglich eine reduzierte Insulinsekretion sowie eine reduzierte Glukose-Toleranz im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Somit könnte eine genetische Variation des *TRPM5*-Gens zur Prädisposition beitragen, einen Diabetes mellitus zu entwickeln (Ketterer *et al.*, 2011), weshalb der TRPM5-Ionenkanal einen möglichen Angriffspunkt für die pharmakologische Therapie von Diabetes mellitus darstellt (Liman, 2010; Colsoul *et al.*, 2011).



**Abbildung 2.6: Signaltransduktionsweg der Insulinsekretion.**

Dargestellt ist der Mechanismus innerhalb der Zelle, bei welchem bei niedrigen Blutglukosespiegeln (< 5 mM) die Sekretion von Insulin ausbleibt (a) und es bei Hyperglykämie (> 5 mM) zur Freisetzung von Insulin aus den  $\beta$ -pankreatischen Zellen kommt (b). Im Falle niedriger Glukosespiegel (a) wird keine Glukose in die Zellen aufgenommen. Folglich überwiegt im ATP/ADP-Quotienten das energiearme ADP, was zum Öffnen des  $K_{ATP}$ -Kanals führt. Durch den  $K^+$ -Ausstrom wird das Ruhemembranpotential aufrechterhalten, sodass es nicht zur Aktivierung der VDCC (*Voltage-dependent calcium channel*) und folglich nicht zur Sekretion von Insulin kommt. Bei hohen Blutglukosespiegeln (b) kommt es über GLUT-2 zur Aufnahme von Glukose, welches in der Zelle zu ATP metabolisiert wird. Demnach verschiebt sich der ATP/ADP-Quotient zugunsten von ATP, was wiederum den  $K_{ATP}$ -Kanal schließt. Hierdurch kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, was das Öffnen der VDCCs zur Folge hat. Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom ermöglicht zum einen die initiale Freisetzung von Insulin aus den intrazellulären Vesikeln. Außerdem werden hierdurch TRPM5-Kanäle aktiviert (2), die durch den folgenden  $Na^+$ -Einstrom die Depolarisation der Zelle verstärken. Die VDCCs werden optimal geöffnet (1), sodass eine auf den Stimulus adäquate Menge Insulin aus der Zelle freigesetzt wird. Zudem verstärkt TRPM5 die Insulin-Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, indem es einen direkten Einfluss auf die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran zu haben scheint (3) (Brixel *et al.*, 2010).

Da TRP-Ionenkanäle in verschiedenen Tumorentitäten von Bedeutung sind, könnte dies auch für TRPM5 der Fall sein. Es ist bekannt, dass TRP-Kanäle eine einflussreiche Rolle im Zellzyklus spielen, indem sie die Transkription von Genen sowie andere zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Motilität der Zellen beeinflussen (Pedersen *et al.*, 2005). Oftmals sind veränderte Expressionsniveaus der TRP-Kanäle mit veränderten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegeln und Veränderungen der proliferativen Wege verbunden, was die Apoptose in den betroffenen Zellen fördert oder hemmt (Berridge *et al.*, 2003; Monteith *et al.*, 2007; Roderick und Cook, 2008; Smani *et al.*, 2015). Signaltransduktionswege, welche die Apoptose in Zellen initiieren, beinhalten oft Veränderungen in der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase, die durch zytoplasmatische, ER-vermittelte oder mitochondriale Mechanismen gesteuert werden

(Orrenius *et al.*, 2003; Pinton *et al.*, 2008). Im Gegensatz hierzu beinhalten proliferative Wege oftmals einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Ionenkanäle der Plasmamembran (Berridge *et al.*, 2003; Monteith *et al.*, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2010). Außerdem ist über Tumorzelllinien bekannt, dass sie oft die Empfindlichkeit gegenüber dem Calciumsignal verlieren, wodurch sie unabhängig von externem  $\text{Ca}^{2+}$  für ihre Proliferation sowie ihr Überleben sind (Cook und Lockyer, 2006). Publierte Studien weisen immer mehr Ionenkanäle nach, welche für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus intrazellulären Speichern notwendig sind (Leanza *et al.*, 2013). Hierzu gehören auch TRPM2 und TRPM8, welche beide unter anderem in Prostatakarzinom-Zellen exprimiert werden (Zeng *et al.*, 2010; Bidaux *et al.*, 2012). TRPM8 wurde anfänglich als Prostata-spezifisches Gen kloniert, dessen Expression sowohl bei der Benignen Prostatahyperplasie (BPH) als auch in Prostatakarzinomzellen erhöht ist (Tsavaler *et al.*, 2001). Beide weisen in der Regel hohe Androgen-Spiegel auf. Dagegen reduziert eine Anti-Androgen-Therapie die Expression von *TRPM8* stark (Henshall *et al.*, 2003). Einzelzell RT-PCR und immunohistochemische Untersuchungen, welche an humanen Prostatakarzinom Zellen durchgeführt wurden, zeigen, dass der *TRPM8*-Kanal hauptsächlich in Androgen-abhängigen, apikal gelegenen sekretorischen Epithelzellen exprimiert wird. Zudem ist seine Expression in Zellen, welche die Androgen-Rezeptor Aktivität verloren, herunterreguliert (Bidaux *et al.*, 2005). Zusätzlich zu TRPM8 wurden weitere Mitglieder der TRP-Superfamilie identifiziert, die im Prostatakarzinom von Bedeutung sind. So ist zudem das Expressionsprofil von *TRPV6*, *TRPC6* und *TRPV2* während der Entstehung und der Progression vom Prostatakarzinom verändert (Gkika und Prevarskaya, 2011). Auf der einen Seite besitzt TRPM8 einen protektiven Effekt für die Zellen, indem es zur Apoptose der Zellen führt (Thebault *et al.*, 2005; Prevarskaya *et al.*, 2007b) und die Zellmigration in Androgen-unabhängigen Phase verhindert (Gkika *et al.*, 2010). Auf der anderen Seite ist die erhöhte Expression von *TRPM8* während der Androgen-abhängigen Phase mit einer erhöhten Zellwachstumsrate verbunden (Berges *et al.*, 1995, Kiessling *et al.*, 2003). Auch weitere TRP-Mitglieder verstärken die Progression des Tumors. So führen TRPV6 und TRPC6 zu einer Proliferation der Tumorzellen (Thebault *et al.*, 2006; Lehen'kyi *et al.*, 2007), wohingegen der TRPV2-Ionenkanal die Zellmigration und Invasion der Prostatakarzinom Zellen verstärkt (Monet *et al.*, 2010).

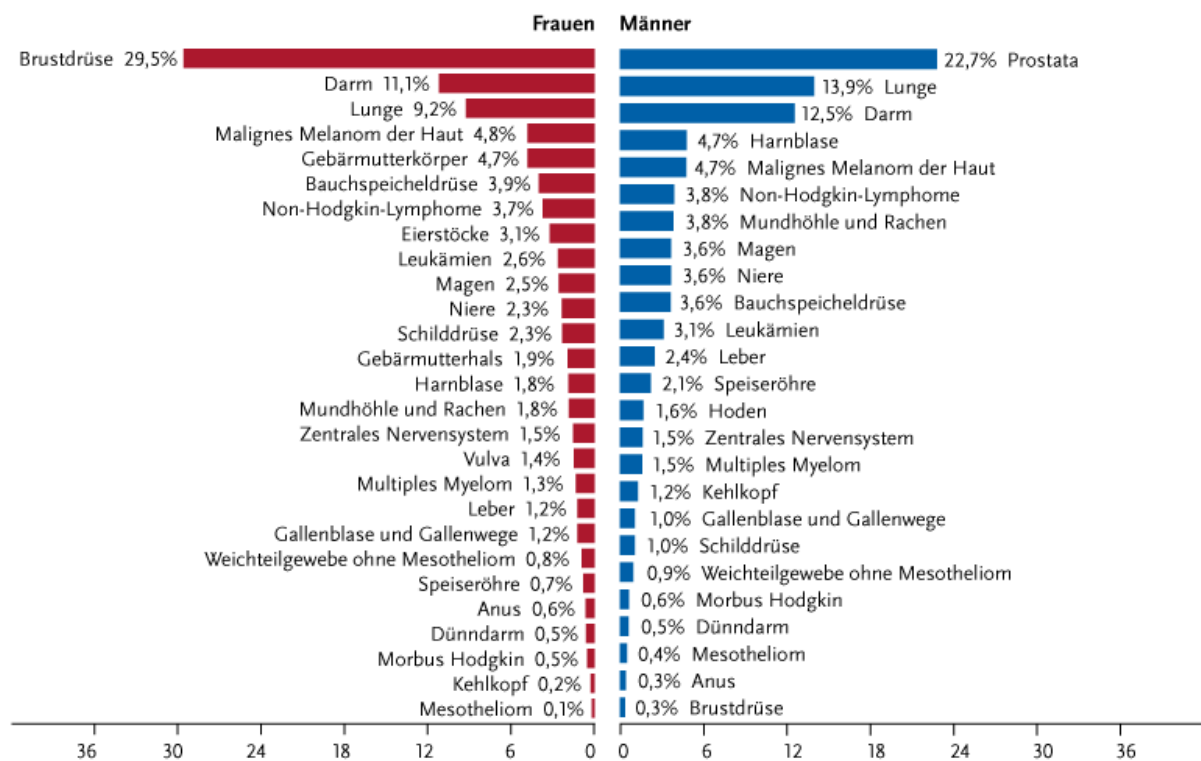
Dies führt zu der Frage, ob es noch weitere Mitglieder der TRP-Superfamilie gibt, welche im Prostatakarinom funktionell von Bedeutung sind und wenn ja, wofür diese benötigt werden.

Neben der funktionellen Beteiligung der Ionenkanäle TRPM2 (Zeng *et al.*, 2010), TRPV1 (Czifra *et al.*, 2009) sowie der langen Spleißvariante von TRPM4 am Prostatakarzinom (Launay *et al.*, 2002; Nilius *et al.*, 2003), gibt es Studien, welche eine Expression von *TRPM5* im Prostatagewebe nachweisen (Prawitt *et al.*, 2000, Fonfria *et al.*, 2006). Eine funktionelle Rolle des Ionenkanals in diesem Gewebe ist somit denkbar. Zudem scheint die Expression des Ionenkanals im Prostatakarzinom vorstellbar, da sich das *TRPM5*-Gen, wie bereits erwähnt, in einer Region befindet, welche mit einer Prädisposition für Neoplasien wie dem Wilms-Tumor, rhabdoiden Tumoren und Rhabdomyosarkomen assoziiert ist (Prawitt *et al.*, 2000). Auch sein nächster Verwandter *TRPM4* wird in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen exprimiert, wo der Kanal für die Migration der Zellen vonnöten ist (Holzmann *et al.*, 2015).

Prostatakrebs ist eine maligne Tumorerkrankung, die vom Drüsengewebe des Organs ausgeht. Es handelt sich um den am häufigsten diagnostizierten nicht-kutanen Krebs bei Männern und ist nach Lungen- und Darmkrebs die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache in Europa (siehe Abbildung 2.7) (Torre *et al.*, 2015; Ferlay *et al.*, 2013). In den USA ist er bei Männern sogar die am zweithäufigsten zum Tode führende Tumorentität (Siegel *et al.*, 2016). Prostatakrebs ist eine Erkrankung des älteren Mannes mit der steilsten Alters-Inzidenz-Kurve aller Krebserkrankungen und nimmt ab etwa 60 Jahren deutlich zu. In Europa werden nur 25 % der Krebserkrankungen vor dem 65. Lebensjahr detektiert (Cuzick *et al.*, 2014). Darüber hinaus nimmt die Zahl der betroffenen Männer rasch zu, da die Population der Männer im Alter von über 50 Jahren weiter ansteigt (van Haute *et al.*, 2010). Daher ist es von überaus großem Interesse, die Ursachen beziehungsweise die Entstehung dieser Erkrankung besser zu verstehen. Nur so kann es gelingen, effektivere therapeutische Methoden zu entwickeln, um das Prostatakarzinom zu therapieren oder sogar zu heilen.

Die Risikofaktoren für Prostatakrebs sind bisher weitgehend ungeklärt. Allerdings beobachtet man eine höhere Inzidenz in der afro-amerikanischen Bevölkerung sowie eine familiäre Häufung, wobei die hieran beteiligten Gene nicht bekannt sind. Zudem scheinen Androgene eine Rolle zu spielen, da es ohne sie nicht zu der Entwicklung des Tumors kommt. Ob die Ernährung einen Einfluss auf die Entwicklung des Prostatakarzinoms hat, ist bisher nicht sicher (Bostwick *et al.*, 2004). Für die Diagnose des Prostatakrebses gibt es in Deutschland gesetzliche Früherkennungsprogramme. Diese werden von den gesetzlichen Krankenkassen einmal jährlich ab 45 Jahren übernommen und beinhalten eine Anamnese, eine Untersuchung der äußeren

Geschlechtsorgane, das Abtasten der inguinalen Lymphknoten sowie eine digital rektale Untersuchung (Internetquelle 1). Eine Bestimmung des Tumormarkers PSA im Blut ist nicht Bestandteil dieses Programmes, da der Nutzen des Screenings bisher nicht zweifelsfrei belegt ist (Kawachi *et al.*, 2010). Dennoch spielt die PSA-Messung in der klinischen Praxis eine entscheidende Rolle. Die gestellte Diagnose wird anschließend durch transrektale Ultraschall-(TRUS)-gesteuerte Biopsien bestätigt, welche nach dem Gleason-Score System in der Pathologie untersucht und bewertet werden (Gleason und Mellinger, 1974; van Haute *et al.*, 2010).



**Abbildung 2.7: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischer Hautkrebs).**

Abgebildet ist die prozentuale Verteilung der häufigsten Tumorentitäten bei Frau (rot) und Mann (blau) in Deutschland. Die häufigste Krebserkrankung der Frau ist der Brustkrebs, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Beim Mann hingegen stellt das Prostatakarzinom die häufigste maligne Neoplasie dar, vor Lungen- und Darmkrebs (Internetquelle 2).

Organbeschränkte Tumore der Prostata können durch eine radikale Prostataektomie oder eine Strahlentherapie geheilt werden. Anders sieht es für metastasierte Erkrankungen aus, bei denen es nur begrenzte Möglichkeiten der Therapie gibt. Hierzu gehören eine hormonelle Behandlung des Tumors sowie die Chemotherapie. Im frühen Stadium hängen das Tumorwachstum und Überleben von Androgenen ab. Daher kann zu diesem Zeitpunkt eine Androgen-Ablationstherapie bei einer Tumorregression wirksam sein (Flourakis und Prevarskaya, 2009). Sie kann durch

chirurgische oder chemische Kastration oder durch die Gabe eines Inhibitors des Androgen-Rezeptors erreicht werden. Die Kastration einer männlichen Ratte führt im Vergleich hierzu zu einem Verlust von bis zu 90 % der gesamten Epithelzellen der Prostata (Kyprianou und Isaacs, 1988). Somit ist laut Huggins und Hodges eine chirurgische Orchidektomie, welche zur Androgen-Ablation führt, eine wirksame und sehr gut reproduzierbare Behandlung für metastasierte Prostatakarzinome (Huggins und Hodges, 1941). Für diese Entdeckung erhielten die beiden Forscher 1966 den Nobelpreis. Unglücklicherweise führt der Entzug von Androgenen nicht dazu, alle Tumorzellen zu zerstören. Somit wird das Wachstum von Zellen, welche unabhängig von den männlichen Sexualhormonen sind, autonom vom hormonellen Status des Patienten, was zu einer Regression des Tumors führt. Auf diese Weise entwickelt sich das Prostatakarzinom während der Hormontherapie zu einem resistenten Phänotyp, welcher für den Patienten tödlich ist (So *et al.*, 2003). Da es in der späten Androgen-unabhängigen Phase derzeit keine erfolgreiche Therapie gibt, ist es aus diesem Grund wichtig zu verstehen, wie es bei der Progression des Prostatakrebses zu einer Androgen-Unabhängigkeit kommt (Flouakis und Prevarskaya, 2009). Diese progressiven Erkrankungen, welche anfänglich als Androgen-unabhängig bezeichnet wurden, werden heute als Kastrations-resistent und nicht vollständig von der Androgen-Achse unabhängig erkannt (Audet-Walsh *et al.*, 2017). Mittlerweile wurden mehrere molekulare Mechanismen in den aggressiven Tumoren beschrieben, welche die Resistenz gegenüber den zirkulierenden Androgenen erklären. Hierzu zählen eine Androgen-Rezeptor (AR) Genamplifikation und Überexpression, Mutationen des AR sowie die erhöhte Expression von Genen, welche an der Androgen-Synthese lokal in den Tumorzellen beteiligt sind (Stanbrough *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2015). In neueren Studien konnte eine transkriptionelle Regulation identifiziert werden, welche die differentielle Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1 und Typ 2 während der Progression des Tumors erklärt. Diese beiden Enzyme katalysieren die Umwandlung des Androgens Testosteron in das potentere 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT). Zudem fanden sie heraus, dass bei der Blockierung der AR-Funktion die Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase beeinträchtigt ist, was wiederum die Aktivität des Androgen-Signalwegs weiter verringert (Audet-Walsh *et al.*, 2017). Somit gibt es erste Ansätze, welche für die Therapie der aggressiven Formen des Prostatakarzinoms von Bedeutung sein könnten.

Auch für die Diagnostik des Prostatakrebses sucht man nach neuen Methoden, welche den Tumor früher und spezifischer identifizieren und so seine Behandlungsmöglich-



keiten und Heilungschancen verbessern. Denn obwohl in den letzten Jahren neuartige Therapien entwickelt wurden (Fong *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013), sind die Zunahmen der Überlebensraten marginal (Saini, 2016). Im Laufe der Jahre wurden viele Marker für die Erkennung und das *Follow-up* vom Prostatakarzinom verwendet. Der am häufigsten genutzte Tumormarker ist das bereits erwähnte Prostata-spezifisches Antigen (PSA), welches zuerst im Jahre 1979 aus dem Seminalplasma isoliert werden konnte (Wang *et al.*, 1979). PSA kommt in normalen Prostata-Sekreten vor und liegt dort in freier (fPSA) und gebundener Form vor, bei der es mit Chymotrypsin oder Makroglobulin komplexiert (Lein, 2003). Im Folgenden wird daher das Gesamt-PSA, welches sich aus der freien und der Protein-gebundenen Form zusammensetzt, mit PSA abgekürzt. Seine physiologische Funktion ist die Verflüssigung des männlichen Ejakulats. Zudem ist PSA an der Auflösung des weiblichen Zervikalschleims beteiligt (Luboldt und Rübben, 2000). Im Seminalplasma finden sich sehr hohe Konzentrationen des Tumormarkers (bis zu 3 mg/ml). Des Weiteren kommt es außerhalb der Prostata in sehr geringen Mengen in weiteren Geweben vor; dort vor allem in den Hoden, den Brustdrüsen, der Gebärmutter, der Lunge, der Schilddrüse sowie den Speicheldrüsen (Yousef und Diamandis, 2001). Stimuliert wird seine Sekretion durch Androgene wie beispielsweise DHT (Arnold *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2007). Da der PSA-Spiegel bei Prostatakrebs-Patienten oft erhöht vorliegt (Lilja *et al.*, 2008), ist PSA sowohl für die Diagnose des Prostatakrebses als auch während der Therapie als Marker für das Ansprechen auf die Behandlung von größter Wichtigkeit (Thompson, 2006). Im Jahr 1994 genehmigte die amerikanische *US Food and Drug Administration* (FDA) die Verwendung des PSA-Tests in Verbindung mit einer digitalen rektalen Untersuchung (DRU), um asymptomatische Männer auf Prostatakrebs zu testen. Ein Blut-PSA-Spiegel höher als 4,0 ng / ml dient dabei als Hinweis für einen möglichen Tumor der Prostata. Während die Inzidenz der Karzinomfindung bei Werten unter 4 ng / ml bei 4 bis 9 % liegt, steigt sie bei Werten von 4 bis 10 ng / ml auf 24 bis 25 % und bei über 10 ng / ml auf Werte zwischen 33 und 42 % (Catalona *et al.*, 1997). Problematisch ist jedoch zum einen, dass auch eine mechanische Beanspruchung der Prostata, beispielsweise durch Sport, Geschlechtsverkehr oder medizinische Eingriffe, zu erhöhten Werten des Tumormarkers führt (Internetquelle 3). Daher resultiert die Nutzung des PSA-Spiegels als alleiniger Marker darin, dass zu viele Biopsien umsonst durchgeführt werden (Kawachi *et al.*, 2010; Welch und Black, 2010). Zum anderen werden andere Prostatakarzinome übersehen, da gerade aggressive Tumore oftmals sogar verminderte PSA-Sekretionen aufweisen (Thompson *et al.*, 2004). Aus diesem

Grund ist ein Grenzwert für PSA, um zwischen benignen und malignen Prostataveränderungen zu unterscheiden, höchst kritisch. Bei jüngeren Männern ist bereits ein niedrigerer PSA-Spiegel als karzinomverdächtig anzusehen als bei älteren Männern, da das Prostatavolumen bei ihnen in der Regel geringer ist. Durch die kombinierte Betrachtung von altersabhängigen PSA-Grenzwerten, der Anstiegsgeschwindigkeit des Tumormarkers, des Anteils des fPSA sowie des Prostatavolumens könnte die Vorhersagegenauigkeit verbessert werden (Kawachi *et al.*, 2010). Weitere Studien haben gezeigt, dass das Niveau des fPSA im Serum als ein genauer Marker für die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) dient, während die Höhe des  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin-PSA-Komplexes Prostatakrebs genauer vorhersagt (Stenman *et al.*, 1991). Allerdings besitzen erhöhte PSA-Spiegel zur Diagnose des Prostatakrebses eine geringe Spezifität (Luboldt und Rübber, 2000). PSA ist zwar ein organspezifischer Tumormarker, allerdings ist er neben der BPH auch bei weiteren Entzündungsprozessen der Prostata wie beispielweise bei Harnwegsinfekten erhöht. Angesichts dessen konzentrieren sich derzeit intensive Forschungen auf die Suche nach alternativen Prostatakrebs-Biomarkern. Hierbei wird der Fokus insbesondere auf solche gelegt, die die Aggressivität der Erkrankung vorhersagen und anhand derer bessere Behandlungsentscheidungen getroffen werden können (Saini, 2016). Von großem Interesse ist hierbei auch, den Signalweg, welcher zur Sekretion des PSA in der Prostata führt, besser zu verstehen, um aus diesem zellulären Mechanismus möglicherweise neue diagnostische oder therapeutische Ansätze abzuleiten).

Für *TRPM5* ist bekannt, dass es in der Prostata exprimiert wird (Prawitt *et al.*, 2000, Fonfria *et al.*, 2006). Zudem wurde seine Funktionen bei der Sekretion von Insulin im Pankreas und von Mucin 5AC im Colon sowie bei der Geschmackswahrnehmung der Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami beschrieben (Brixel *et al.*, 2010; Colsooul *et al.*, 2010; Mitrovic *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Dies führte zur Fragestellung, ob der TRPM5-Ionenkanal in der Prostata ebenfalls die Hormonsekretion reguliert und ob er hier möglicherweise Einfluss auf die Sekretion des Tumormarkers PSA besitzt. Dies sollte in der vorliegenden Dissertation untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 DNA- und RNA-Standardmethoden

##### 3.1.1 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA aus humanen Zellkulturen wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* (Peqlab) verwendet. Hierfür wurden die zuvor in 10 cm Ø Petrischalen als Monolayer wachsenden Zellen direkt in der Schale lysiert. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium abgesaugt und anschließend 800 µl *RNA Lysis Buffer T* gleichmäßig über die Oberfläche der Petrischale pipettiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von den Schalen entfernt, auf eine *DNA-Removing Column* geladen und anschließend zentrifugiert (12000 g, 1 min, RT). Hierdurch konnte der Großteil der vorhandenen DNA an die Säule gebunden werden. Der Säulendurchfluss wurde im Folgenden mit 800 µl 70%-igem Ethanol versetzt und durch Vortexen gemischt. Das Gemisch wurde zum Binden auf die Säule nach und nach (jeweils etwa 600 µl) auf die *Perfect Bind RNA Column* pipettiert und zentrifugiert (10000 g, 1 min, RT). Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Zum Waschen der Säule wurde anschließend 500 µl *RNA Wash Buffer I* hinzugegeben und wieder zentrifugiert (10000 g, 15 sec, RT). Um die gesamte DNA aus dem Extrakt zu entfernen, wurde diese mittels *DNase I* verdaut. Hierfür wurden 73,5 µl *DNase I Digestion Buffer* mit 1,5 µl *RNase-freie DNase I* (20 U / µl) durch Invertieren vorsichtig gemischt und direkt auf die Säule mit der gebundenen RNA pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl *RNA Wash Buffer I* hinzugegeben und für weitere fünf Minuten (RT) inkubiert. Danach wurde nochmals zentrifugiert (10000 g, 15 sec, RT) und der Säulendurchfluss verworfen. In einem weiteren Waschschrift wurden 600 µl *RNA Wash Buffer II* auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (10000 g, 15 sec, RT), wonach der Säulendurchfluss verworfen wurde. Zum Trocknen der Säule wurde die *Perfect Bind RNA Column* ohne Zusatz zentrifugiert (10000 g, 2 min, RT). Im letzten Schritt wurde die RNA mittels 50 µl sterilem RNase-freiem dH<sub>2</sub>O eluiert, welches direkt auf die Matrix der Säule pipettiert und nach ein-minütiger Inkubation zentrifugiert wurde (5000 g, 1 min, RT). Mittels Messung der Konzentration am Nanodrop wurde die isolierte RNA quantifiziert (siehe 3.1.6) und das RNA-Extrakt bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.1.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die aus den humanen Zellen isolierte mRNA wird mithilfe der reversen Transkription in ihre komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, wodurch anschließend das Expressionsniveau gewünschter Gene in diesen Zellen untersucht werden kann.

Die Reaktion der reversen Transkription wird durch die RNA-abhängige M-MLV Reverse Transkriptase katalysiert, welche aus dem murinen Retrovirus *Moloney murine leukemia virus* stammt. Da jede von der RNA-Polymerase II transkribierte mRNA am 3'-Ende polyadenyliert wird, werden für die Synthese der dazugehörigen cDNA Oligo(dT)-Primer verwendet.

Beim Umschreiben der mRNA in cDNA wurden je 3 µg der isolierten RNA in einem 20 µl Ansatz mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O verwendet. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde folgender Ansatz hinzugefügt, sodass jede Probe aus einem Gesamtvolumen von 40 µl bestand:

- 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl)
- 3,5 µl dNTPs (2,5 mM)
- 2 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)
- 8 µl *First strand buffer* (5x)
- 4 µl DTT (0,1 M)
- 1,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die RT<sup>+</sup>-Proben standen hierbei für diejenigen Ansätze, denen bei der reversen Transkription das notwendige Enzym hinzugesetzt wurde, um die RNA in ihre dazugehörige cDNA umzuschreiben. Zusätzlich wurden dieselben Ansätze als RT<sup>-</sup>-Proben durchgeführt, welche anstatt der M-MLV Reverse Transkriptase die entsprechende Menge RNase-freies Wasser enthielt. Diese diente dazu, die isolierten RNA-Proben auf mögliche DNA-Kontaminationen zu untersuchen. Ohne das notwendige Enzym kann die in der Probe vorhandene mRNA nicht in ihre cDNA revers transkribiert werden, weshalb eine vorhandene DNA in diesem Fall für eine Verunreinigung der Probe sprechen würde. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, welcher bei der reversen Transkription anstatt des RNA-Templates lediglich Wasser hinzugegeben wurde. Hierdurch sollte es in der Negativkontrolle zu keiner Synthese der entsprechenden cDNA kommen.

Die Synthese der cDNA erfolgte für 90 min bei 37 °C und wurde daraufhin für 10 min bei 90 °C abgestoppt. Nach Beendigung der reversen Transkription wurden die cDNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Entsprechende

Verdünnungen der cDNA wurden für die Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Mithilfe der sogenannten Maxipräparation können bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen gewonnen werden. Diese wurde in den durchgeführten Versuchen isoliert, um sie für anschließenden Transfektionsversuche zu verwenden. Die Maxipräparation wurde mittels des *Endotoxin-free Plasmid DNA Purification NucleoBond® Maxi Kit* (MACHEREY-NAGEL) durchgeführt.

Zunächst wurde eine 5 ml Übertagkultur angesetzt. Hierfür wurde je ein bakterieller Klon mit enthaltenem Vektor PLE, PSE beziehungsweise PE von einer Agar-Platte mit gewachsenen Bakterienkolonien isoliert und in 5 ml LB-Medium überführt, welches 1% Ampicillin enthält. Diese Kultur wurde für 6–8 h bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 250 ml LB-Medium, welches 1 % Ampicillin enthält, mit 5 ml Übertagkultur angeimpft und wiederum bei 37 °C und 150 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte OD<sub>600</sub> gemessen und das empfohlene Kulturvolumen für die Isolierung der Plasmid-DNA in der Maxipräparation berechnet. Anschließend wurde die Übernachtskultur zentrifugiert (6000 g, 15 min, 4 °C) und das Pellet in 12 ml *RES-EF Puffer* gelöst. Dies wiederum wurde mit 12 ml *LYS-EF Puffer* gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wurde eine Säule samt Filter mit 35 ml *EQU-EF Puffer* äquilibriert. Danach wurde zur Neutralisierung 12 ml *NEU-EF Puffer* zu der Suspension gegeben, mehrfach invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nochmals invertiert und die homogene Suspension auf den *NucleoBond® Xtra Column Filter* pipettiert. Die Säule entleerte sich durch Gravitationskraft. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 10 ml *FIL-EF Puffer* gewaschen, wonach der Säulenfilter verworfen wurde. Daraufhin wurde die Säule mit 90 ml *ENDO-EF Puffer* und anschließend mit 45 ml *WASH-EF Puffer* gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml *ELU-EF Puffer* eluiert. Im folgenden Schritt wurde 10,5 ml Isopropanol hinzugegeben und für 2 min bei RT inkubiert, um die DNA auszufällen. Nun wurde der Kolben aus einer 30 ml Spritze entfernt, der *NucleoBond® Finalizer* an den Ausgang der Spritze festgedreht und das Präzipitat in die Spritze gefüllt. Dann wurde der Kolben wieder vorgeschoben, sodass die Flüssigkeit in ein Auffanggefäß (z. B. 50 ml Falcon) fließen konnte. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen des Präzipitates wurden 5 ml 70%iges Endotoxin-freies Ethanol in die Spritze pipettiert und der Kolben

vorgeschoben. Auch hier wurde der Durchfluss verworfen. Die Filtermembran wurde getrocknet, indem der *NucleoBond® Finalizer* auf Papier gehalten wurde und der Kolben schnell vorgeschoben wurde, sodass Luft durch den *NucleoBond® Finalizer* gelangte. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, bis kein Ethanol mehr vom *NucleoBond® Finalizer* entwich. Zur Eluierung der DNA wurde der *NucleoBond® Finalizer* von der 30 ml Spritze entfernt und auf eine 1 ml Spritze befestigt. Nun wurden 400 µl *TE-EF Puffer* in die 1 ml Spritze pipettiert und der Kolben vorgeschoben, sodass die Plasmid-DNA in ein Eppendorfgefäß eluiert wurde. Um eine maximale Lösung der DNA von der Membran zu gewährleisten, wurde das Eluat nochmals in die 1 ml Spritze gefüllt und der Kolben vorgeschoben. Danach wurde Luft durch die Spritze gedrückt, um möglichst viel Eluat zu gewinnen. Dieser Schritt wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde die Konzentration der Plasmid-DNA am Nanodrop bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.1.4 Verdau der Plasmid-DNA

Um eine stabile Transfektion mit Plasmid-DNA durchführen zu können, muss die ringförmige DNA zunächst linarisiert werden. Der hier durchgeführte Verdau wurde für alle drei Plasmid-Konstrukte (PLE, PSE und PE) mit der *PvuI-HF®* Restriktionsendonuklease aus dem Bakterium *Proteus vulgaris* durchgeführt (siehe Abbildung 3.5). Hierbei entstanden Enden mit 3'-Überhängen, welche auch als *sticky ends* bezeichnet werden.

Für den Verdau wurden jeweils 15 µg Plasmid-DNA sowie 40 U *PvuI* Enzym eingesetzt. Für einen 100 µl Ansatz wurde Folgendes benötigt:

- 15 µg Plasmid-DNA
- 2 µl *PvuI* Enzym (40 U)
- 10 µl Puffer *Cut Smart* (10 x)
- ad 100 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Dieses Reaktionsgemisch wurde für 2,5 h bei 37 °C inkubiert, um das Schneiden der Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease zu gewährleisten. Danach wurden weitere 20 U *PvuI* Enzym hinzugefügt und nochmals für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, um den vollständigen Verdau der DNA sicherzustellen. Anschließend wurde die geschnittene Plasmid-DNA aufgereinigt (siehe 3.1.5), der Erfolg des Verdau mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA spektralphotometrisch gemessen.

### 3.1.5 Aufreinigung von DNA-Proben

Die Aufreinigung verdauter Plasmid-DNA wurde mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) durchgeführt. Für alle Zentrifugationsschritte wurde eine Mikrozentrifuge bei 17900 g und Raumtemperatur (15 °C–25 °C) verwendet. Vor Beginn der DNA-Aufreinigung wurde zum *Puffer PE* Ethanol (96 %–100 %) sowie zum *Puffer PB* der *pH Indikator I* (im Verhältnis 1:250 Volumen) hinzugefügt, sodass der *Puffer PB* bei  $\text{pH} \leq 7,5$  eine gelbe Farbe aufwies.

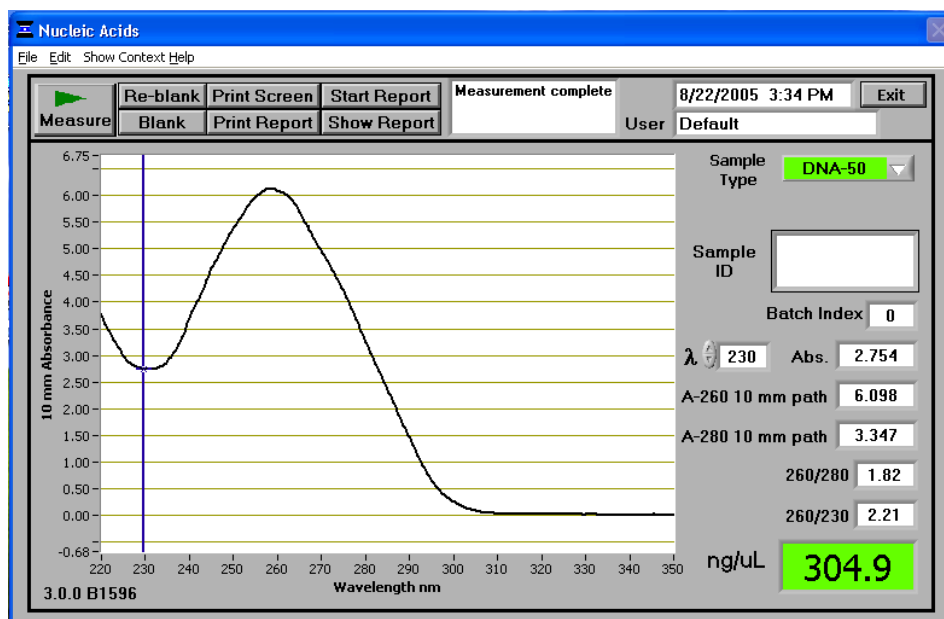
Für die Aufreinigung wurden zunächst 5 Volumenanteile *Puffer PB* zu 1 Volumenanteil Restriktionsansatz mit der enthaltenen Plasmid-DNA gegeben und diese anschließend gründlich gemischt. Das Gemisch sollte hierbei eine gelbe Farbe aufweisen, da für die Aufreinigung ein pH-Wert 7,5 oder niedriger benötigt wurde. Wenn die Probe basischer war, was man an einer orangen bzw. violetten Färbung erkennt, wurden 10  $\mu\text{l}$  Natriumacetat (3 M) hinzugefügt, sodass sich das Gemisch aufgrund des niedrigeren pH-Wertes gelb färbte. Im nächsten Schritt wurde eine *QIAquick Spin Säule* in ein 2 ml Sammelröhrchen platziert. Um die aufzureinigende DNA zu binden, wurde die Probe auf die Säule pipettiert und anschließend für 30–60 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule in dasselbe Röhrchen platziert. Zum Waschen der DNA wurden daraufhin 0,75 ml *Puffer PE* auf die Säule pipettiert und wieder für 30–60 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Säule in dasselbe Röhrchen gesetzt und dieses für weitere 60 sec zentrifugiert. Als nächstes wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugen Röhrchen platziert. Um die Plasmid-DNA zu eluieren, wurden 50  $\mu\text{l}$  *Puffer EB* in die Mitte der Membran pipettiert und anschließend für 60 sec zentrifugiert. Wichtig war bei diesem Schritt, den *Puffer EB* direkt auf die Membran zu verteilen, um die gebundene DNA komplett zu lösen. Um eine höhere DNA-Konzentration zu erzielen, konnte man alternativ lediglich 30  $\mu\text{l}$  *Puffer EB* in die Mitte der Membran pipettieren und anschließend für 60 sec warten, bevor man ebenfalls für 60 sec zentrifugierte. Die aufgereinigte und geschnittene Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die jeweilige Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde spektral-photometrisch über die Optische Dichte (OD) mithilfe des Nanodrop 2000 der Firma PEQLAB bestimmt. Hierfür wurden 1  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe auf den Messsockel, in dem sich ein Glasfaserkabel befindet, pipettiert. Durch

Herunterklappen eines beweglichen Arms wurde das Ende eines weiteren Glasfaserkabels in Kontakt mit der Probe gebracht und damit die Lücke zwischen den Glasfaserkabeln geschlossen. Als Lichtquelle diente eine Xenonblitzlampe. Das die Probe passierende Licht wurde durch das Spektrometer gemessen und daraus die OD sowie die Konzentration der Probe berechnet. Die vorherige Eichung des Nanodrops erfolgte mit 1 µl des entsprechenden Lösungsmittels, damit lediglich die optische Dichte der Nukleinsäure, nicht aber die des Lösungsmittels bestimmt wurde.

Für die Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA wurde die OD bei 260 nm gemessen. Hier liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Basen in den Nukleinsäure-Strängen (siehe Abbildung 3.1). Des Weiteren erfolgte die Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm, da dort das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren liegt. Der anschließend berechnete Quotient aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> gab Aufschluss über die Reinheit der Proben und sollte für reine Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2 liegen. Lag der Wert darunter, sprach dies für eine Proteinverunreinigung.



**Abbildung 3.1: Beispiel für eine spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.**

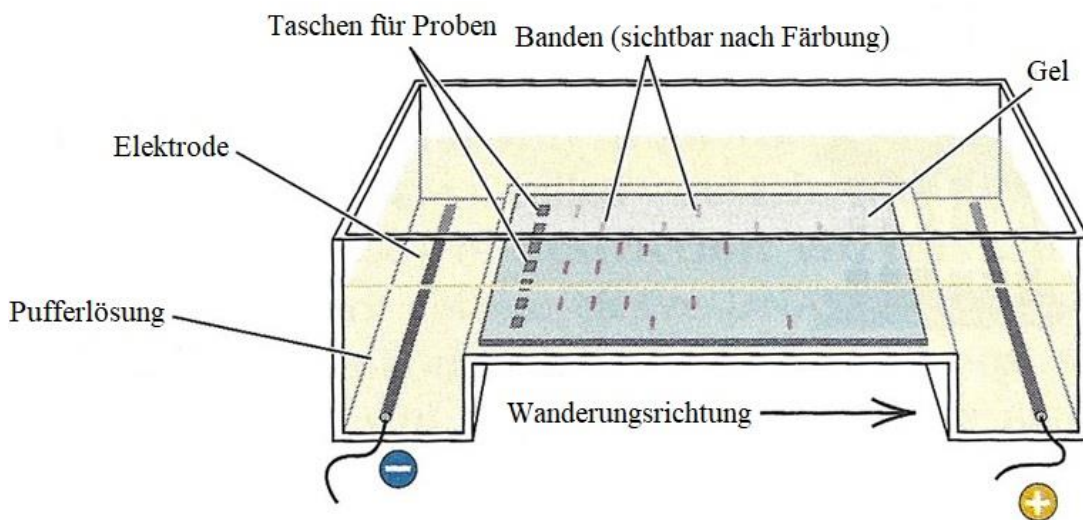
Abgebildet sind die Ergebnisse einer Konzentrationsbestimmung der DNA in ng/µl mit graphischer Darstellung der Absorption der DNA bei einem Wellenlängenbereich zwischen 220 und 350 nm. Hierbei ist das Absorptionsmaximum bei 260 nm deutlich zu sehen (Internetquelle 4).

### 3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Negativ geladene DNA-Moleküle können entsprechend ihrer Größe mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend ihre Größe durch den Vergleich mit DNA-Strängen eines Markers bekannter Größe bestimmt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist hierbei umgekehrt proportional zum



Logarithmus des Molekulargewichts. Die Auftrennung der Nukleinsäuren geschieht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, woraufhin die negativ geladenen Moleküle von der negativ geladenen Anode zur positiv geladenen Kathode wandern (siehe Abbildung 3.2). Dabei wandern kleinere Nukleinsäuren schneller in Richtung Kathode als große, da sie sich leichter durch die Poren des Agarosegels bewegen können. Das Trennverhalten des Gels wird durch dessen Agarosekonzentration bestimmt, da die Poren umso kleiner sind, je größer die Konzentration der Agarose ist. Die jeweils verwendete Konzentration hängt von der zu erwartenden Größe der DNA-Moleküle ab, wobei die hier verwendeten Konzentrationen zwischen 1–2 % lagen. Nach ihrer Auftrennung können die Nukleinsäuren durch das interkalierende Ethidiumbromid und Anregung unter UV-Licht visualisiert werden.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese.**

Dargestellt ist der Aufbau der Agarose-Gelelektrophorese für die Auftrennung von DNA-Proben. Bei dieser Trennmethode wandern die aufzutrennenden DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe von der negativ geladenen Anode zur positiv geladenen Kathode. Nach der Auftrennung werden die DNA-Banden mithilfe von interkalierendem Ethidiumbromid visualisiert (nach Internetquelle 5).

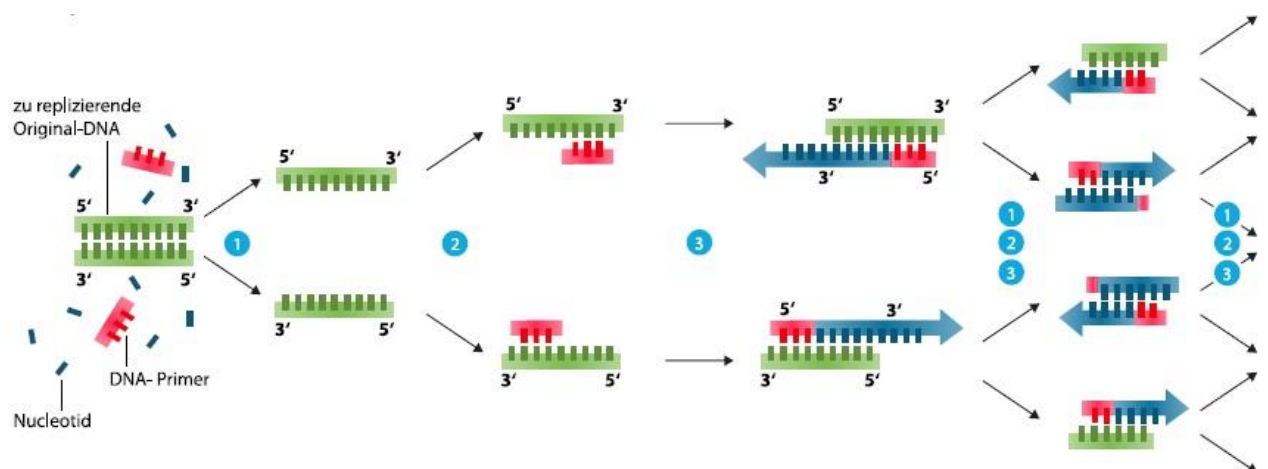
Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarosepulver in 1x TBE-Puffer aufgekocht und in einen Gelschlitten mit Kamm geschüttet (siehe Abbildung 3.2). Durch das Abkühlen entsteht ein Gel mit feinen Poren. Anschließend wurde der Gelschlitten in eine Gelkammer gesetzt, die ebenfalls mit 1x TBE-Puffer gefüllt war. Die aufzutrennenden Proben wurden jeweils mit *Orange-Dye* Ladepuffer versetzt, welcher zur Markierung der Laufmittelfront einen orangenen Farbstoff enthält und dafür sorgt, dass die DNA-Proben in den Taschen verbleiben bevor der Strom fließt. Dieses Gemisch wurde jeweils in die einzelnen Taschen pipettiert. Um die Größen der jeweiligen Proben bestimmen zu können, wurden zudem 3 µl DNA-Größenstandard in

eine weitere Tasche pipettiert. Hierbei wurde je nach erwarteter Größe der aufzutrennenden Proben entweder eine 100 bp DNA-Leiter oder eine 1 kb DNA-Leiter verwendet. Bei der Auftrennung der DNA-Moleküle wurde zunächst eine Spannung von 90 V verwendet, bis die Proben aus der Geltasche gewandert waren und dann die Spannung bis zum Ende der Auftrennung auf 120 V angehoben. Anschließend wurde das Agarosegel für 15 min in frisch angesetztem 2%igem Ethidiumbromid gefärbt, woran sich eine 5-minütige Entfärbung im Wasserbad anschloss. Schließlich wurde das Gel unter UV-Licht visualisiert und mithilfe einer Kamera aufgenommen.

### 3.1.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dazu, gezielt einen Abschnitt doppelsträngiger DNA (dsDNA) in hohem Maße enzymatisch zu vervielfältigen. Die Amplifikation der DNA verläuft in einem sich wiederholenden Zyklus, der sich in folgende Schritte unterteilen lässt und Abbildung 3.3 zu entnehmen ist:

1. Denaturierung
2. Primer-Anlagerung
3. Elongation



**Abbildung 3.3: Schritte der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA-Proben.**

Graphische Darstellung der drei Schritte der Polymerase-Kettenreaktion. Nach Denaturierung (1) der zu replizierenden DNA kommt es zur Anlagerung der spezifischen Primer (2). Daraufhin folgt unter Verbrauch von dNTPs die Elongation (3) des komplementären DNA-Stranges (nach Internetquelle 6).

Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Im nächsten Schritt können sich der genspezifische *Forward* Primer und *Reverse* Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern. Hierfür muss vor der PCR die für die Primer spezifische Schmelztemperatur nach folgender Formel

berechnet werden, die abhängig von der Länge der Primer sowie von ihrem Anteil der einzelnen Nukleotide ist:

$$T_m = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$

Nach Anlagerung der Primer folgt ausgehend vom 3'-OH-Ende mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Elongation, wodurch der komplementäre DNA-Strang synthetisiert wird. Die hitzestabile Taq-Polymerase stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* und besitzt ihr enzymatisches Temperaturoptimum bei 72 °C. Durch Wiederholung dieser drei Schritte kann gezielt ein gewünschter DNA-Abschnitt amplifiziert werden. In jedem Zyklus wird die DNA mit einem empirischen Faktor von 1,6 bis 1,7 vervielfältigt, wobei es jedoch gegen Ende der Reaktion zur Stagnierung der Amplifikation kommt. Dies liegt vermutlich an der sinkenden Zahl der dNTPs in der Lösung und der mit der Zeit abnehmenden Funktionstüchtigkeit der Taq-Polymerase. Im Folgenden ist das verwendete PCR-Programm aufgeführt.

- Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	} 35 Zyklen
- Denaturierung	94 °C	30 sec	
- Primer-Anlagerung	52–66 °C	30 sec	
- Elongation	72 °C	30 sec	
- Finale Elongation	72 °C	7 min	
- Kühlung	4 °C	∞	

Die PCR-Ansätze wurden mit einem Volumen von 50 µl angesetzt:

- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 4 µl dNTPs (10 mM/µl)
- 1 µl *Forward* Primer (10 pM/µl)
- 1 µl *Reverse* Primer (10 pM/µl)
- 1 µl DNA-Probe (10 – 200 ng)
- 1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden anschließend 5 µl der DNA-Amplifikate auf einem Agarosegel aufgetragen und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

### 3.1.9 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht eine Bestimmung des Expressionsniveaus gewünschter Gene in zu untersuchenden Zellen. Bevor diese durchgeführt werden konnte, musste zunächst das gewünschte mRNA-Transkript mittels reverser Transkription in die dazugehörige cDNA umgeschrieben werden (siehe 3.1.2).

Danach wurde die zu untersuchende cDNA-Sequenz mithilfe des Light Cycler® 480 durch die PCR vervielfältigt und unter Verwendung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* quantifiziert. Da mit steigender Konzentration der cDNA auch die Menge des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes steigt, nimmt das Fluoreszenzsignal proportional zum Amplifikat zu. Dieses wurde in jedem Zyklus der PCR gemessen.

Um die Expressionsstärke der untersuchten Gene zu normieren werden zudem sogenannte Haushaltsgene verwendet. Diese gehören zu den konstitutiv exprimierten Genen, welche unabhängig vom Zelltyp, Stadium der Zelle sowie äußeren Einflüssen auf die Zelle exprimiert werden. Daher kann ihr Expressionsniveau zur Normierung der Expressionsstärke anderer Gene verwendet werden. Oftmals codieren Haushaltsgene für Strukturmoleküle oder Enzyme des Intermediärstoffwechsels. Bei den hier verwendeten Haushaltsgenen handelte es sich um  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ 2-Mikrotubulin. Bei  $\beta$ -Aktin handelt es sich um ein Strukturprotein im Zytoskelett, wohingegen  $\beta$ 2-Mikrotubulin als Untereinheit des MHC I-Komplexes in der Antigenpräsentation der Zellen fungiert.

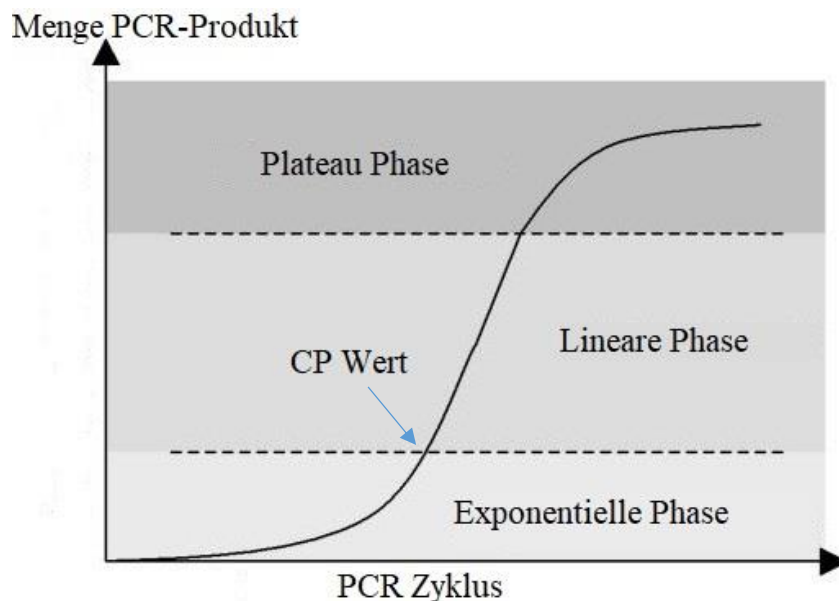
Der *crossing point* (CP) beschreibt den Zyklus, in welchem die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung maximal ist und folglich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt (siehe Abbildung 3.4). Dieser befindet sich kurz vor der exponentiellen Phase der Amplifikation, bei der sich die DNA-Menge optimaler Weise pro Zyklus verdoppelt. Je höher die Ausgangskonzentration der cDNA ist, desto früher wird der CP erreicht, was wiederum für eine stärkere Expression des Gens spricht.

Die Effizienz  $E$  kann mithilfe der Steigung einer Standardkurve berechnet werden, welche als *Slope* bezeichnet wird:

$$E = 10^{-1/Slope}$$

Bei optimalen PCR-Bedingungen liegt der *Slope* bei -3,3, was einer Effizienz von 2 entspricht. Zur Erstellung der Standardkurve wird eine cDNA-Verdünnungsreihe der

entsprechenden Gene verwendet. Nur wenn die zu untersuchenden Proben näherungsweise den Standardkurven zugeordnet werden können und die DNA pro Zyklus annähernd verdoppelt wird, kann eine quantitative Expressionsanalyse angefertigt werden. Der *Error* beschreibt die Abweichung der einzelnen Messpunkte von der Standardkurve und sollte möglichst nah am Wert 0 liegen, da dann die Messwerte gut mit der Standardkurve korrelieren.



**Abbildung 3.4: Vervielfältigungs-Plot einer quantitativen Echtzeit-PCR.**

Abgebildet sind die Ergebnisse einer qPCR, bei der das Fluoreszenzsignal der PCR-Produkte gegen die Anzahl der Zyklen in einer Graphik dargestellt wurden. Derjenige Zyklus, in welchem die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung maximal ist, wird als *crossing point* (CP) bezeichnet. Während der Amplifikation der gewünschten DNA-Probe kann man zwischen einer exponentiellen (hellgrau), einer linearen (grau) und einer Plateau Phase (dunkelgrau) unterscheiden (nach Yuan *et al.*, 2006).

Die Schmelzpunktanalyse, welche abschließend vom Light Cycler® 480 durchgeführt wird, dient zur Überprüfung, ob es sich bei dem PCR-Amplifikat um das Richtige handelt. Hierbei wird diejenige Temperatur ermittelt, bei der sich die cDNA-Doppelstränge durch Erhitzen in ihre beiden Einzelstränge auftrennen. Infolgedessen kommt es zu einer rapiden Abnahme des Fluoreszenzsignals, was ebenfalls mithilfe des Light Cyclers® 480 detektiert wird. Da der Schmelzpunkt von der Länge sowie von der Zusammensetzung der einzelnen Basen in den Desoxyribonukleinsäure-Strängen abhängt, ist er spezifisch für das zu untersuchende Amplifikat. Darüber kann man die einzelnen PCR-Amplifikate miteinander vergleichen und überprüfen, ob es sich bei ihnen um das gleiche Produkt handelt. Zudem kann die Größe des PCR-Produktes durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Zur

Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurden stets 10 µl Ansätze verwendet, welche aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt waren:

- 1 µl cDNA Template
- 0,5 µl *Forward* Primer (10 pM/ µl)
- 0,5 µl *Reverse* Primer (10 pM/ µl)
- 5 µl KAPA SYBR® Fast qPCR Master Mix (KAPA Biosystems)
- ad 10 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Als Templates wurden jeweils 1:20 Verdünnungen der cDNA verwendet. Zur Erstellung der Standardreihen wurden fünf Verdünnungsstufen der entsprechenden cDNA hergestellt (1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80). Diese Ansätze wurden in 96-Well Platten pipettiert, mit selbstklebender Folie bedeckt und kurz anzentrifugiert. Zur Amplifikation wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

- Initiale	95 °C	10 min	
Denaturierung			
- Denaturierung	95 °C	5 sec	} 45 Zyklen
- Primer-Anlagerung	60–62 °C	5 sec	
- Elongation	72 °C	3 sec	
-	95 °C	5 sec	} Schmelzpunktanalyse
-	65 °C	1 min	
-	95 °C		
- Kühlung	40 °C	∞	

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Transformation chemokompetenter Zellen mit Plasmidvektoren

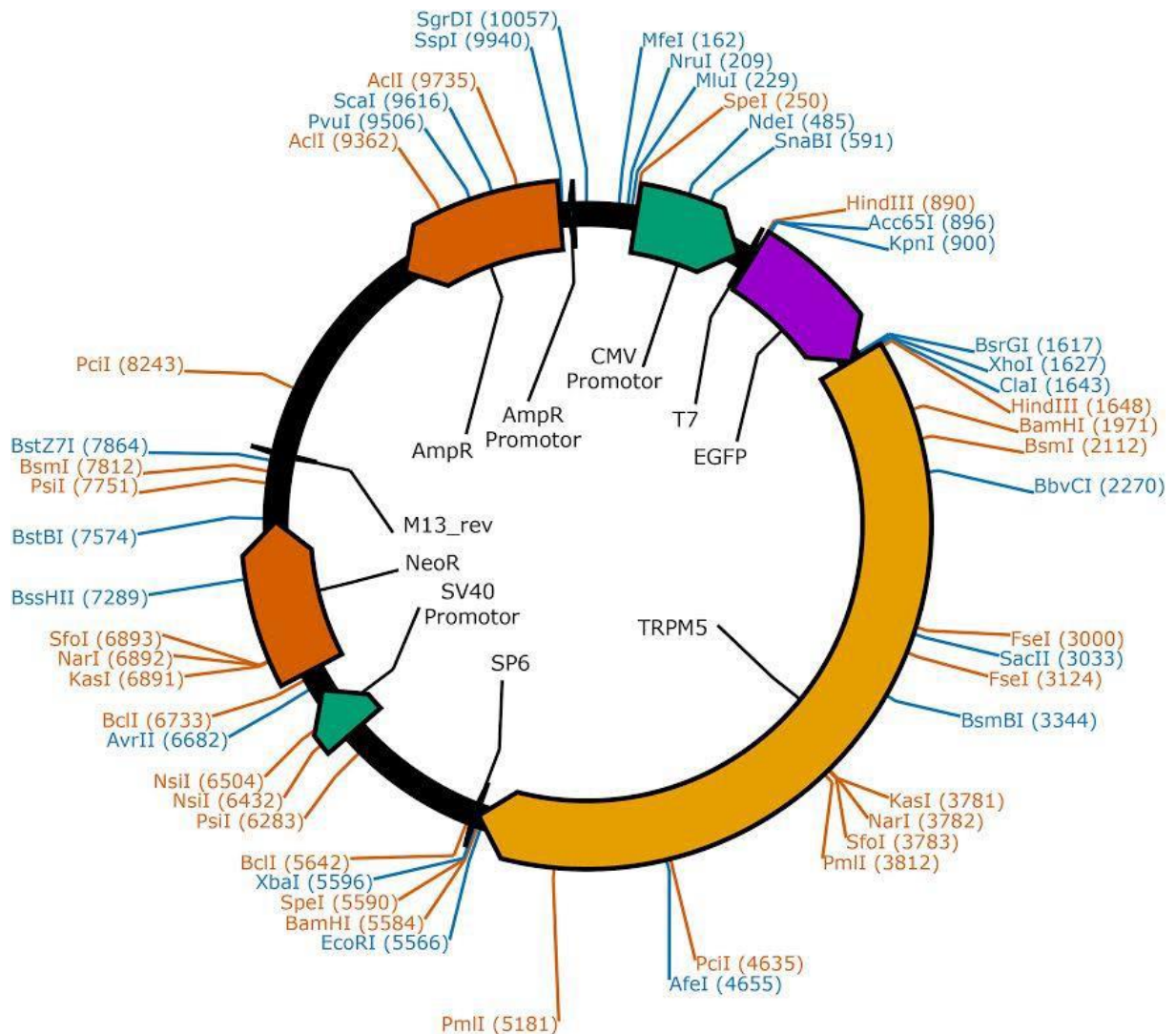
Bei der Transformation werden freie zirkuläre DNA-Moleküle in kompetente Bakterienzellen übertragen, um sie anschließend in diesen zu vervielfältigen. Im nächsten Schritt kann die Plasmid-DNA mithilfe der sogenannten stabilen Transfektion dauerhaft in humane Zellen eingebracht und in ihr Genom integriert werden (siehe 3.3.5).

Zur Durchführung der Transformation wurden chemokompetente *E. coli DH5α* Zellen verwendet. Bei den Plasmiden handelte es sich um drei verschiedene Konstrukte:

- PLE: Plasmid mit dem Gen der langen Spleißvariante von *Trpm5*
- PSE: Plasmid mit dem Gen der kurzen Spleißvariante von *Trpm5*

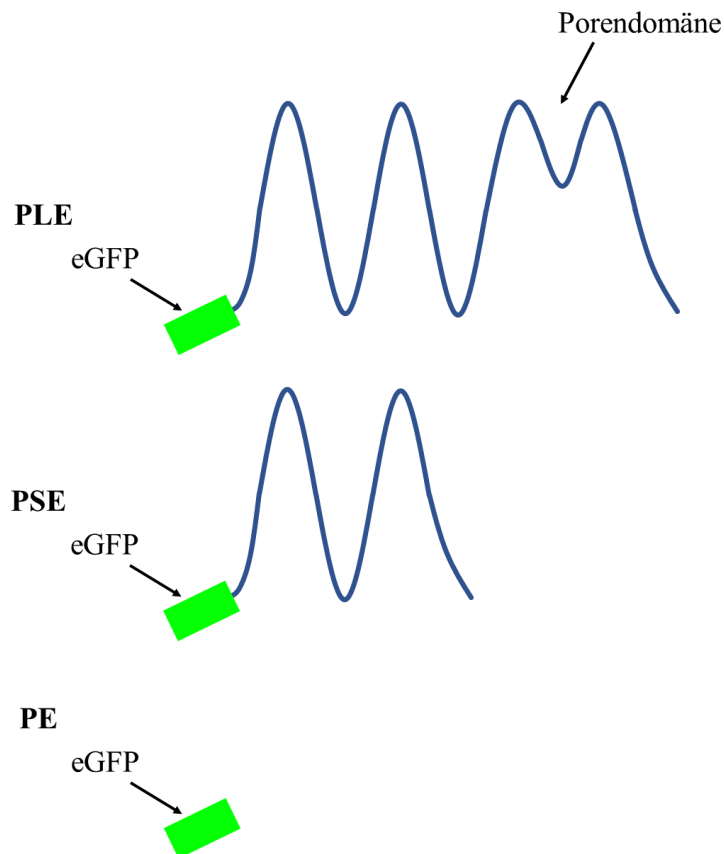
- PE: Plasmid ohne Trpm5, Kontrolle

Alle drei Plasmidkonstrukte enthielten zudem das Gen für das grün fluoreszierende Protein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), um die Lokalisation des Ionenkanals in den humanen Zellen nach der stabilen Transfektion zu visualisieren. Die Vektorkarte des PLE-Konstruktes ist in Abbildung 3.5 zu sehen, wohingegen die kodierten Proteine von PLE, PSE und PE in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt sind.



**Abbildung 3.5: Vektorkarte des im Konstrukt verwendeten pcDNA3-Plasmids.**

Das zur Verfügung gestellte Vektorkonstrukt pcDNA3-TRPM5/EGFP (PLE) besteht aus dem Plasmid pcDNA3 mit den beiden Resistenzgenen AmpR und NeoR (dunkelorange). Das in die MCS klonierte Integrat kodiert für TRPM5 (hellorange), welches N-terminal mit EGFP (violett) verbunden ist. Seine Expression unterliegt der Kontrolle eines CMV-Promotors. Promotoren weisen in der Vektorkarte eine grüne Farbkodierung auf. Vor Durchführung der stabilen Transfektion wurde der Vektor mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI linearisiert, welches im Bereich des AmpR-Gens schneidet. Die Vektorkarte wurde freundlicherweise von W. Jessen zu Verfügung gestellt. Hier nicht dargestellt sind die Vektorkarten von PSE und PE. Anstelle von der langen Isoform von TRPM5 kodiert das in PSE klonierte Integrat für die entsprechende kurze Isoform. PE hingegen enthält nur EGFP als Integrat in der MCS (zur Verfügung gestellt von Dr. Wiebke Jessen (Mainz)).



**Abbildung 3.6: Aufbau der kodierten Proteine der drei Plasmidkonstrukte PLE, PSE und PE.**

Dargestellt sind die kodierten Proteine der drei Plasmidkonstrukte, die für die stabile Transfektion der Prostata-Karzinom Zellen verwendet wurden. Alle drei kodieren für den Fluoreszenzfarbstoff eGFP (grün). Zudem kodiert PLE für die lange Spleißvariante von TRPM5 (blau) und bildet demnach einen funktionellen Ionenkanal mit Porendomäne aus. Das PSE Konstrukt hingegen kodiert für die kurze Spleißvariante von TRPM5 und kann daher vermutlich keinen funktionellen Ionenkanal ausbilden. PE kodiert für keine der beiden Spleißvarianten von TRPM5, sondern lediglich für eGFP.

Zunächst wurden etwa 20 ng des jeweiligen Plasmids in einem Auffanggefäß vorgelegt. Dazu wurden je 50 µl chemokompetente *E. coli DH5α* Zellen (zu Verfügung gestellt von Dr. Wiebke Jessen) pipettiert und das Ganze für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock (42 °C, 50 sec) im Wasserbad, woraufhin für 2 min auf Eis abgekühlt wurde. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Je 100 µl beziehungsweise 350 µl der Ansätze wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die hierfür notwendigen LB-Agar Platten wurden hergestellt, indem zunächst 500 ml LB-Agar bei 40 °C im Wasserbad erwärmt wurde, danach Ampicillin (10 mg/ml) hinzupipettiert und durch Schwenken gemischt wurde. Anschließend wurden Petrischalen zur Hälfte mit dem Medium befüllt, ohne Luftblasen dabei entstehen zu lassen. Nach Aushärtung wurden die LB-Agar Platten bis zur Verwendung für die Transformation im Kühlschrank gelagert.



### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Kultivierung von Zellen

Für die Kultivierung wurden drei humane Prostatakarzinom-Zelllinien verwendet: LNCaP-, BM1604 und PC3-Zellen. Diese wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Für alle drei Zelllinien wurde RPMI-Medium verwendet und dieses mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) versetzt. Das FCS lieferte die für das Wachstum der Zellen notwendigen Wachstumsfaktoren, wohingegen das PS als protektives Antibiotikum eingesetzt wurde, um eine bakterielle Superinfektion zu verhindern. Dem Medium der LNCaP-Zellen wurde zudem 1 % Natriumpyruvat hinzugefügt, wohingegen dem Medium der BM1604- und PC3-Zellen 2,5 % HEPES als weiterer Zusatz diente. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden sie unter der Sterilbank gesplittet. Vor der Passage der Zellen wurden das Kulturmedium sowie das Trypsin für etwa 15 min im Wasserbad bei 35 °C –36 °C erwärmt. Zur Passage der humanen Zellen wurde das entsprechende Zellmedium vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und die an der Zellkulturflasche haftenden Zellen mit 3 ml DPBS gewaschen. Hierfür wurde das Waschmedium hinzupipettiert, vorsichtig geschwenkt und anschließend wieder abgesaugt, sodass tote Zellen und Zelltrümmer entfernt wurden. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurden diese mit 2 ml Trypsin überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 8 ml Kulturmedium hinzugegeben und die Zellen in den insgesamt 10 ml Medium mehrfach und rasch resuspendiert, sodass keine ungelösten Teilchen oder Schlieren aus Zellhaufen mehr zu sehen waren. Zuletzt wurden die Zellen je nach Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 verdünnt. Bis zur nächsten Passage, die etwa 2-mal pro Woche stattfand, wurden die Zellkulturflaschen horizontal im Brutschrank gelagert und das Wachstum der Zellen alle 2 Tage unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Die LNCaP-Zellen wurden alle 2 Passagen, die BM1604- und PC3-Zellen nur etwa alle 6 Passagen in neue Zellkulturflaschen überführt.

#### 3.3.2 Auftauen von kultivierten Zellen

Zur Kultivierung humaner Tumorzellen wurde ein Eppendorfgesäß mit kryokonservierten Zellen einer früheren Passage aus dem Stickstofftank entnommen und diese bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in einen Falcon mit 10 ml vorgewärmten Kulturmedium überführt und zentrifugiert (900 rpm, 10 min, RT).

Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10 ml warmen Kulturmedium resuspendiert. Dieses wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und in insgesamt 15 ml Medium kultiviert. Bei der folgenden Passagierung wurden die gewachsenen Zellen für die weitere Kultivierung in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

### 3.3.3 Einfrieren von kultivierten Zellen

Zum Einfrieren der kultivierten Tumorzellen wurde zunächst das Medium von der 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche abgesaugt und danach 2 ml Trypsin zum Lösen der Zellen hinzupipettiert. Anschließend wurde die Zellkulturflasche für 5 min im Brutschrank inkubiert, um ein vollständiges Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu gewährleisten. Als Nächstes wurde 8 ml Medium hinzugegeben und die Zellen resuspendiert. Das gesamte Medium mit den gelösten Zellen wurde in einen Falcon überführt und zentrifugiert (900 rpm, 10 min, 4 °C). In dieser Zeit wurde das Gefriermedium für die kultivierten Zellen angesetzt. Hierfür wurde Medium mit 10 % DMSO versetzt und dieses durch Vortexen kräftig vermischt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 7 ml Gefriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf 6 Gefäße mit einer Pipette verteilt. Diese Gefäße wurden zunächst für 3–5 Tage bei -80 °C eingefroren und anschließend für die weitere Lagerung in den Stickstofftank überführt. Beim Einfrieren der Zellen war es wichtig, geeignete Aufbewahrungsbehälter zu verwenden, sodass die Gefäße mit den Zellen gleichmäßig und nicht zu schnell auf -80 °C runtergekühlt wurden.

### 3.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die stabile Transfektion sowie die Stimulationsversuche wurden die Zellen einheitlich ausgesät. Hierfür musste zuvor die Zellzahl bestimmt werden. Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurde das Kulturmedium abgesaugt, mit 3 ml DPBS gewaschen und anschließend 2 ml Trypsin hinzugefügt. Nach 5 min Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche, sodass sie nach Zugabe von 8 ml Medium kräftig resuspendiert und in einen Falcon überführt werden konnten. Nun wurden 20 µl Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert und im Verhältnis 1:3 mit dem Kulturmedium verdünnt. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurden anschließend die Zellen ausgezählt. Hierfür wurden 20 µl der verdünnten Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert,

diese mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt und unter dem Lichtmikroskop die Zellzahlen von 4 Großquadraten ausgezählt, die wiederum aus 16 Kleinquadraten bestanden. Daraus wurde der Mittelwert gebildet und zuletzt die Zellzahl pro Milliliter Kulturmedium mit folgender Formel berechnet:

$$((\text{Zellzahl}/4) \cdot 3) \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml Kulturmedium}$$

Nach der Auszählung konnten die Zellen in gewünschter Konzentration für die stabile Transfektion beziehungsweise die Stimulationsversuche ausgesät werden.

### 3.3.5 Stabile Transfektion humaner Zellen

Vor der stabilen Transfektion wurden die verwendeten LNCaP-, BM1604- und PC3-Zellen zunächst ausgezählt und in der gewünschten Konzentration von  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml auf 10 cm Ø Petrischalen ausgesät. Nachdem die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz von 80 % im Brutschrank gewachsen waren, wurde das Medium durch 10 ml neues Medium ausgewechselt. Anschließend wurden je nach Ansatz 10 µg des gewünschten linearisierten und aufgereinigten Plasmids PLE, PSE beziehungsweise PE mit dem RPMI-Grundmedium ohne Zusätze ad 460 µl versetzt und durch vorsichtiges hoch und runter Pipettieren gemischt. Dazu wurden pro Ansatz 40 µl FuGENE® HD Transfektionsreagenz hinzugefügt, durch Vortexen gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min inkubiert. Daraufhin wurde es tröpfchenweise zu den Petrischalen mit den gewachsenen Zellen hinzugegeben und für einen Tag im Brutschrank kultiviert. Das nicht-liposomale Transfektionsreagenz aus kationischen Lipiden führt zu einer ladungsbedingten Komplexierung der negativ geladenen Plasmid-DNA, was das Einschleusen dieser über die Zellmembran sowie deren Einbau in das Genom der Zelle ermöglicht. In den Zellen, welche mit PLE transfiziert wurden, sollte es durch das Einbringen zusätzlicher Gene für die lange Spleißvariante von TRPM5 zu einer Überexpression des funktionellen Ionenkanals kommen. Diejenigen Zellen, welche PSE als Vektorkonstrukt enthielten, führten zu einer Expression der kurzen Spleißvariante von *TRPM5*. Diese Isoform kann vermutlich keinen funktionellen Ionenkanal ausbilden. Daher stellte sich die Frage, ob die neuen TRPM5-short Proteine mit den nativ in den Zellen vorkommenden TRPM5-long Proteinen interferieren und damit die Funktion des Ionenkanals stören. Das PE-Konstrukt fungierte in den Prostata-Zellen als Kontrolle, da es kein TRPM5 Gen enthält. Alle drei Plasmidkonstrukte enthielten zudem das entsprechende Gen für das grün fluoreszierende Protein eGFP, um die Lokalisation

des Ionenkanals in den humanen Zellen nach der stabilen Transfektion zu visualisieren.

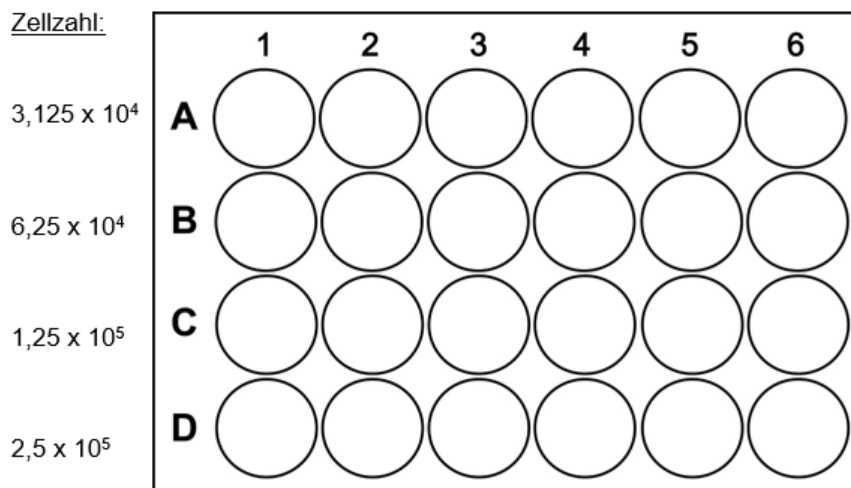
Anschließend wurde der Erfolg der stabilen Transfektion mit Geneticin (G-418) überprüft. Dieses Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside hemmt die Proteinbiosynthese, indem es die Initiation der Translation inhibiert. Dies wiederum führt zum Sterben der Zellen. Die eingesetzten Plasmide besitzen jedoch Resistenz-Gene für G-418, die für Aminoglykosid-Phosphotransferasen kodieren und durch die Phosphorylierung des Antibiotikums an seinen Hydroxylgruppen dessen Wirkung unterdrücken. Wenn die Plasmid-DNA erfolgreich in das Genom der Zelle integriert wurde, war somit die Zelltoxizität von G-418 unterbunden. Auf diese Weise wurden diejenigen Zellen selektioniert, bei denen die stabile Transfektion erfolgreich war, wohingegen die nicht-transfizierten Zellen starben.

Zu Beginn der Selektionierung wurde bei allen drei Zelllinien eine G-418 Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt und das Selektionsmedium alle zwei Tage ausgetauscht. Die BM1604-Zellen wurden die gesamte Zeit mit dieser Konzentration selektioniert. Für die LNCaP- und PC<sub>3</sub>-Zellen war diese Konzentration allerdings toxisch. Daher wurde für die LNCaP-Zellen die Konzentration entsprechend der Literatur auf 0,3 mg/dl umgestellt (Luo *et al.*, 2006).

#### 3.3.5.1 *Kill Curve* für Selektionierung von PC<sub>3</sub>-Zellen

Da es für die PC<sub>3</sub>-Zellen keine entsprechende Literatur gab, wurde für sie anhand einer *Kill Curve* mit ansteigender G-418 Konzentration diejenige Konzentration bestimmt, die für die Selektionierung transfizierter PC<sub>3</sub>-Zellen am besten geeignet ist (siehe Abbildung 3.7). Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer Zellzahl von  $3,125 \times 10^4$ ,  $6,25 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^5$ , und  $2,5 \times 10^5$  ausgezählt. Anschließend wurde Ihnen jeweils 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 beziehungsweise 0 mg/ml G-418 hinzupipettiert und über zwei Wochen das Wachstum der Zellen beobachtet.

G-418 Konz. (mg/ml): 1 0,8 0,6 0,4 0,2 0



**Abbildung 3.7: Selektionierung mit Geneticin (G-418).**

Zu sehen ist das Schema für die *Kill Curve* der transfizierten PC3 Zellen mit G-418. Hierbei wurde das Antibiotikum in einer Konzentration von 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 und 0 mg/ml eingesetzt. Zuvor wurden die Zellen in einer Zellzahl von  $3,125 \times 10^4$ ,  $6,25 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^5$ , und  $2,5 \times 10^5$  ausgezählt.

3.3.6 Fixierung von Zellen für die Konfokalmikroskopie

Um die Zellen unter dem konfokalen Laserscan-Mikroskop beobachten zu können, mussten diese zunächst in der gewünschten Konzentration von  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml beziehungsweise  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen/ml ausgezählt werden. Hierfür wurden 10 cm Ø Petrischalen verwendet, auf deren Boden jeweils 4 Deckgläschen gelegt wurden. Zu den vorgelegten 10 ml Medium wurde die Zellsuspension tröpfchenweise hinzugefügt und durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden sie fixiert. Hierfür wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4%-igem Paraformaldehyd überschichtet und für 30 min zur Fixierung bei RT inkubiert. Danach wurde nochmals 2-mal mit PBS gewaschen, um überschüssige Fixierlösung zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Deckgläschen mit den gewachsenen Zellen auf ihrer Unterseite vorsichtig auf je einen Objektträger gelegt, der zuvor mit einem Tropfen PBS bestückt wurde. Mit Fixogum wurden die Ränder der Deckgläschen abgedichtet und zuletzt für 30 min bei RT getrocknet. Im Anschluss wurden die frisch fixierten Zellen mithilfe des konfokalen Laserscan-Mikroskops mikroskopiert.

### 3.4 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Für die konfokale Laserscan-Mikroskopie wurde ein spezielles Fluoreszenzmikroskop (cLSM = *confocal laser scanning microscope*) verwendet, dessen fokussierter Lichtstrahl Stück für Stück das gesamte Präparat mit den gewachsenen Zellen rastert. Die Lichtintensität des durch Fluoreszenz abgegebenen Lichtes wird nacheinander an allen Orten des abzubildenden Bereiches gemessen und daraus ein vollständiges, dreidimensionales Bild konstruiert. Somit ermöglicht das cLSM die dreidimensionale Untersuchung subzellulärer Strukturen, welche mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen visualisiert werden können.

Zuvor wurden Expressionskonstrukte in die humanen Zellen eingebracht, die nach Transkription in fluoreszenzgetaggte Proteine translatiert wurden. In dieser Arbeit handelte es sich um das grün fluoreszierende Protein eGFP. Sein Absorptionsmaximum liegt im UV-Bereich (395 nm) sowie im blauen Bereich (475 nm) und es fluoresziert bei entsprechender Anregung grün (509 nm).

Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie tragen neben dem emittierten Licht aus der Fokusebene alle Photonen, die ober- und unterhalb der fokalen Ebene emittiert werden, zur Bildentstehung bei. Diese unerwünschte Fluoreszenz hat eine reduzierte Auflösung der Bildinformation zur Folge. Beim cLSM ermöglicht eine variable Lochblende, welche als *pinhole* bezeichnet wird, die Detektion von Licht ausschließlich aus der Fokusebene mit einer Dicke von  $< 1 \mu\text{m}$ . Alle Photonen, die nicht aus dieser Ebene stammen, werden wirkungsvoll ausgeblendet. Dies ermöglicht eine hochauflösende Abbildung der Zellen.

### 3.5 Stimulationsversuche humaner Zellen mit $5\alpha$ -Dihydrotestosteron

Die Stimulation der humanen Prostata-Karzinom Zellen mit dem Steroidhormon  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob der TRPM5-Ionenkanal eine modulierende Funktion auf die Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) hat, welcher als Tumormarker dient. Da die PSA-Sekretion abhängig vom DHT ist, wurde dieser aktive Metabolit des Testosterons für die Stimulation verwendet.

Zuvor wurden die nativen sowie die stabil transfizierten LNCaP- und BM1604-Zellen in einer Konzentration von 30.000 Zellen/Well in 24-Well Platten ausgezählt. Die PC<sub>3</sub>-Zellen hingegen wurden nicht ausgezählt und stimuliert, da sie keinen Androgen-Rezeptor besitzen (Tai *et al.*, 2011) und somit für Androgene wie DHT unempfindlich

sind (Dillard *et al.*, 2008). Wichtig war es, Phenol-freies Medium zu verwenden, da ansonsten die anschließende Konzentrationsbestimmung des PSA mithilfe des Radioimmunoassays (RIA) gestört sein könnte. Des Weiteren wurde ausschließlich mit Aktivkohle gestripptes FCS für die Kultivierung eingesetzt (siehe 3.5.1), um sicherzustellen, dass zu Beginn der Stimulationsversuche kein DHT oder andere, das Wachstum anregende Faktoren im Medium enthalten waren. Anschließend wurden die Tumorzellen für zwei Tage kultiviert, um ein maximales Anheften der Zellen am Boden der Wells zu ermöglichen.

Begonnen wurde die Stimulation, indem das Kulturmedium abgesaugt wurde und je 500 µl DHT in einer Konzentration von 100 nM (Arnold *et al.*, 2004) beziehungsweise 500 µl Negativkontroll-Lösung hinzugefügt wurde. Dabei enthielt die Negativkontroll-Lösung dieselbe Menge Methanol wie die DHT-Lösung, da das Hormon in Methanol gelöst vorlag. Zudem wurde ein zusätzlicher Ansatz mit Leermedium verwendet. Zu den Messzeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 47 h und 96 h wurde die Stimulation der Zellen gestoppt, indem der Überstand der jeweiligen Proben abgenommen wurde. Danach wurde der Überstand für 1 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um mögliche Zellreste zu entfernen. Der gewonnene Überstand wurde bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Die anschließende PSA-Konzentrationsbestimmung wurde mithilfe des Radioimmunoassays im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen. Spezifische Antikörper binden kompetitiv an das natürliche Antigen der Probe und an ein hinzugefügtes radioaktiv markiertes Antigen. Als Antigen fungierte hierbei PSA. Je mehr natürliches PSA in der Probe vorhanden war, desto weniger radioaktiv markiertes PSA wurde gebunden. Somit war die gemessene Radioaktivität umso geringer, je höher die Konzentration des PSA in der Probe war.

### 3.5.1 Herstellung von mit Aktivkohle gestripptem Fetalem Kälberserum

Um sicherzustellen, dass keine ungewollten das Wachstum anregende Faktoren während der Stimulationsversuche im Medium enthalten waren, musste das eingesetzte Fetale Kälberserum (FCS) zunächst mit Aktivkohle gestrippt werden.

Hierfür wurde zunächst eine 1000 ml Stocklösung angesetzt. Diese enthielt 250 mmol Saccharose, 1,5 mmol Magnesiumchlorid und 10 mmol HEPES und wurde mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die Stocklösung steril filtriert. 100 ml hiervon wurden verwendet, um die Aktivkohle (0,25 %) und das Dextran T-70 (0,0025 %) zu lösen. Dieses Gemisch wurde über

Nacht bei 4 °C inkubiert, wodurch Dextran-beschichtete Aktivkohle entstand. Im Folgenden wurde dasselbe Volumen der Dextran-beschichteten Aktivkohle eingesetzt wie das des FCS, welches gestrippt werden sollte. Zunächst wurde die Dextran-beschichtete Aktivkohle zentrifugiert (10 min, 1100 rpm), woraufhin der Überstand verworfen und durch dasselbe Volumen FCS ersetzt wurde. Nach gründlichem Mischen wurde das Gemisch für 45 min bei 56 °C inkubiert, dann für 10 min auf Eis abgekühlt und nochmals für 45 min bei 56 °C inkubiert. Das so entstandene Hitze-inaktivierte gestrippte FCS wurde zentrifugiert (10 min, 1100 rpm), der Überstand dekantiert und steril filtriert. Das fertige gestrippte FCS wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.6 Anhang: Verwendetes Material

#### 3.6.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 $\alpha$  F<sup>-</sup>, supE44, hsdR17, recA1,  $\Delta$ lacU169,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, endA1, gyrA96, (r<sup>k</sup>, m<sup>k</sup><sup>+</sup>), thi-1, relA1,  $\lambda$ -

#### 3.6.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster analytischer Reinheit verwendet, welche als „p. A.“ (*pro analysi*) bezeichnet wird.

Agarose	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Aktivkohle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ampicillin Injektionslösung (10 mg/ml)	Ratiopharm GmbH (Ulm)
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bacto <sup>TM</sup> -Agar	Becton, Dickinson & Company (USA)
Bacto <sup>TM</sup> -Tryptone	Becton, Dickinson & Company (USA)
Bacto <sup>TM</sup> -Yeast Extract	Becton, Dickinson & Company (USA)
Borsäure	ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
Dextran T-70	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (1 mg/ml in Methanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)



DTT (0,1 M)	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
Desoxynukleotidtriphosphat- Stammlösung (dNTP; 16 mM)	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
DPBS	gibco® by life technologies (UK)
EDTA-Disodium (Na <sub>2</sub> EDTA)	GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)
Ethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
FCS Gibco® (Fetal Calf Serum)	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
First Strand Buffer (5 x)	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega Corporation (USA)
D(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
G418-BC Sulfate	Biochrom GmbH (Berlin)
HEPES Buffer Solution (1 M)	gibco® by life technologies (UK)
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
KAPA SYPBR® Fast qPCR Master Mix (2x) für LightCycler® 480	KAPA Biosystems (USA)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR international GmbH
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Paraformaldehyd	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership (Heidelberg)
PBS	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin Gibco®	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
Protease-Inhibitor <i>complete</i>	Roche
Puffer Cut Smart (10 x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
RPMI Medium 1640 (1 x)	gibco® by life technologies (UK)

RNase-freies dH <sub>2</sub> O	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Sodium Pyruvate 100 mM (100x)	gibco® by life technologies (UK)
Terralin® Liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Trypton	AppliChem GmbH (Darmstadt)

### 3.6.3 Enzyme

DNase I (RNase frei) (EC 3.1.21.1)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ µl) (EC 2.7.7.49)	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)
PvuI-HF® Restriktionsendonuklease (EC 3.1.21.4)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Ribo Lock Ribonuklease (RNase)- Inhibitor (40 U/ µl) (EC 3.1.27.5)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Taq-Polymerase (EC 2.7.7.7)	hergestellt durch: Prof. Dr. Dirk Prawitt (Mainz)

### 3.6.4 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	Easy-Cast™ elektroforese systems (versch. Größen) (PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen))
Autoklav	System V50 (Linden)
Bakterieninkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Bakterien-Sterilbank	Holten Lamin Air (Dänemark)
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen)
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corporation, Japan) Filter: Nikon Port 2 (R80)

	Objektiv: Plan Fluor 40*0,60
	Tubus: 10*22
Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Konfokales Laserscan-Mikroskop	Spectral confocal & multiphoton system Leica TCS SP2 (Leica microsystems GmbH; Wetzlar)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss GmbH (Oberkochen)
Magnet-Heizrührer	RCT IKAMAG® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen)
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm <sup>2</sup> )	La Fontaine International GmbH (Waghäusel)
Pipettierhilfen	Thermo Fisher Scientific (USA) Eppendorf AG (Hamburg)
pH-Meter	inoLab® Level1 (Labotec; Wiesbaden)
Real-Time PCR System	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
LightCycler®480 II	
Schüttelinkubator	Gallenkamp (UK)
Spannungsgeräte für Agarose- Gelelektrophorese	EPS 1000 Pharmacia Biotech (Bio-Rad Laboratories; München)
Spektrophotometer	Nanodrop 2000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen))
Thermoschüttler	Thermomixer comfort (Eppendorf AG; Hamburg)
Thermocycler (reverse Transkription)	Biometra GmbH (Göttingen)
Vortexer	STARLAB GmbH (Ahrensburg); VELP Scientifica (Italien)
Waagen	Analysenwaagen (Sartorius AG; Göttingen)
Wasserbad Ceromat® WR	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Zellkulturinkubator	Hera cell (Heraeus Holding GmbH; Hanau)
Zellkultur-Sterilbank	Lamin-Air (Heraeus Holding GmbH; Hanau)

Zell-Zählkammer	Neubauer improved (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda Königshofen)
Zentrifugen	5417R Centrifuge (Eppendorf AG; Hamburg); Hettich EBA 12R (Andreas Hettich GmbH & Co.KG; Tuttlingen)

### 3.6.5 Kits

Endotoxin-free Plasmid DNA Purification NucleoBond® Maxi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren)
peqGOLD DNase I Digest Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)

### 3.6.6 Lösungen und Puffer

Alle hergestellten wässrigen Lösungen wurden mithilfe von deionisiertem Millipore®-Reinstwasser hergestellt. Für molekularbiologisch verwendete Lösungen wurde *Aqua ad injectabilia* (Ampuwa® Spüllösung der Firma Fresenius Kabi AG; Bad Homburg sowie Braun; Melsungen), im Folgenden H<sub>2</sub>O bidest. genannt, verwendet.

Agarosegel (X %)	X g Agarose 100 ml 1x TBE
Ampicillin	Stammlösung: 10 mg/ml H <sub>2</sub> O bidest. (sterilfiltriert) Endkonzentration: 0,1 mg/ml
DNA-Ladepuffer (orange)	15 g Saccharose 0,175 g Orange G ad 50 ml H <sub>2</sub> O bidest.
Ethidiumbromid-Färbelösung	2 µg EtBr/ml Millipore®-Wasser
LB-Agar	15 g Bacto™-Agar ad 1 l Millipore®-Wasser

	(autoklaviert)
LB-Ampicillin-Agar (1 %)	5 ml Ampicillin (10 mg/ml) ad 500 ml LB-Agar
LB-Ampicillin-Medium (1 %)	500 ml LB-Medium 5 ml Ampicillin (10 mg/ml)
LB-Medium (1x)	10 g Bacto™-Tryptone 5 g Bacto™-Yeast-Extrakt 10 g NaCl ad 1 l Millipore®-Wasser
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Yeast-Extrakt 0,5 g NaCl ad 1l Milipore®-Wasser (autoklaviert)
SOC-Medium	20 mM Glucose-Lösung (sterilfiltriert) Ad 100 ml SOB-Medium
TBE-Puffer (1x)	90 mM Borsäure 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,3) 90 mM Tris (autoklaviert)

### 3.6.7 Molekulargewichtsstandards

100 bp DNA Ladder	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt); New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
1 kb DNA Ladder	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt); New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

### 3.6.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide von Fa. Metabion (Martinsried) wurden für die PCR und qPCR eingesetzt. In Klammern sind die jeweiligen Anlagerungs-Temperaturen der Primer angegeben.

Actb_F (60 °C)	5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'
Actb_R (60 °C)	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'
B2M_F (60 °C)	5'-ATG AGT ATG CCT GCC GTG TGA-3'
B2M_R (60 °C)	5'-GGC ATC TTC AAA CCT CCA TG-3'
eGFP_F (62 °C)	5'-GCC ACC ATG GTG AGC AAG G-3'
eGFP_R (62 °C)	5'-CTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3'
eGFP_pPCR_R (60 °C)	5'-CCT TCA GCT CGA TGC GGT T-3'
hK2_F (62 °C)	5'-GAA CCA GAG GAG TTC TTG CG-3'
hK2_R (62 °C)	5'-CCC AGA ATC ACC CCC ACA A-3'
KLK3_F (62 °C)	5'-ACC AGA GGA GTT CTT GAC CC-3'
KLK3_R (62 °C)	5'-GTC CAG CAC ACA GCA TGA AC-3'
PSA_F (60 °C)	5'-AGC ATT GAA CCA GAG GAG TTC T-3'
PSA_R (60 °C)	5'-CCC GAG CAG GTG CTT TTG-3'
TRPM5_F (60 °C)	5'-CCA TCT TCC TGT TCA TCG TG-3'
TRPM5_Long_R (60 °C)	5'-CGT CCT TCA TCA TGC GCT C-3'
TRPM5_Short_R (60 °C)	5'-CAC GGG CTT CAT GCG CTC-3'
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen™/ Life technologies GmbH (Darmstadt)

### 3.6.9 Produktgrößen

Mithilfe der verwendeten Oligonukleotide (siehe 3.6.8) in der PCR beziehungsweise qPCR entstandenen Produktgrößen. Die Produktgrößen wurden auf NCBI mithilfe des blastn Programms überprüft (Internetquelle 7).

Actb	203 bp
B2M	101 bp
hK2	162 bp
KLK3	119 bp
PSA	158 bp

TRPM5_Long	177 bp
TRPM5_Short	176 bp

### 3.6.10 Vektorkonstrukte

pcDNA3-eGFP (in Versuchen als PE bezeichnet)	hergestellt durch: Lili Brixel (Mainz)
PLE	hergestellt durch: Lili Brixel (Mainz); pcDNA3-eGFP Plasmid mit langer Splice-Variante von TRPM5
PSE	hergestellt durch: Lili Brixel (Mainz); pcDNA3-eGFP Plasmid mit kurzer Splice-Variante von TRPM5

### 3.6.11 Verbrauchsmaterialien

96-Well FrameStar® PCR plate	4titude (Berlin)
Deckgläschen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Fixogum Rubber Cement	Marabu GmbH & Co. KG (Tamm)
Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Fisher Scientific
Küvetten „UVette®“	Eppendorf AG (Hamburg)
Objektträger	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Petrischalen (10 cm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
PP-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
PP-Rundbodenröhrchen Falcon® (14 ml)	Becton, Dickinson & Company (USA)
Q-Stick™ Adhesive Folie für qPCR	4titude (Berlin)
Eppendorfgefäße (0,5 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Eppendorfgefäße (1,5 ml und 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Zellkulturplatten (24-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturschaber BD Falcon™	BD Biosciences (Belgien)

### 3.6.12 Zelllinien

LNCaP ( <i>humane Prostata Adenokarzinom- Zellen aus einer Lymphknoten-Metastase</i> )	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dirk Prawitt (Mainz)
BM1604 ( <i>humane Prostatakarzinom- Zellen aus einer metastasierten Läsion im zentralen Nervensystem</i> )	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dirk Prawitt (Mainz)
PC <sub>3</sub> ( <i>humane Prostatakarzinom-Zellen aus einer Knochenmetastase des Grades IV</i> )	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dirk Prawitt (Mainz)

### 3.6.13 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

RPMI-Medium (LNCaP-Zellen)	500 ml RPMI-Medium 50 ml FCS (10%) 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) 5 ml Na-Pyruvat (1%)
RPMI-Medium (BM1604- und PC3-Zellen)	500 ml RPMI-Medium 50 ml FCS (10%) 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) 12,5 ml HEPES (2,5%)



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von *TRPM5* und *PSA* in verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien

Um die Rolle des *TRPM5*-Ionenkanals bei der Signaltransduktion für die *PSA*-Sekretion in den Zellen der Prostata zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von *TRPM5* sowie von *PSA* untersucht. Nur wenn beide Gene in den untersuchten Prostata-Karzinom Zelllinien exprimiert werden, lässt sich ihr physiologischer Zusammenhang auch analysieren. Als Zelllinien standen LNCaP-, BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen zur Verfügung, welche in den siebziger Jahren aus humanen Prostatakarzinom Zellen isoliert wurden. Während die LNCaP-Zellen aus einer linken supraklavikulären Lymphknoten-Metastase eines 50-Jährigen stammen, wurden die mit den BM1604-Zellen nah verwandten DU-145 Zellen im Jahr aus einer metastasierten Läsion eines 69-Jährigen isoliert. Zytogenetisch unterscheiden sich die BM1604- nicht von den DU-145-Zellen, sie weisen lediglich einige phänotypische Unterschiede auf. Die PC<sub>3</sub>-Zellen wurden aus einer Knochenmetastase eines Grad IV Prostata-Karzinoms eines 62-Jährigen entnommen.

Für die Expressionsanalyse von *TRPM5* und *PSA* wurde die RNA aus den drei Zelllinien isoliert. Im folgenden Schritt wurde die isolierte RNA mithilfe der reversen Transkription in die dazugehörige cDNA umgeschrieben. Mithilfe der synthetisierten cDNA konnte die Expression der beiden Gene anhand einer PCR untersucht werden. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde eingesetzt, um zudem das Expressionsniveau von *PSA* (auch *hK3* genannt) sowie eines zweiten Tumormarkers aus der Prostata namens *Humanes Kallikrein 2 (hK2)* zu analysieren. Das Expressionsniveau von *hK2* wurde ebenfalls analysiert, da sein Spiegel bei Patienten mit Prostatakarzinom ebenfalls in der Regel erhöht und damit hilfreich für seine Detektion und Prognose ist (Satkunasivam *et al.*, 2014).

#### 4.1.1 Expressionsanalyse von *TRPM5* und *PSA* mithilfe der PCR

Da zwei verschiedene Spleißvarianten des humanen *TRPM5* bekannt sind, wurde bei der PCR die Expression beider Varianten mithilfe von Isoform-spezifischen Primern untersucht. Als *Forward* Primer für die kurze Spleißvariante wurde *hTRPM5\_16F* verwendet, welcher an Exon 16 bindet. Als *Reverse* Primer wurde *TRPM5\_19R* eingesetzt, welcher Intron-überspannend die letzten neun Basen des Exons 17 und die ersten neun Basen des Exons 19 bindet. Das PCR-Produkt von *TRPM5*-short ist

176 Basenpaare lang. Seine prä-mRNA wird während der Transkription in die reife mRNA im Exon 18 alternativ gespleißt, sodass TRPM-short vermutlich keinen Ionenkanal ausbilden kann. Bisher ist die Funktion dieser Isoform unbekannt. Für die Amplifikation von TRPM5-long wurde ebenfalls *hTRPM5\_16F* als *Forward* Primer verwendet. Als *Reverse* Primer diente *TRPM5\_18R*, welcher komplementär zu den letzten neun Basen des Exons 17 und den ersten zehn Basen des Exons 18 ist. Somit ermöglicht dieses Primer-Paar die Amplifikation der langen Spleißvariante. Das hierbei entstehende PCR-Produkt ist 177 Basenpaare lang. Die prä-mRNA von TRPM5-long wird nicht alternativ gespleißt, sodass diese Isoform einen funktionsfähigen Ionenkanal ausbildet. Abbildung 4.1 zeigt die Exon-Intron-Struktur von *TRPM5* sowie die Exonbereiche, an welche die genannten Primer spezifisch binden.

```

CCCTGGTCATAGATGGAACCCCTGATCCTTACAGATCCAAGCTTGTCCAGGTAGGGCTGTG
CCCAGCGAGGGCGGCTGGACAGCTGTCAGTGGACTGCCACCTCCCTCCCAGGGCTTCCTT
CACAGACGAGGACACACACCTGGTGAAGAAGTTCACACTGTATGTGGGGGACAACTGGAA
CAAGTGTGACATGGTGGCCATCTTCCTGTTTCATCGTGGGTGTCACCTGCAGGTCTGTGGG
GCCAGAGGCCGTGTGGCCTCAGGGCGGCTTGTGGGCAGGCTTCCAGATGAAGCCACTCA
GGTTGGGTGTGGCGGTGGCACTTGTGGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTGGGTGGGT
CACTTGAGCCAGGGAAGTTGAGGCAGCAGCAAGCCGTGATCATGCCACTGCACTCCAGCC
TGAGTGACAGAGCAAGACCCTGTCTCTTAAAAATAAATAAAACAAAAGATGAAGCCACTCA
GGGCCCCAAGGAGTCTGGCCTGGCCCTGGCCCTGCCCGCAGCCAGCATGCTGTGTGCCCC
TGGGGAAGCCTCTGCCCTCTCTGGGCCCCCGCAGCCGCATCAGCCTCCCATCCTCCAGGA
TGCTGCCGTCGGCGTTTTGAGGCTGGCCGCACAGTCCCTCGCCATGGACTTCATGGTGTTC
CGCTGCGGCTGATCCATATCTTTGCCATACACAAGCAGCTGGGCCCCAAGATCATCGTGG
TAGAGCGCATGGTGAGCCCCCGGGGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGAGGGACAGCAATCCCC
TGCCTGGGCCCCACCCGGCTGGCCGCTGACGTCCCTCTCTGCCCCGTCGCCCGTGGAGAT
TGAAGGACGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGAGCGTGTGGCTCGTGGCCACGGTGTCA
CCACCCAGGCGCTGCTGCACCCCATGACGGCCGCTGGAGTGGATCTTCCGCCGGGTGC
TCTACCGGCCCTACCTGCAGATCTTCGGCCAGATCCCACTGGACGAGATTGATGTTTGC
ACACAGCCAGCGGGGGCAGGGGCAGGGAGAAATTGGAGCCCTGTGTGCACAAGCCCTGGG
CATGAGGCTCTCCAGAGAGGTCTGTTGGGGCCATGGAGACCCAGCCTGGAGCAGAGATG
GGAGAAGTGGCTGAGGCCTGGTCCCCAGGCCCCCCACACCCAAAGGGCCAGGCCTGGTT
CCTGAGGTAGAGGCAGCTCCAGTACCGGAGCCCCGACCTGGGACCTGGGGCCCTGGGCTG
GGAAGGAGACACAAGGAGACCCCAAGGCAGCCAGGGCTGCCTCCTGCTTGGGGAGGCCAA
GCAGCAAGTCTTGCTCTGGGGGTGGTCTATCGGTGGGGAAGGGATAGGCAGGCACCTAAGG
( . . . ) TCTCGGGGCATTTGCCTAAGGCCGCCCTTGTGGCTGCCCCGGTCTGGTCCCCAC
AGCACCCCTTGCTTTCCAGAAGCCCGTGTGAACTGCTCCACCCACCCACTGCTGCTGGAGG
ACTCACCATCCTGCCCCAGCCTCTATGCCAACTGGCTGGTTCATCCTCCTGCTGGTCACT
TCCTGTTGGTACCAATGTGCTGCTCATGAACCTGCTCATCGCCATGTTTCAGGTGACTCC
ACCCAACCCCTGGAGGAGAGAGCCCTGGAGCGGAGGGAGCAGAGGGTCATTCCCCAACAC
CGCCTCCTTTGCAACCCACCTGGTGTGCTGCAGAGGGTGAGGCTTGGTGCCTCAGGGCAG

```

hTRPM5\_16F

TRPM5\_18R/19R

TRPM5\_18R

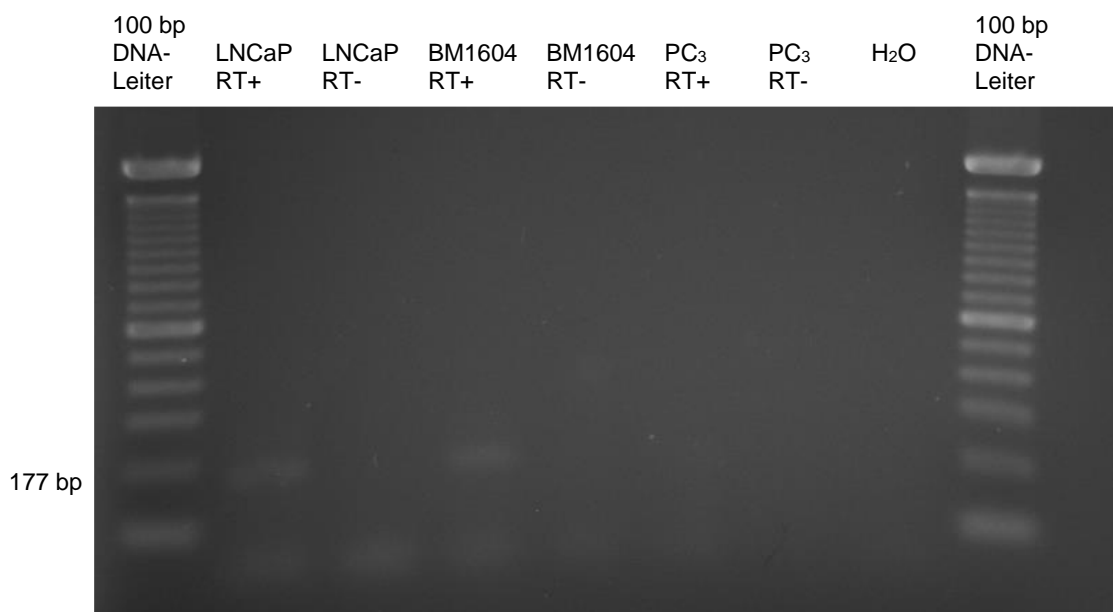
TRPM5\_19R

**Abbildung 4.1: Auszug der *TRPM5*-Gensequenz zwischen Exon 16 und Exon 19.**

Dargestellt ist die Exon-Intron-Struktur von *TRPM5* im Bereich von Exon 16 bis Exon 19. Die Exons sind durch rote Schrift und die Introns durch schwarze Schrift markiert. Diejenigen Bereiche, an welche die verwendeten *Forward* Primer und *Reverse* Primer binden, sind gelb hinterlegt. Hierbei handelt es sich um *hTRPM5\_16F*, *TRPM5\_18R* und *TRPM5\_19R*. Nicht dargestellt sind aus Übersichtsgründen 3000 Basen zwischen Exon 18 und Exon 19, in der Abbildung verdeutlicht durch (...).

Im Rahmen der PCR zeigte sich, dass die lange Spleißvariante von TRPM5 lediglich in LNCaP- und BM1604-Zellen, nicht aber in PC<sub>3</sub>-Zellen exprimiert wird. Dies wurde mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese der entstandenen Amplifikate visualisiert

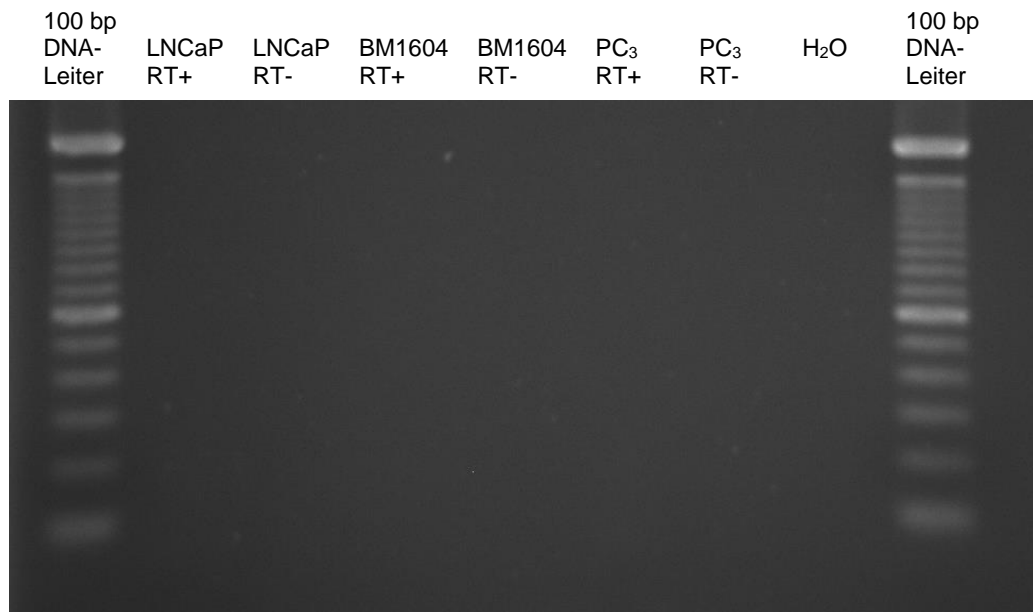
(siehe Abbildung 4.2). Lediglich bei der RT<sup>+</sup>-Probe der LNCaP- und BM1604-Zellen findet sich eine Bande auf Höhe von etwa 177 bp, die der Größe des PCR-Produktes von TRPM5-long entspricht. Bei allen RT<sup>-</sup>-Proben sind keine Banden auf entsprechender Höhe zu sehen. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Banden sind bei den Proben LNCaP RT<sup>+</sup> und RT<sup>-</sup> sowie bei der Probe BM1604 RT<sup>+</sup> eine weitere Bande unterhalb von 100 bp zu sehen. Diese entspricht nicht der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes und entsteht vermutlich aufgrund von Primer-Dimeren, die während der PCR durch das unspezifische Zusammenlagern der Primer entstanden sind. Zudem wurde eine H<sub>2</sub>O-Probe aufgetragen, die als Negativkontrolle dient. Auch in dieser Probe ist keine Bande zu sehen. Somit kam es weder in den RT<sup>-</sup>-Proben, noch in der H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle zu einer Kontamination mit DNA.



**Abbildung 4.2: Lange Spleißvariante von TRPM5.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der PCR der langen Spleißvariante von TRPM5 mithilfe der Primer *hTRPM5\_16F* und *TRPM5\_18R*. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Für die LNCaP und BM1604-Zellen findet sich in den RT<sup>+</sup>-Proben eine Bande, die in etwa auf Höhe von 177 bp liegt und daher sehr wahrscheinlich TRPM5-long entspricht. Eine weitere Bande findet sich für die LNCaP-Zellen in der RT<sup>+</sup>- und RT<sup>-</sup>-Probe sowie für die BM1604-Zellen in der RT<sup>+</sup>-Probe. Diese liegt unterhalb von 100 bp und entspricht vermutlich amplifizierten Primer-Dimeren.

Für die kurze Spleißvariante hingegen zeigen sich nach der Agarose-Gelelektrophorese in den RT<sup>+</sup>-Proben weder bei den LNCaP-, noch bei den BM1604- oder den PC3-Zellen eine Bande. Auch in den verschiedenen Ansätzen der RT<sup>-</sup>-Proben sowie in der H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle findet sich keine Bande, sodass es zu keiner Verunreinigung der Proben mit DNA kam. Abbildung 4.3 zeigt die beschriebenen PCR-Ergebnisse.



**Abbildung 4.3: Kurze Spleißvariante von TRPM5.**

Zu sehen sind die Ergebnisse der PCR von TRPM5-short mithilfe der Primer *hTRPM5\_16F* und *TRPM5\_19R*. Hierbei ist in keinem der RT<sup>+</sup>-Ansätze oder RT<sup>-</sup>-Ansätze eine Bande der drei untersuchten Prostata-Karzinom Zelllinien detektierbar.

Des Weiteren wurde die Expression von *PSA* in den drei Zelllinien aus der Prostata analysiert. Hierfür wurde das Primer-Paar *KLK3\_F* und *KLK3\_R* verwendet. *KLK3\_F* bindet an die letzten 11 Basen von Exon 3 und die ersten neun Basen von Exon 4, wohingegen *KLK3\_R* komplementär zu 20 Basen innerhalb des Exon 4 ist. Mithilfe der verwendeten Primer entstand ein *PSA*-Amplifikat, das 119 Basenpaare lang ist. Die cDNA-Sequenz von *PSA* sowie die Bindestellen für das verwendete Primer-Paar ist in Abbildung 4.4 zu sehen.

Hierbei zeigte sich, dass *PSA* lediglich in LNCaP-Zellen, nicht aber in BM1604- oder PC<sub>3</sub>-Zellen exprimiert wird. Denn nur in der RT<sup>+</sup>-Probe von LNCaP ist auf dem Agarosegel eine deutliche Bande zu sehen (siehe Abbildung 4.5). Diese liegt auf Höhe von etwa 119 bp und entspricht damit der Größe des PCR-Produktes von *PSA*. Für die RT<sup>+</sup>-Proben der BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen finden sich bei der Amplifikation keine Banden. Daher wird *PSA* in diesen Zellen vermutlich nicht exprimiert. In beiden Versuchsansätzen sind weder bei den RT<sup>-</sup>-Proben noch bei der H<sub>2</sub>O-Negativkontrollen Banden zu sehen, weshalb eine DNA-Kontamination auszuschließen ist.

```

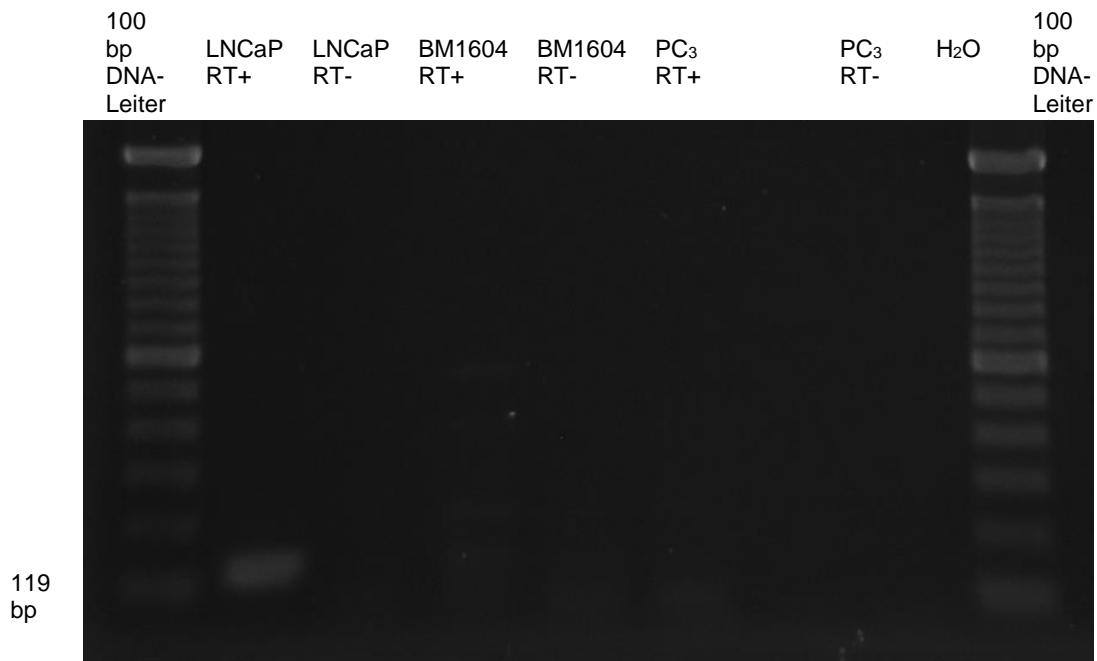
AGCCCCAAGCTTACCACCTGCACCCGGAGAGCTGTGTGTACCCATGTGGGTCCCAGTTGTCTTCCTCACC
CTGTCCGTGACGTGGATTGGTGTCTGCACCCCTCATCCTGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGCGAGA
AGCATTCCCAACCCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCA
CCCCAGTGGGTCCCTCACAGCTGCCCACTGCATCAGGAAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTCCGGCACAGC
CTGTTTTATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTTCAGGTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATA
TGAGCCTCCTGAAGAATCGATTCCCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCT
GTCAGAGCCTGCCGAGCTCACGGATGCTGTGAAGTATGACCTGCCACCCAGGAGCCAGCACTGGGG
ACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAAGAACTTCAGT
GTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGGCAAGTTCACCCCTCAGAAGGTGACCAAGTTTCAT
GCTGTGTGCTGGACGCCTGGACAGGGGGCAAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGT
AATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGTATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCGAAAGGCCTTCCCTGT
ACACCAAGGTGGTGCATTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCTGAGCACCCCTATC
AACCCCTATTGTAGTAAACTTGGAACCTTGGAATGACCAGGCCAAGACTCAAGCCTCCCCAGTTCTAC
TGACCTTTGCTCTTAGGTGTGAGGTCCAGGGTGTCTAGGAAAAGAAATCAGCAGACACAGGTGTAGACCA
GAGTGTCTTCTTAAATGGTGTAAATTTTGTCTCTCTGTCTCTGGGGAATACTGGCCATGCCTGGAGACAT
ATCACTCAATTTCTCTGAGGACACAGATAGGATGGGGTGTCTGTGTTATTTGTGGGTACAGAGATGAAA
GAGGGGTGGGATCCACACTGAGAGAGTGGAGAGTGACATGTGCTGGACACTGTCCATGAAGCACTGAGCA
GAAGCTGGAGGCACAACGCACCAGACACTCACAGCAAGGATGGAGCTGAAAACATAACCCACTCTGTCTCT
GGAGGCACTGGGAAGCCTAGAGAAGGCTGTGAGCCAAGGAGGGGAGGGTCTTCCCTTGGCATGGGATGGGG
ATGAAGTAAGGAGAGGGACTGGACCCCTGGAAGCTGATTCACTATGGGGGAGGTGTATTGAAGTCTCTC
CAGACAACCCCTCAGATTTGATGATTTCTAGTAGAACTCACAGAAATAAAGAGCTGTTATACTGTG

```

**KLK3\_F**  
**KLK3\_R**  
  
 Exon 1  
 Exon 2  
 Exon 3  
 Exon 4  
 Exon 5

**Abbildung 4.4: cDNA-Sequenz von PSA mit den Bindestellen der Primer-Paare.**

Abgebildet ist die PSA cDNA-Sequenz, die aus fünf Exons besteht. Zudem sind die Bindestellen für da Primer-Paare KLK3\_F/R (rot) farbig markiert. Dieses ermöglicht die gezielte Vervielfältigung der entsprechenden Sequenz.



**Abbildung 4.5: PSA mithilfe der Primer KLK3\_F und KLK3\_R.**

Dargestellt ist das mit dem Primer-Paar *KLK3\_F/R* vervielfältigte *PSA*. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt. Nur bei den LNCaP-Zellen ist in der RT<sup>+</sup>-Probe eine Bande zu sehen, die in der Höhe von etwa 119 bp liegt. Für alle weiteren Proben zeigt sich keine Bande auf dem Agarosegel.

#### 4.1.2 Analyse der Expressionsstärke von *PSA* und *hK2* mittels qRT-PCR

Zur Ermittlung der Expressionsstärke von *PSA* in den drei Zelllinien aus dem Prostata-Karzinom wurde ebenfalls das Primer-Paar *KLK3\_F/R* verwendet. Des Weiteren wurde die Expressionsstärke von *hK2*, eines weiteren Tumormarkers aus der Prostata, bestimmt. Hierfür wurde *hK2\_F/R* als Primer-Paar verwendet. Als Haushaltsgene dienten  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ 2-Mikrotubulin. Bei  $\beta$ -Aktin handelt es sich um ein Strukturprotein im Zytoskelett, wohingegen  $\beta$ 2-Mikrotubulin als Untereinheit des MHC I-Komplexes in der Antigenpräsentation der Zellen fungiert. Für die Amplifikation von  $\beta$ -Aktin wurden die Primer *Actb\_F/R* und von  $\beta$ 2-Mikrotubulin das Primer-Paar *B2M\_F/R* verwendet. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde jeweils für 45 Zyklen durchgeführt, um sicherzustellen, dass auch nur sehr schwach exprimierte Gene detektiert werden. Eine der für die qRT-PCR verwendeten Verdünnungen wurde als Anker verwendet und machte damit die einzelnen Ergebnisse untereinander vergleichbar. Somit lassen sich hier Aussagen über die relative Expressionsstärke von *PSA* und *hK2* in diesen Tumorzellen machen, nicht aber über deren absolute Expression. Jeder Messansatz wurde als Duplikat durchgeführt. Aus den doppelt gemessenen CP- und Konzentrationswerten wurde jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Zur Normierung der Konzentrations-Mittelwerte wurde das geometrische Mittel der Konzentrationen der beiden Haushaltsgene in den jeweiligen Zellen verwendet. Hierfür wurde jeweils der Quotient aus dem Mittelwert der Konzentrationen von *PSA* beziehungsweise *hK2* und dem geometrischen Mittel der Haushaltsgene in denselben Zellen berechnet. Mithilfe dieser Normierung wurden die berechneten Konzentrations-Mittelwerte in den verschiedenen Zellen vergleichbar gemacht (siehe Tabelle 4.1).

Bei der Ermittlung der Expressionsstärke von *PSA* in den LNCaP-Zellen war der CP-Mittelwert mit 18,71 niedrig und spiegelte sich ebenfalls in der hohen normierten *PSA*-Konzentration von 1,04 wider. Denn je höher die Ausgangskonzentration der cDNA ist, desto früher wird der CP erreicht. Dies wiederum spricht für eine starke Expression von *PSA* in den LNCaP-Zellen. In den untersuchten BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen verhielt es sich sehr anders. In den BM1604-Zellen war der CP-Mittelwert mit 37,45 sehr hoch und dem entsprechend war die normierte *PSA*-Konzentration mit 2,02E-06 sehr niedrig. Auch in den PC<sub>3</sub>-Zellen war der CP-Mittelwert mit 39,59 sehr hoch und die dazugehörige normierte *PSA*-Konzentration mit 1,59E-07 sehr niedrig. Dies spricht dafür, dass *PSA* in den BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen nicht exprimiert wird.

**Tabelle 4.1: Übersicht über die Ergebnisse aus der Quantitativen Echtzeit-PCR von PSA und hK2.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR von PSA und hK2. Zu sehen sind die einzelnen CP-Werte und Konzentrationswerte sowie die hieraus berechneten Mittelwerte. Aus dem jeweiligen Mittelwert der Konzentration wurde in einem weiteren Schritt mithilfe der Haushaltsgene die normierte PSA- und hK2-Konzentration berechnet.

<b>Prostata-spezifisches Antigen (PSA)</b>					
	<b>CP-Werte</b>	<b>CP-Mittelwert</b>	<b>Konzentrationswerte</b>	<b>Konzentrations-Mittelwert</b>	<b>Normierte Konzentration</b>
<b>LNCaP-Zellen</b>	18,68	18,71	1,07	1,05	1,04
	18,74		1,03		
<b>BM1604-Zellen</b>	34,89	37,45	9,53E-06	4,89E-06	2,02E-06
	40		2,43E-07		
<b>PC<sub>3</sub>-Zellen</b>	40	39,59	2,43E-07	3,41E-07	1,59E-07
	39,17		4,39E-07		
<b>Humanes Kallikrein 2 (hK2)</b>					
	<b>CP-Werte</b>	<b>CP-Mittelwert</b>	<b>Konzentrations-Werte</b>	<b>Konzentrations-Mittelwert</b>	<b>Normierte Konzentration</b>
<b>LNCaP-Zellen</b>	22,13	22,08	9,66E-01	1,00	9,93E-01
	22,02		1,04		
<b>BM1604-Zellen</b>	40	40	5,71E-06	5,71E-06	2,36E-06
	-		-		
<b>PC<sub>3</sub>-Zellen</b>	36,69	38,35	5,31E-05	2,94E-05	1,37E-05
	40		5,71E-06		

Die Bestimmung der der Expressionsstärke von *hK2* in den drei Zelllinien verhielt sich sehr ähnlich. Auf der einen Seite war die normierte *hK2*-Konzentration in den LNCaP-Zellen mit  $9,93E-01$  recht hoch, was für eine starke Expression des Gens spricht und mit dem recht niedrigen CP-Mittelwert von 22,08 übereinstimmt. Auf der anderen Seite war der CP-Mittelwert in den BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen mit 40 beziehungsweise 38,35 sehr hoch und die dazugehörigen normierten *hK2*-Konzentrationen mit  $2,36E-06$  beziehungsweise  $2,94E-05$  sehr niedrig. Allerdings kam es bei den BM1604-Zellen nur in einem der beiden Ansätze zu einer Amplifikation der cDNA. Dies spricht dafür, dass *hK2* in den BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen vermutlich nicht exprimiert.

## 4.2 Generierung von mit TRPM5 stabil transfizierten Zelllinien

Um den physiologischen Zusammenhang zwischen der Expression von *TRPM5* und der PSA-Sekretion innerhalb von Prostata-Karzinom Zellen zu untersuchen, wurden Zelllinien hergestellt, welche mit *TRPM5* stabil transfiziert sind. Für die Transfektionsversuche wurden die bereits zuvor in der PCR und quantitativen Echtzeit-PCR untersuchten Zelllinien aus dem Prostata-Karzinom verwendet. Während die LNCaP- und BM1604-Zellen *TRPM5* exprimieren, konnte für die PC<sub>3</sub>-Zellen hingegen keine Expression des Ionenkanals nachgewiesen werden (siehe 4.1). Somit spiegelt das Einbringen des Ionenkanals in die zuletzt genannte Zelllinie einen nicht physiologischen Zustand dar.

Zunächst wurden chemokompetente *E. coli DH5α* Bakterien mit den drei Vektorkonstrukten PLE, PSE oder PE transformiert (siehe 3.2.1). Nach Linearisierung der Plasmid-DNA folgte die stabile Transfektion der humanen Prostata-Karzinom Zellen, bei der Fremd-DNA in die Zellen eingebracht und in deren Genom stabil integriert wird (siehe 3.3.5).

Um den Erfolg der stabilen Transfektion zu überprüfen, folgte eine Selektionierung der transfizierten Zellen mit G-418. Während die BM1604-Zellen mit einer Konzentration von 1 mg/ml erfolgreich selektioniert werden konnten, musste die Konzentration in den LNCaP-Zellen entsprechend der Literatur auf 0,3 mg/dl umgestellt werden. Für die PC<sub>3</sub>-Zellen gab es keine entsprechende Literatur, weshalb hier eine *Kill Curve* zur Bestimmung der geeigneten G-418 angefertigt (siehe 3.3.5.1). Diese lag bei 0,5 mg/dl, da bei dieser Konzentration die PC<sub>3</sub>-Zellen erst nach zweiwöchiger Behandlung abstarben. Höhere Konzentrationen hingegen waren zu toxisch, sodass die Zellen bereits früher starben. Auf der anderen Seite waren niedrigere Konzentrationen zu gering, um eine Selektionierung erfolgreich transfizierter Zellen zu gewährleisten, da

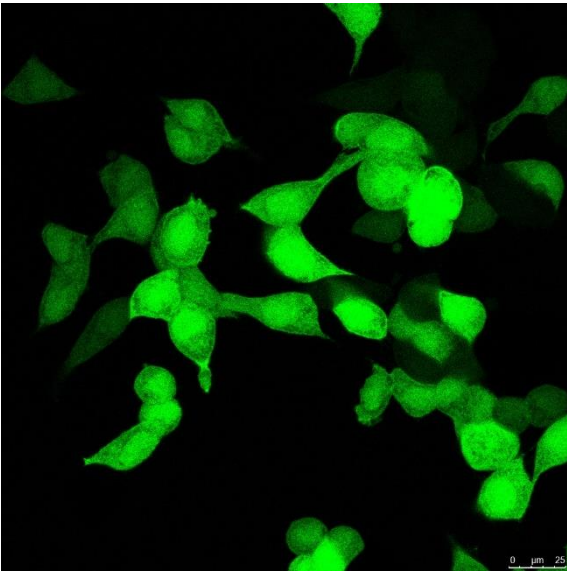
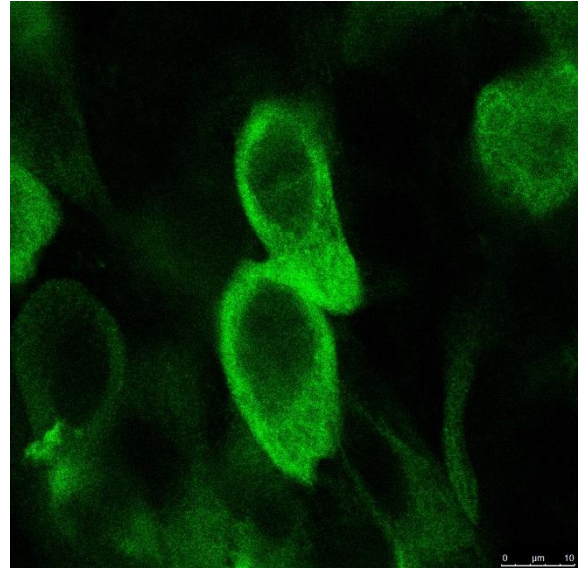
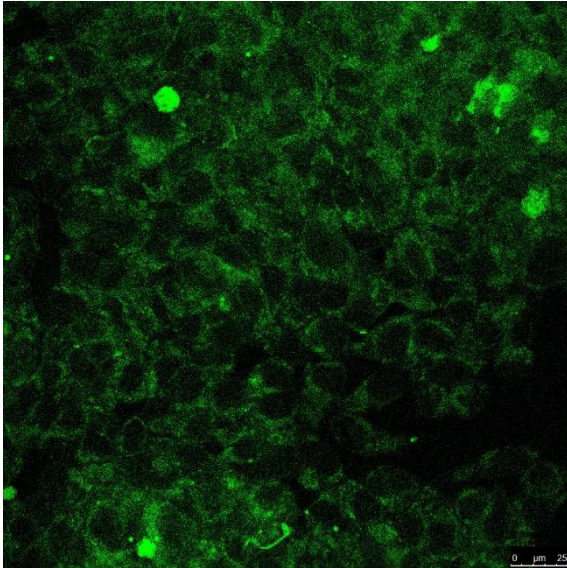


die Zellen kaum abstarben. Somit wurde für die PC<sub>3</sub>-Zellen die entsprechende Konzentration weiterverwendet.

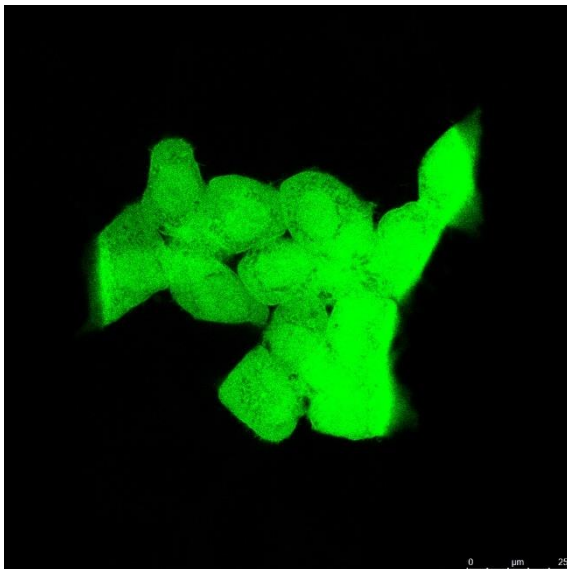
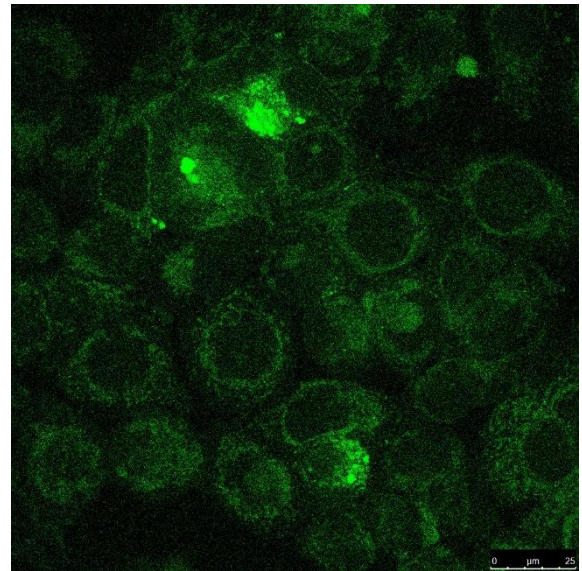
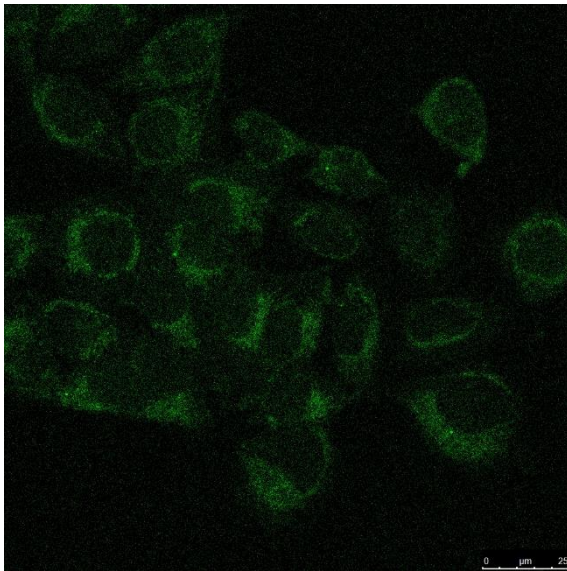
Im folgenden Schritt wurden die transfizierten und erfolgreich selektionierten Tumorzellen für die konfokale Laserscan-Mikroskopie ausgezählt und fixiert, nachdem sie eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten. Mithilfe des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes *eGFP*, dessen Gen innerhalb des Plasmids N-terminal an das *TRPM5*-Gen fusioniert wurde, konnte über die grüne Fluoreszenz die jeweilige Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle visualisiert werden. Hierbei gab es drei verschiedene Vektorkonstrukte, mit denen die beiden Zellkulturen stabil transfiziert wurden. Während bei PE das Plasmid lediglich das Gen für *eGFP* enthielt, waren bei PLE und PSE *TRPM5*-long beziehungsweise *TRPM5*-short zusätzlich zu *eGFP* Teil des Vektorkonstruktes.

Bei denjenigen LNCaP-Zellen, welche die lange Spleißvariante von *TRPM5* enthielten (im Folgenden als PLE bezeichnet), kam es vorwiegend zur Fluoreszenz innerhalb der Plasmamembran. Auch die LNCaP-Zellen, welche das PSE-Plasmid in ihr Genom integriert hatten und somit die kurze Spleißvariante von *TRPM5* exprimierten (nachfolgend mit PSE abgekürzt), war die Fluoreszenz überwiegend innerhalb der Plasmamembran zu sehen. Anders verhielt es sich bei den LNCaP-Zellen, welche das PE-Plasmid enthielten und somit lediglich *eGFP* und nicht *TRPM5* in ihr Genom integriert war (im Folgenden mit PE abgekürzt). Hier kam es zur starken Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma der Tumorzellen. Die spezifische Lokalisation des *TRPM5*-Ionenkanals innerhalb der Plasmamembran der Prostata-Karzinom Zellen spiegelt seine physiologische Rolle als Kationenkanal wider (siehe Abbildung 4.6).

Bei den transfizierten BM1604-Zellen verhielt es sich genauso wie bei den LNCaP-Zellen. Diejenigen Zellen, welche mit PLE oder PSE transfiziert wurden, fluoreszierten hauptsächlich in der Plasmamembran. Im Gegensatz hierzu kam es in den mit PE stabil transfizierten Zellen zur Fluoreszenz innerhalb des gesamten Zytoplasmas (siehe Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.6: Stabil transfizierte LNCaP-Zellen mit den Plasmidkonstrukten PLE, PSE und PE.** Dargestellt sind die Ergebnisse der stabilen Transfektion von LNCaP-Zellen mit den drei Plasmidkonstrukten PLE (oben links), PSE (oben rechts) und PE (unten links). In der konfokalen Laserscan-Mikroskopie der Zellen aus dem Prostata-Karzinom fällt auf, dass sowohl die Zellen, die PLE in ihr Genom integriert haben, als auch diejenigen Zellen, die PSE tragen, eine deutliche Fluoreszenz innerhalb der Plasmamembran aufzeigen. Die mit PE stabil transfizierten Zellen hingegen fluoreszieren im gesamten Zytoplasma.



**Abbildung 4.7: Stabil transfizierte BM1604-Zellen mit den Plasmidkonstrukten PLE, PSE und PE.**

Hier zu sehen sind die mikroskopischen Aufnahmen der mit PLE (oben links), PSE (oben rechts) und PE (unten links) stabil transfizierten BM1604-Zellen. Mithilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie kommt es in den PLE und PSE Zellen vorwiegend in der Plasmamembran der Prostata-Karzinom Zellen. Im Gegensatz hierzu fluoreszieren diejenigen Zellen, die mit PE stabil transfiziert wurden, im gesamten Zytoplasma.

### 4.3 Stimulierbarkeit nativer und stabil transfizierter Prostata-Karzinom Zellen mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron

Um den Einfluss der Expression des TRPM5-Ionenkanals auf die PSA-Sekretion zu untersuchen, wurden Prostatakarzinom-Zellen zur Freisetzung von PSA stimuliert. Für die Stimulation der Zellen wurde das Steroidhormon 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) verwendet, welches als aktiver Metabolit des Testosterons die Sekretion des

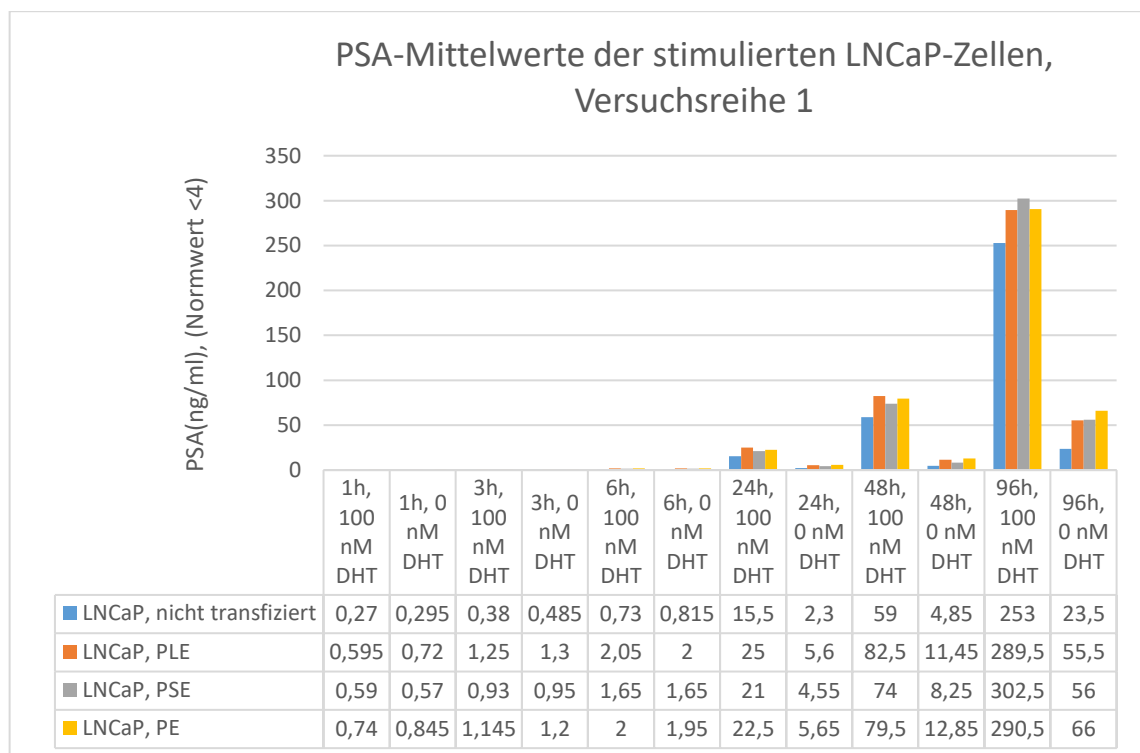
Tumormarkers PSA fördert. Analog zu früheren Untersuchungen wurde für die hier durchgeführten Sekretionsanalysen eine DHT-Hormonkonzentration von 100 nM verwendet (Arnold *et al.*, 2004). Allerdings wurden für die Stimulationsversuche lediglich LNCaP- und BM1604-Zellen, nicht aber PC<sub>3</sub>-Zellen verwendet, da für die zuletzt genannten Zellen bekannt ist, dass sie keinen Androgen-Rezeptor besitzen (Tai *et al.*, 2011) und demnach für DHT unempfindlich sind (Dillard *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde in den zuvor durchgeführten PCR-Versuchen keine Expression des TRPM5-Ionenkanals in PC<sub>3</sub>-Zellen nachgewiesen (siehe Kapitel 4.1), sodass sich diese Zelllinie für die Fragestellung als ungeeignet erwies.

Sowohl die nativen als auch die mit den drei Plasmidkonstrukten stabil transfizierten Zellen (PLE, PSE und PE) wurden für die oben genannten Versuche verwendet, um den Einfluss des TRPM5-Ionenkanals auf die Sekretion des PSA zu analysieren. Falls zwischen beiden ein physiologischer Zusammenhang besteht, sollte es in den mit PLE transfizierten Zellen, welche zu einer Überexpression des TRPM5-Ionenkanals führen, ebenfalls zu einer Modifikation der PSA-Sekretion kommen. Nach 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 96 h wurde die Stimulation der jeweiligen Zellen gestoppt und die Konzentration des sekretierten PSA mithilfe des Radioimmunoassays im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz gemessen. In diesem Analyseverfahren war die gemessene Radioaktivität umso geringer, je höher die Konzentration des PSA in der Probe war. Zu jedem Zeitpunkt wurde in einem Duplikat mit sowie in einem Duplikat ohne DHT-Stimulation die jeweilige PSA-Konzentration gemessen. Die Duplikate ohne hormonelle Stimulation dienten als Kontrollen und sollten durch den Vergleich mit den stimulierten Zellen Aufschluss über die Stimulierbarkeit der Zellen geben.

Wie bereits erwartet, zeigte sich im Falle der BM1604-Zellen trotz Stimulation durch DHT zu allen Messzeitpunkten keine Sekretion des Tumormarkers PSA. Dies unterstützt die Ergebnisse der durchgeführten PCR, wonach in diesen Zellen kein PSA exprimiert wird (siehe Kapitel 4.1). Die Stimulationsversuche wurden bei den BM1604-Zellen probeweise für die nicht transfizierten Zellen zu allen Messzeitpunkten sowie für die mit PLE stabil transfizierten Zellen für 96 h durchgeführt. Hier lag die gemessene PSA-Konzentration stets unter der Nachweisgrenze von 0,01 ng/ml, weshalb auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wurde. Aus diesem Grund wurden die Stimulationsversuche lediglich in den LNCaP-Zellen weiter durchgeführt.

In den nativen und stabil transfizierten LNCaP-Zellen unterschieden sich die Ergebnisse deutlich von denen der BM1604-Zellen. In einer ersten Versuchsreihe wurde zu allen sechs Zeitpunkten nach DHT-Stimulation beziehungsweise ohne

Stimulation die jeweilige PSA-Konzentration bestimmt. Hierbei fällt auf, dass es ab 24 h in Abhängigkeit von der DHT-Stimulation zu einer deutlichen Zunahme der Sekretion des Tumormarkers kommt. Zu den Messzeitpunkten 1 h, 3 h und 6 h ist kein Einfluss der DHT-Stimulation auf die PSA-Sekretion zu sehen, da die gemessenen PSA-Konzentrationen bei den stimulierten und nicht stimulierten Zellen etwa gleich groß sind. Somit lässt sich zu diesen frühen Messzeitpunkten kein Einfluss der hormonellen Stimulation der Tumorzellen auf deren Sekretion von PSA beobachten (siehe Abbildung 4.8).



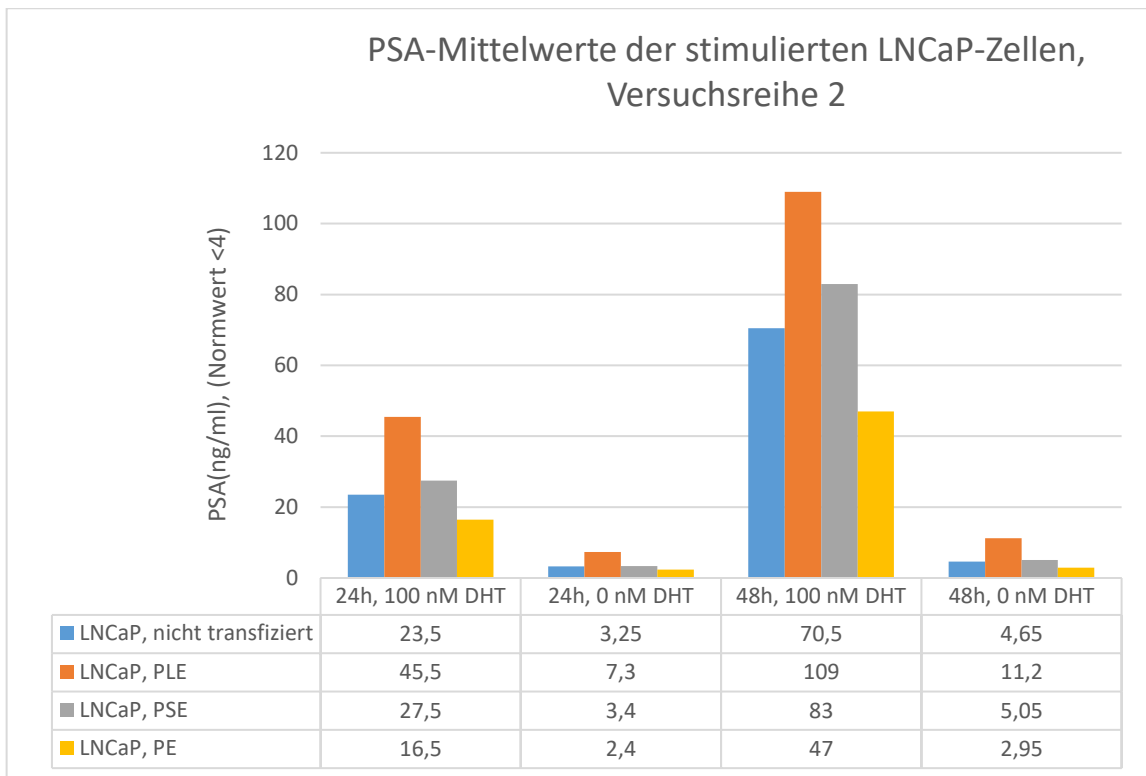
**Abbildung 4.8: Erste Versuchsreihe zur Bestimmung der PSA-Mittelwerte in LNCaP-Zellen mit und ohne Stimulation durch 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron.**

Gemessen wurde die PSA-Konzentration nach 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 96 h in nativen (blau) sowie stabil transfizierten LNCaP-Zellen, bei denen verschiedene Plasmidkonstrukte (rot: PLE, grün: PSE, violett: PE) eingebracht wurden. Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Duplikat mit und ein Duplikat ohne DHT-Stimulation gemessen und hieraus der jeweilige Mittelwert berechnet.

Ab 24 h hingegen ist die Sekretion von PSA in den stimulierten Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen in allen Versuchsansätzen deutlich höher. Zu den Messzeitpunkten 24 h und 48 h ist die ermittelte PSA-Sekretion der LNCaP-Zellen, welche mit dem Plasmidkonstrukt PLE stabil transfiziert sind und somit zu einer verstärkten Expression des funktionellen *TRPM5* führen, am stärksten. Am zweithöchsten ist sie zu diesen Zeitpunkten in den Zellen, welche PE enthalten und somit zu keiner vermehrten Expression von *TRPM5* führen. Die zweitniedrigste Konzentration ist nach 24 h und 48 h bei denjenigen Zellen zu beobachten, welche mit PSE

transfiziert sind. Am niedrigsten ist die gemessene PSA-Sekretion in diesem Versuchsansatz in den nativen Zellen, die lediglich das in den Zellen natürlich vorkommende *TRPM5*-Gen exprimieren. Zusammenfassend liegt für die Messzeitpunkte 24 h und 48 h in den stimulierten Zellen folgende Reihenfolge der PSA-Konzentrationen vor: PLE > PE > PSE > nativ. Nach 96 h ist eine andere Reihenfolge zu beobachten: PSE > PE > PLE > nativ. In den hormonell nicht stimulierten Zellen hingegen bleibt die gemessene PSA-Sekretion deutlich niedriger als in den durch DHT stimulierten Prostata-Karzinom Zellen. Dennoch nimmt auch bei ihnen die Sekretion des Tumormarkers mit der Zeit langsam zu. Betrachtet man beispielsweise die mit PLE stabil transfizierten Zellen, steigt in den nicht stimulierten Zellen die PSA-Konzentration von 0,72 ng/ml nach 1 h auf 55,5 ng/ml nach 96 h an. Vergleicht man diese Zunahme allerdings mit derjenigen in den stimulierten PLE-Zellen, ist der Anstieg in den nicht stimulierten Zellen deutlich niedriger. In den stimulierten PLE-Zellen hingegen steigt die gemessene PSA-Konzentration von 0,595 ng/ml auf 289,5 ng/ml (siehe Abbildung 4.8).

Da vor allem nach 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation ein deutlicher Einfluss vom *TRPM5* auf die PSA-Sekretion zu sehen ist, wurde zu diesen beiden relevanten Zeitpunkten eine zweite Versuchsreihe durchgeführt (siehe Abbildung 4.9). Auch in der zweiten Versuchsreihe ist die gemessene PSA-Konzentration sowohl in den hormonell stimulierten als auch in den nicht-stimulierten PLE-Zellen am höchsten. Am zweithöchsten ist sie hier nun nicht mehr bei denjenigen Prostata-Karzinom Zellen, welche PE enthalten, sondern denjenigen, welche PSE als Plasmidkonstrukt besitzen. Die zweitniedrigsten PSA-Konzentration wird nun bei den nativen Zellen beobachtet und nicht mehr bei den Zellen, die mit PSE stabil transfiziert sind. Die niedrigste Sekretion des Tumormarkers wird in dieser Messung in den PE-Zellen gemessen. Insgesamt ergibt sich für die zweite Versuchsreihe für beide Messzeitpunkte folgende Reihenfolge der PSA-Konzentrationen in den stimulierten Zellen: PLE > PSE > nativ > PE. Dieselbe Reihenfolge ist in den nicht stimulierten Zellen zu sehen, allerdings deutlich niedriger als in den hormonell stimulierten Zellen (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: Zweite Versuchsreihe zur Bestimmung der PSA-Mittelwerte in LNCaP-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation sowie ohne Stimulation der Zellen.**

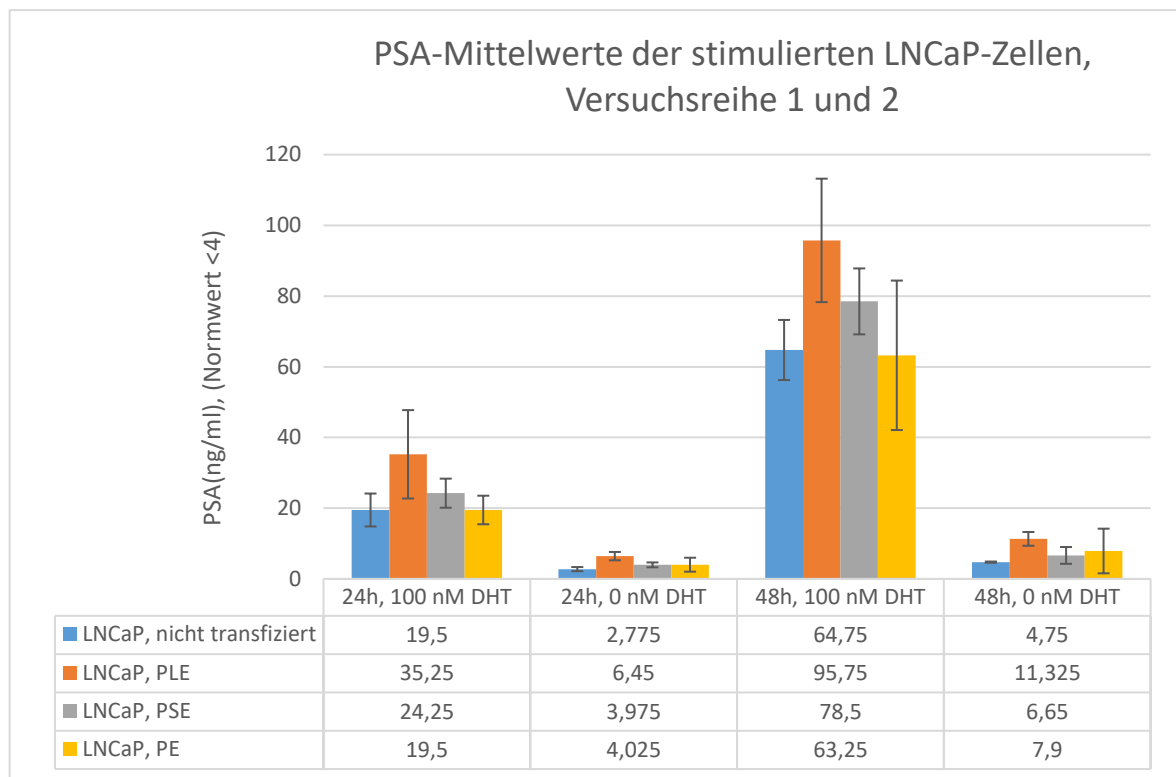
Dargestellt sind die Mittelwerte der PSA-Konzentrationen, welche in den nativen (blau) und in mit den Plasmidkonstrukten PLE (rot), PSE (grün) sowie PE (violett) stabil transfizierten LNCaP-Zellen berechnet wurden. Unterschieden wird zwischen den Zellen nach Stimulation durch DHT und denjenigen Zellen ohne hormonelle Stimulation.

Zu den relevanten Messzeitpunkten 24 h und 48 h nach Stimulation der Zellen durch DHT wurden aus beiden Versuchsreihen die Mittelwerte der PSA-Konzentrationen berechnet und in einer gemeinsamen Graphik dargestellt (siehe Abbildung 4.10). Hierbei ergibt sich, dass nach 24 h sowie 48 h die gemessene PSA-Konzentration im Mittel in denjenigen stimulierten LNCaP-Zellen am höchsten ist, welche mit PLE transfiziert wurden und somit mehr funktionelles *TRPM5* exprimieren. Der zweithöchste PSA-Mittelwert findet sich zu beiden Messzeitpunkten bei denjenigen Zellen, welche mit PSE transfiziert wurden. Nach 24 h DHT-Stimulation ist der Mittelwert der gemessenen PSA-Konzentration bei den nativen Zellen und denjenigen Zellen, welche PE als Plasmidkonstrukt tragen, mit 19,5 ng/ml gleich groß. Nach 48 h ist der zweitniedrigste PSA-Mittelwert bei den nativen Zellen zu finden. Der niedrigste ermittelte Mittelwert der PSA-Konzentration ist zu diesem Zeitpunkt bei denjenigen LNCaP-Zellen zu finden, welche mit PE stabil transfiziert sind. Somit lässt sich für die PSA-Mittelwerte beider Versuchsreihen nach 24 h folgende Reihenfolge bei den stimulierten Zellen finden: PLE > PSE > nativ/PE. Nach 48 h sieht die Reihenfolge wie folgt aus: PLE > PSE > nativ > PE. Allerdings sind nach 48 h die PSA-Mittelwerte für

die nativen und die PE-Zellen mit 64,75 ng/ml beziehungsweise 63,25 ng/ml sehr nah beieinander, sodass die Reihenfolgen bei den durch DHT stimulierten Zellen zu beiden Messzeitpunkten ungefähr gleich sind. Die hormonell nicht stimulierten Zellen hingegen weisen zu beiden Zeitpunkten deutlich niedrigere PSA-Sekretionen auf. Zu den jeweiligen PSA-Mittelwerten wurde zudem die Standardabweichung berechnet, was dem schwarzen T-Balken in Abbildung 4.10 graphisch entnommen werden kann. Unter einer Standardabweichung versteht man die Quadratwurzel der Varianz, wobei diese ein Maß für die Streuung der einzelnen Messwerte um ihren Schwerpunkt oder anders ausgedrückt der Erwartungswert ist. Je größer die berechnete Standardabweichung ist, desto weiter streuen die einzelnen PSA-Mittelwerte um einen Schwerpunkt. Vor allem in den mit DHT stimulierten Zellen sind die Standardabweichungen recht groß. Am größten ist sie mit einem absoluten Wert von 21,14 ng/ml nach 48 h in den stimulierten LNCaP-Zellen, welche mit dem PE-Konstrukt transfiziert wurden. Die niedrigste Standardabweichung hingegen findet sich nach 48 h in den nativen Tumorzellen, welche nicht stimuliert wurden. Hier liegt ihr absoluter Wert bei 0,17 ng/ml. Bei den stimulierten Zellen sieht nach 24 h die Reihenfolge der Standardabweichungen wie folgt aus: PLE > native Zellen > PSE > PE; nach 48 h findet sich diese Reihenfolge: PE > PLE > PSE > native Zellen. Ohne DHT-Stimulation sieht sie nach 48 h folgendermaßen aus: PE > PLE > PSE > native Zellen; nach 48 h beobachtet man diese Reihenfolge: PE > PSE > PLE > native Zellen. Schließlich wurde mit den berechneten PSA-Mittelwerten der unterschiedlich transfizierten (PLE, PSE und PE) und nativen Zellen ein doppelseitiger t-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Unterschiede der gemessenen PSA-Konzentrationen signifikant sind. Der Unterschied zum einseitigen Test liegt hierbei darin, dass nicht getestet wird, ob die Messwerte einen vorgegebenen Grenzwert nach oben oder unten überschreiten, sondern mit welcher Wahrscheinlichkeit die Messwerte innerhalb oder außerhalb zweier definierter Grenzen liegen. Bei Ergebnissen des doppelseitigen t-Tests mit einem p-Wert < 0,05 werden die Unterschiede der gemessenen PSA-Konzentrationen als signifikant gewertet. Demnach waren die Unterschiede der PSA-Konzentrationen im Vergleich der PLE- mit den PSE-Zellen nach 24 h und 48 h ohne DHT-Stimulation signifikant. Zudem waren sie beim Vergleich der PLE-Zellen mit den nativen Zellen nach 24 h ohne hormonelle Stimulation sowie nach 48 h mit und ohne Stimulation durch DHT signifikant. Ein weiterer signifikanter Unterschied der PSA-Mittelwerte lieferte der t-Test der PSE-Zellen mit den nativen Zellen nach 24 h ohne DHT-Stimulation. Alle anderen berechneten p-Werte waren



oberhalb des Grenzwertes, sodass ihre Unterschiede der PSA-Mittelwerte nicht signifikant waren. Die Ergebnisse des doppelseitigen t-Tests zwischen den unterschiedlichen LNCaP-Zellen kann man Tabelle 4.2 entnehmen.



**Abbildung 4.10: Berechnete PSA-Mittelwerte der LNCaP-Zellen aus den beiden Versuchsreihen.** Dargestellt sind die Mittelwerte der PSA-Konzentrationen, welche zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Stimulation durch DHT beziehungsweise ohne Stimulation gemessen wurden. Als Versuchsansätze dienten native (blau) sowie mit verschiedenen Plasmidkonstrukten PLE (orange), PSE (violett) und PE (gelb) stabil transfizierte LNCaP-Zellen. Die Standardabweichungen sind durch schwarze T-Balken dargestellt.

Zusammenfassend ergeben sich somit in den stimulierten LNCaP-Zellen in den beiden durchgeführten Versuchsansätzen verschiedene Reihenfolgen für die PSA-Konzentration. Hierbei fällt auf, dass die Reihenfolge in den beiden Versuchsansätzen nicht gleich ist. Lediglich die ermittelte PSA-Konzentration in den mit PLE transfizierten Zellen, welche zu einer Überexpression des funktionellen TRPM5-Ionenkanals führen, ist in beiden Versuchsansätzen und damit auch im Mittel am größten. Ansonsten ist die Reihenfolge nicht einheitlich. Dennoch sind die gemessenen PSA-Konzentrationen in den nativen Zellen tendenziell gering, da sie zu allen Versuchsbedingungen im Vergleich zu den transfizierten Zellen am niedrigsten oder zweitniedrigsten sind.

**Tabelle 4.2: Doppelseitiger t-Test mit den Mittelwerten der PSA-Konzentrationen der LNCaP-Zellen.**

Durchgeführt wurde der doppelseitige t-Test mit den drei verschiedenen stabil transfizierten (PLE, PSE und PE) sowie den nativen LNCaP-Zellen. Die hierfür verwendeten Mittelwerte der PSA-Konzentrationen wurden 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation beziehungsweise ohne Stimulation der Prostata-Zellen bestimmt. Blau hervorgehoben sind die signifikanten Ergebnisse des doppelseitigen t-Tests.

<b>Doppelseitiger t-Test</b>			
<u>Versuchsbedingungen</u>	<b>PLE mit PE (p-Wert)</b>	<b>PLE mit PSE (p-Wert)</b>	<b>PLE mit nicht transfizierten Zellen (p-Wert)</b>
24 h, 100 nM DHT	0,0813	0,177	0,081
24 h, 0 nM DHT	0,0899	<b>0,016</b>	<b>0,004</b>
48 h, 100 nM DHT	0,0570	0,147	<b>0,029</b>
48 h, 0 nM DHT	0,3651	<b>0,024</b>	<b>0,006</b>
	<b>PSE mit PE (p-Wert)</b>	<b>PSE mit nicht transfizierten Zellen (p-Wert)</b>	<b>PE mit nicht transfizierten Zellen (p-Wert)</b>
24 h, 100 nM DHT	0,1506	0,1778	1
24 h, 0 nM DHT	0,9644	<b>0,0401</b>	0,2997
48 h, 100 nM DHT	0,2553	0,0725	0,9017
48 h, 0 nM DHT	0,7306	0,2084	0,3921

## 5 Diskussion

Der Expressionsnachweis von *TRPM5* insbesondere in der Leber, Niere, Herz, Gehirn, Darm, den Geschmacksrezeptorzellen sowie Drüsengewebe wie dem Pankreas und der Prostata (Prawitt *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2002; Fonfria *et al.*, 2006) gab Anlass dazu, seine physiologische Funktion in mehreren dieser Gewebe zu untersuchen. So konnte in Zusammenhang mit *TRPM5* ein Sekretions-assoziiertes Mechanismus bei der Geschmackswahrnehmung der drei Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami (Pérez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003), der Insulin-Sekretion im Pankreas (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010) sowie der Mucin-Sekretion im Colon (Mitrovic *et al.*, 2013) nachgewiesen werden.

Bei der Geschmackswahrnehmung kommt es nach der Bindung der Geschmackstoffe an ihre Rezeptoren zu einem Signaltransduktionsmechanismus, welcher zu einem raschen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und hierüber zur Aktivierung des *TRPM5*-Ionenkanals führt (Liu *et al.*, 2003). Der anschließende  $\text{Na}^+$ -Einstrom über *TRPM5* resultiert in der Depolarisation der Zellmembran. Diese Depolarisation ist grundlegend dafür, dass in Folge das gustatorische Signal an das ZNS weitergeleitet wird (Zhang *et al.*, 2007). Auch in den  $\beta$ -pankreatischen Zellen führt die Depolarisation infolge der *TRPM5*-Aktivierung zur Sekretion des blutzuckersenkenden Hormons Insulin. Auf diese Weise wird die Insulinsekretion im Pankreas über einen von den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle unabhängigen Nebenweg feinjustiert (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). In den Becherzellen des Colons hingegen ist ein aufgebauter Protonengradient grundlegend für die Sekretion des Gel-bildenden Mucin 5AC. Der Protonengradient selber entsteht durch einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom, welcher erst durch die Aktivierung von *TRPM5* ermöglicht wird (Mitrovic *et al.*, 2013).

Die beschriebenen Sekretionsmechanismen im Zusammenhang mit *TRPM5* führten zu der Frage, ob der Ionenkanal auch in weiteren Geweben eine Rolle bei der Sekretion von Botenstoffen spielt. Dies wiederum war die Grundlage für die zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Nämlich, ob *TRPM5* auch die Sekretion vom PSA in der Prostata beeinflusst.

### 5.1 Expression von *TRPM5* und *PSA* in der Prostata

Da eine gewebespezifische Expression von *TRPM5* in der Prostata zuvor bereits beschrieben werden konnte (Prawitt *et al.*, 2000, Fonfria *et al.*, 2006), war seine Expression in den hier untersuchten Zelllinien aus dem Prostatakarzinom zu erwarten.

Es wurden Tumorzellen zur Untersuchung dieser Fragestellung verwendet, da vor allem beim Prostatakarzinom die Sekretion des Tumormarkers PSA diagnostisch bedeutsam ist (Thompson, 2006). Für die Expressionsanalyse wurden folgende drei Zelllinien aus dem Prostatakarzinom verwendet: LNCaP-, BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen. Da zwei Spleißvarianten des humanen TRPM5 bekannt sind, wurde sowohl die Expression von TRPM5-long als auch von TRPM5-short untersucht.

Allerdings konnte mithilfe der PCR eine *TRPM5*-Expression für die lange und auch die kurze Spleißvariante lediglich in den untersuchten LNCaP- und BM1604-Zellen nachgewiesen werden. In den PC<sub>3</sub>-Zellen hingegen kam es zu keinem Expressionsnachweis von TRPM5-long oder TRPM5-short (siehe 4.1.1). Da PC<sub>3</sub>-Zellen anders als LNCaP-Zellen eine sehr hohe Tumorigenität aufweisen und ihnen der Androgen-Rezeptor fehlt (Tai *et al.*, 2011), sind sie eventuell zu weit entfernt von einer funktionellen Prostatazelle. Das heißt, die PC<sub>3</sub>-Zellen haben ihre physiologischen Funktionen so stark verändert, dass sie zum einen manche Gene wie hier TRPM5-long und TRPM5-short nicht mehr exprimieren. Zum anderen sind sie für die Stimulation durch Androgene unempfindlich, weshalb sie in den folgenden Stimulationsversuchen mittels DHT nicht untersucht wurden (siehe 4.3).

Um die mögliche physiologische Funktion des TRPM5-Ionenkanals bei der Sekretion von PSA in der Prostata untersuchen zu können, muss *PSA* in den untersuchten Zelllinien allerdings ebenfalls exprimiert werden. Daher wurde seine Expression in den drei genannten Zelllinien ebenfalls analysiert. Hier zeigte sich, dass *PSA* lediglich in den LNCaP-Zellen, nicht aber in den BM1604- oder PC<sub>3</sub>-Zellen exprimiert wird. Alle drei Zelllinien entstammen Metastasen des Prostatakarzinoms (siehe 3.6.11). Damit sind die BM1604-Zellen vermutlich ebenfalls so stark verändert, dass auch ihre Expression von der der nativen Prostatazellen abweicht. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass beide Zelllinien *PSA* nicht exprimieren. In LNCaP-Zellen hingegen scheint die Funktion weniger stark von der einer Prostatazelle aus einem gesunden Gewebe abzuweichen, sodass sie weiterhin alle untersuchten Gene exprimieren.

Anschließend wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) die relative Expressionsstärke von *PSA* sowie von *hK2*, ein humanes Kallikrein, welches beim Prostatakarzinom ebenfalls als Serummarker dient, analysiert. Genauso wie *PSA* trägt es zur Verflüssigung des Seminalplasmas bei, indem es Seminogelin I und II spaltet. Allerdings hydrolysiert es die Peptidbindungen beider Substrate an anderen Stellen und mit geringerer Effizienz als *PSA* (Holdenrieder und Stieber, 2019). Damit adressiert auch *hK2* eine physiologische Funktion der Prostata. Unter anderem im

Prostata- und Mammakarzinom wurde eine dysregulierte Expression beider Tumormarker beobachtet (Holdenrieder und Stieber, 2019) Für *hK2* ist bekannt, dass seine Expression mit der Schwere des Prostatakarzinoms zunimmt (Timmermand *et al.*, 2019). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass er für den Nachweis eines Prostatakarzinoms sowie dessen Prognose hilfreich ist (Satkunasivam *et al.*, 2014), weshalb hier die Expression beider Tumormarker untersucht wurde. Die qRT-PCR diente hierbei im Vergleich zu einer PCR dazu, auch quantitative Aussagen über die Expression beider Tumormarker machen zu können.

In den untersuchten LNCaP-Zellen kam es zu einer starken Expression von *PSA*, wohingegen die CP-Mittelwerte der BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen gegen eine Expression des Tumormarkers in diesen beiden Zelllinien sprechen (siehe 4.1.2.). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der einfachen Expressionsanalysen, wonach es lediglich in den LNCaP-, nicht aber in den BM1604- oder PC<sub>3</sub>-Zellen zur Expression von *PSA* kommt (siehe 4.1.1).

Für den Tumormarker *hK2* verhielt es sich sehr ähnlich. Auch hier konnte lediglich in den LNCaP-Zellen eine starke Expression des Gens nachgewiesen werden. Somit wird nicht nur *PSA*, sondern auch *hK2* in den BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen vermutlich nicht exprimiert (siehe Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1: Expression von TRPM5-long, TRPM5-short, PSA und hK2 im Prostatakarzinom**

Dargestellt ist eine Übersicht der Expression beziehungsweise der relativen Expressionsstärke von TRPM5-long, TRPM5-short, *PSA* sowie *hK2* in den LNCaP-, BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen, welche alle drei aus dem Prostatakarzinom stammen. Mittels PCR konnte eine Expression von TRPM5-long und TRPM5-short sowohl in den LNCaP- als auch in den BM1604-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen es in den PC<sub>3</sub>-Zellen zu keinem Expressionsnachweis kam. Eine deutliche Expression der beiden Tumormarker *PSA* und *hK2* wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR lediglich in den LNCaP-Zellen nachgewiesen, wohingegen es in den BM1604- und PC<sub>3</sub>-Zellen zu keiner Expression dieser kam.

	<b>TRPM5-long</b> <b>Expression</b>	<b>TRPM5-short</b> <b>Expression</b>	<b>PSA</b> <b>relative Expressionsstärke</b>	<b>hK2</b> <b>relative Expressionsstärke</b>
<b>LNCaP</b>	ja	ja	deutliche Expression	deutliche Expression
<b>BM1604</b>	ja	ja	keine Expression	keine Expression
<b>PC<sub>3</sub></b>	nein	nein	keine Expression	keine Expression

Aus den genannten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich die hier untersuchten LNCaP-Zellen am besten für meine Fragestellung eignen, da sie alle dafür

betrachteten Gene exprimieren. Darüber hinaus suggeriert die gezeigte Expression, dass TRPM5 eine Rolle bei den physiologischen Prostatafunktionen haben könnte. Seine mögliche Funktion bei der PSA-Sekretion zu untersuchen, war das zentrale Ziel dieser Arbeit (siehe 5.3).

## 5.2 Lokalisation des TRPM5-Ionenkanals in Prostatakarzinom-Zellen

Im Folgenden wurde die Lokalisation des TRPM5-Ionenkanals innerhalb der Zellen im Prostatakarzinom visualisiert. Hierfür wurden stabil transfizierte und erfolgreich selektionierte LNCaP- und BM1604-Zellen verwendet. PC<sub>3</sub>-Zellen wurden hierfür nicht verwendet, da in den gezeigten Untersuchungen herauskam, dass diese Tumorzellen von sich aus *TRPM5* nicht exprimieren.

Sowohl bei den stabil transfizierten LNCaP-, als auch bei den BM1604-Zellen, welche jeweils die lange Spleißvariante von TRPM5 enthielten (PLE) und auch bei denjenigen, welche die kurze Spleißvariante von TRPM5 in ihr Genom integriert hatten (PSE), fluoreszierte überwiegend die Plasmamembran. Im Gegensatz hierzu kam es in den LNCaP- und BM1604-Zellen, welche lediglich das PE-Plasmid mit *eGFP*, nicht aber *TRPM5* enthielten und daher als Kontrolle dienten, zur starken Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma der Tumorzellen (siehe Abbildung 4.8 und 4.9).

Die Visualisierung diente zum einen dazu, den Erfolg der stabilen Transfektion anschließend an die Selektionierung zu bestätigen. Zum anderen zeigte sie die subzelluläre Lokalisation des Ionenkanals innerhalb der Plasmamembran. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da bereits aus der Literatur bekannt ist, dass TRP-Ionenkanäle in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert sind (Brixel, 2009). Allerdings finden sich diese Ionenkanäle teilweise auch in der Membran des ERs oder der Lysosomen (Venkatachalam *et al.*, 2006). Diese subzelluläre Lokalisation konnte hier nicht aufgezeigt werden. Wollte man seine exakte Lokalisation innerhalb der Zelle untersuchen, hätte man mit Co-Färbungen arbeiten müssen. Hierfür wären neben TRPM5 etablierte Marker aus dem zu untersuchenden Zellkompartiment vonnöten gewesen. Die zu untersuchenden Tumorzellen hätten dann genauso wie hier zusätzlich zu TRPM5 mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff stabil transfiziert und anschließend mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie betrachtet werden können. In Folge hätte seine physiologische Funktion in der Prostata genauer untersucht werden können, da sich eventuell zusätzliche Lokalisationen des TRPM5-Ionenkanals innerhalb der Tumorzellen gezeigt hätten.

### 5.3 Einfluss von TRPM5 auf die PSA-Sekretion in der Prostata

Wie beschrieben ist für den TRPM5-Ionenkanal bekannt, dass er bei verschiedenen Sekretionsmechanismen von Botenstoffen involviert ist. Dies führte in der vorliegenden Dissertation zu der Fragestellung, ob TRPM5 auch bei der Sekretion von PSA oder hK2 in der Prostata eine physiologische Funktion übernimmt. Hier wurde zunächst der mögliche Einfluss auf die PSA-Sekretion untersucht. In folgenden Studien könnte man ähnliche Untersuchungen für hK2 anstreben. Falls TRPM5 einen Einfluss auf die Sekretion von PSA haben sollte, würde die Überexpression von TRPM5 in den untersuchten Zelllinien aus dem Prostatakarzinom die Sekretion des Tumormarkers positiv oder negativ beeinflussen.

Neben den PC<sub>3</sub>-Zellen erwiesen sich die BM1604-Zellen für die Betrachtung eines möglichen Einflusses von TRPM5 auf die PSA-Sekretion als ungeeignet. Trotz Stimulation durch DHT kam es sowohl in den nativen, als auch in den stabil transfizierten Zellen zu keinem Messzeitpunkt zu seiner Freisetzung. Damit zeigen die Stimulationsversuche mit den BM1604-Zellen, dass TRPM5 nicht die Bildung von PSA induziert. Denn obwohl diese Zelllinie *TRPM5* exprimiert, kam es in ihnen nicht zur Sekretion des Tumormarkers. Daher übernimmt TRPM5 wenn dann eine regulatorische und nicht eine induzierende Funktion bei der Freisetzung von PSA aus den Prostatazellen. Allerdings wurden die Stimulationsversuche hier lediglich für die nicht-transfizierten Zellen zu allen Messzeitpunkten durchgeführt. Zusätzlich wurden diese leben Sekretionsanalysen für die mit PLE transfizierten Zellen nach 96 h durchgeführt. In allen genannten Versuchsansätzen ist die gemessene PSA-Konzentration nach Stimulation durch DHT unter der Nachweisgrenze. Daher wurde bei dieser Zelllinie auf weitere Versuchsansätze zu anderen Messzeitpunkten in den mit PLE transfizierten Zellen sowie auf alle Messzeitpunkte in den mit PSE beziehungsweise PE transfizierten Zellen verzichtet. Um eine abschließende Aussage über den funktionellen Zusammenhang von TRPM5 und PSA in den BM1604-Zellen treffen zu können, müsste die PSA-Sekretion allerdings in allen drei Vektorkonstrukten zu allen Zeitpunkten mehrfach gemessen werden.

Die weiteren Stimulationsversuche wurden daher lediglich in den LNCaP-Zellen durchgeführt. Sowohl die nativen als auch die mit den drei Plasmidkonstrukten stabil transfizierten Zellen (PLE, PSE und PE) wurden verwendet und die jeweiligen Ansätze zu jedem Messzeitpunkt als Duplikat mit 100 nM DHT stimuliert. Je ein weiteres Duplikat ohne DHT-Stimulation diente als Kontrolle und sollten Aufschluss über die Stimulierbarkeit der Tumorzellen geben. Als Zeitpunkte zur radioimmunologischen

Messung der sekretierten PSA-Menge wurden 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 96 h gewählt. In diesem Zeitraum ging man von einer messbaren Änderung der PSA-Konzentration aus, sollte der TRPM5-Ionenkanal eine regulatorische Funktion bei der Freisetzung des Tumormarkers besitzen. Der Grund für den gewählten Messzeitraum liegt in der allgemeinen zeitlichen Sekretion von Proteinen, welche sich in der Regel nach hormoneller Stimulation bis zur Freisetzung des Proteins aus der Zelle im Stundenbereich bewegt. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Freisetzung der beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und in geringerem Maße Trijodthyronin (T3), welche durch das Hormon Thyreotropin (TSH) nach dessen Freisetzung in der Adenohypophyse stimuliert wird. Die Sekretion von TSH selbst wird durch das Hormon Thyreoliberin (TRH) aus dem Hypothalamus stimuliert (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2016). Während T3 nach der Freisetzung aus den Schilddrüsenzellen eine Halbwertszeit von etwa einem Tag hat, liegt diese bei T4 bei etwa sieben Tagen. Damit ist die Halbwertszeit des T4 Hormons sechs bis sieben Mal länger als die des biologisch aktiven T3 Hormons (Bauer und Wassner, 2019).

### 5.3.1 Erste Versuchsreihe

Nach 1 h, 3 h und 6 h sind die gemessenen PSA-Konzentrationen in den mit DHT stimulierten und nicht-stimulierten Zellen etwa gleich groß. Die Unterschiede zwischen den nativen Zellen und den unterschiedlich stabil transfizierten Zellen ist ebenfalls sehr gering. Somit lässt sich zu diesen frühen Messzeitpunkten keine Aussage darüber treffen, ob die untersuchten LNCaP-Zellen abhängig von der Menge des funktionellen TRPM5-Kanals mehr oder weniger zur Sekretion von PSA stimuliert werden können oder nicht. Des Weiteren scheint die Menge des funktionellen TRPM5-Ionenkanals zu diesen Zeitpunkten unerheblich für die Freisetzung des Tumormarkers aus den Prostatakarzinom-Zellen zu sein.

Anders sieht es zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 96 h nach DHT-Stimulation aus. Hier ist die gemessene PSA-Konzentration in den durch DHT stimulierten Zellen deutlich höher als in den nicht-stimulierten Zellen. Dies ist sowohl für die nativen Zellen als auch für die unterschiedlich stabil transfizierten Zellen der Fall. Sowohl 24 h als auch 48 h nach DHT-Stimulation ist die ermittelte PSA-Konzentration in den mit PLE stabil transfizierten Zellen am höchsten. Da diese Zellen zu einer stärkeren Expression von TRPM5-long führen, scheint der funktionelle Ionenkanal zu diesen Zeitpunkten einen stimulierenden Einfluss auf die Freisetzung von PSA zu haben. Die zweithöchste PSA-Sekretion kann man zu beiden Messzeitpunkten in den mit PE stabil transfizierten



Zellen beobachten. Diese exprimieren keine zusätzlichen Ionenkanäle, weshalb hier nur das über das Plasmid artifiziiell eingebrachte und exprimierte *eGFP* die Sekretion von PSA positiv beeinflussen könnte. Diese Zellen dienten über eine mögliche Visualisierung ihrer subzellulären Lokalisation als Kontrolle der erfolgreichen stabilen Transfektion, weshalb ihr Einfluss auf die Sekretion von PSA nicht zu erwarten war. Die zweitniedrigste PSA-Konzentration wurde nach 24 h und 48 h in den mit PSE stabil transfizierten Zellen gemessen. Da diese Zellen lediglich zu einer verstärkten Expression der kurzen Spleißvariante von TRPM5 und dem artifiziiell eingebrachten *eGFP* führen, scheint der Einfluss von TRPM5-short auf die Sekretion des Tumormarkers wenn überhaupt nur sehr gering zu sein. Die niedrigste Sekretion von PSA wurde allerdings zu beiden Messzeitpunkten in den nativen Zellen gemessen, welche neben dem natürlich vorkommenden TRPM5-Ionenkanal keine weiteren artifiziiell eingebrachten Proteine exprimieren. 96 h nach der Stimulation durch DHT ergibt sich eine andere Reihenfolge der freigesetzten PSA-Konzentration: PSE > PE > PLE > nativ. Damit zeigen die nativen Zellen weiterhin die niedrigste PSA-Sekretion, die der transfizierten Zellen ist immer höher. Allerdings hätte man erwartet, dass die der mit PLE transfizierten Zellen nicht die zweitniedrigste, sondern die höchste Freisetzung des Tumormarkers aufweisen. Daher scheint nach 96 h der Einfluss des funktionellen TRPM5 Ionenkanals auf die PSA-Sekretion wenn überhaupt nur marginal zu sein.

### 5.3.2 Zweite Versuchsreihe

Da es sich 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation vermutlich um die relevanten Messzeitpunkte handelt, bei denen ein deutlicher Einfluss des TRPM5-Ionenkanals auf die PSA-Sekretion in der Prostata beobachtet werden konnte, wurde zu diesen beiden Zeitpunkten eine zweite Versuchsreihe durchgeführt. Die PSA-Werte waren in den stimulierten Zellen erneut deutlich höher als in den nicht-stimulierten Zellen, die Reihenfolge der Höhe der jeweiligen PSA-Konzentration war allerdings nicht identisch. Auch hier war der Mittelwert der PSA-Konzentration in den mit PLE stabil transfizierten Zellen immer am höchsten, welche zu einer verstärkten Expression des funktionellen *TRPM5* führen. Somit wurde der stimulierende Einfluss des funktionellen TRPM5-Ionenkanals auf die PSA-Sekretion in den LNCaP-Zellen hier bestätigt. Die zweithöchste PSA-Konzentration wurde diesmal zu beiden Messzeitpunkten in den mit PSE stabil transfizierten Zellen beobachtet. Somit lässt sich ein positiver Einfluss der kurzen Spleißvariante von TRPM5 auf die Sekretion des Tumormarkers aus der Prostata nicht sicher ausschließen. Verwunderlich war allerdings, dass in der zweiten

Versuchsreihe die PSA-Konzentration in den nativen Zellen zu beiden Zeitpunkten höher war als in den mit PE stabil transfizierten Zellen aus der Prostata. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe, in der die PSA-Sekretion in den mit PE stabil transfizierten Zellen nicht am niedrigsten, sondern am zweithöchsten war. Aus diesem Grund lässt sich über diejenigen Zellen, welche als Kontrolle der Transfektion dienten, ebenfalls keine Aussage darüber treffen, ob sie bei der Sekretion von PSA eine regulatorische Funktion übernehmen. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht verwunderlich, da nicht davon auszugehen war, dass der verwendete fluoreszierende Farbstoff die intrazelluläre Sekretion eines Serummarkers wie PSA modifizieren kann. Die nativen Zellen zeigen in dieser Versuchsreihe die zweitniedrigste PSA-Sekretion, wohingegen sie in der ersten die niedrigste aufwiesen, weshalb auch über sie keine ganz sichere Aussage getroffen werden kann. Weitere Studien könnten Aufschluss darüber geben, welche der beiden Versuchsreihen das Expressionsniveau von TRPM5-long, TRPM5-short und *eGFP* in den jeweiligen Zellen besser widerspiegelt und demnach zu einer realistischeren Sekretion von PSA in der Prostata führt. Somit lässt sich bisher lediglich über die PLE-Zellen eine relativ sichere Aussage treffen.

### 5.3.3 Mittelwert beider Versuchsreihen

Um die Gesamtaussage zu beschreiben, wurden aus ihnen jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Dies konnte lediglich zu den Messzeitpunkten 24 h und 48 h nach DHT-Stimulation gemacht werden, da zu den weiteren Zeitpunkten lediglich eine Versuchsreihe durchgeführt wurde. Die erste Versuchsreihe deutet an, dass die PSA-Sekretion 1 h, 3 h, 6 h und 96 h nach Stimulation durch DHT nicht sicher mit der Menge des funktionellen TRPM5 Ionenkanals zu korrelieren scheint. Zu den frühen Zeitpunkten sind die Unterschiede der PSA-Konzentration zwischen den nativen und unterschiedlich transfizierten Zellen zum einen nur sehr gering. Zum anderen sind die mittels RIA gemessenen Werte in den nicht-stimulierten Zellen teilweise höher als in den mit DHT stimulierten Zellen, sodass hier die Stimulation der Zellen die Sekretion des Tumormarkers anscheinend nicht beeinflusst. So ist beispielsweise in den PLE-Zellen sowohl nach 1 h als auch nach 3 h die gemessene PSA-Konzentration in den nicht-stimulierten Zellen höher als in den stimulierten. 96 h nach Versuchsbeginn ist die PSA-Konzentration zwar in den stimulierten Zellen stets höher als in den nicht-stimulierten, allerdings ist die PSA-Konzentration in den PLE-Zellen lediglich am zweitniedrigsten. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da davon ausgegangen wurde,

dass der funktionelle TRPM5-Ionenkanal die Sekretion von PSA positiv beeinflusst. Dies scheint dort auch der Fall zu sein, da seine ermittelte Konzentration zumindest höher ist als in den nativen Zellen. Allerdings wurden in den mit PSE beziehungsweise PE transfizierten Zellen jeweils leicht höhere Konzentrationen gemessen (siehe Abbildung 4.9). Entsprechen dies der Realität, würde die kurze Spleißvariante von TRPM5 zur stärksten und das Kontroll-Plasmidkonstrukt, zur zweitstärksten Sekretion von PSA führen. Die genannten Ergebnisse findet man allerdings nur zu einem Messzeitpunkt, sodass sie sehr wahrscheinlich nicht die Realität widerspiegeln. Da über die funktionelle Rolle der kurzen Spleißvariante von TRPM5 bisher nur sehr wenig bekannt ist, kann man hierzu weiterhin keine Aussage treffen.

Sowohl 24 h als auch 48 h nach DHT-Stimulation ist der Mittelwert der PSA-Konzentration in den mit PLE stabil transfizierten Zellen am höchsten. Der zweithöchste Mittelwert der PSA-Konzentration ist zu beiden Zeitpunkten in den mit PSE transfizierten Zellen zu finden. 24 h nach DHT-Stimulation ist der zweitniedrigste beziehungsweise der niedrigste Mittelwert der PSA-Sekretion nicht sicher, da sie sowohl in den mit PE stabil transfizierten als auch in den nativen Zellen aus der Prostata gleich niedrig ist. Dies deutet darauf hin, dass nach 24 h die Expression von TRPM5-short keinen Einfluss auf die Sekretion von PSA hat. Selbst wenn eine eindeutige Reihenfolge beim Mittelwert berechnet worden wäre, hätte man ihn nur bedingt berücksichtigen können. Hierfür müssten die Ergebnisse der PSA-Konzentrationen in beiden Versuchsreihen eindeutig sein. Somit lässt sich über den Einfluss der kurzen Spleißvariante von TRPM5 auf die Freisetzung von PSA in der Prostata zu diesem Messzeitpunkt aktuell keine sichere Aussage machen. Auch für die nativen Zellen ist der ermittelte Mittelwert der PSA-Konzentration nach 24 h nicht aussagekräftig, da sie in den zwei Untersuchungen jeweils zu einer unterschiedlichen Reihenfolge führte. In der ersten wurde bei ihnen die niedrigste und in der zweiten Messung die zweitniedrigste PSA-Konzentration gemessen. 48 h nach Stimulation ist der Mittelwert der PSA-Sekretion in den nativen Zellen minimal höher als in den mit PE stabil transfizierten Zellen. Würde man annehmen, dass dies der Realität entspricht, hätte die kurze Spleißvariante von TRPM5 nach 48 h Zeitpunkt einen negativen Einfluss auf die Freisetzung von PSA, da sie im Vergleich zu den nativen Zellen, welche nur die natürlich vorkommende lange Spleißvariante von TRPM5 exprimieren, höher ist. Dieser Zusammenhang war zum einen nicht zu erwarten, da wenn dann von einem positiven Einfluss des Ionenkanals auf die Sekretion von PSA ausgegangen wurde. Zum anderen kann man dieses Ergebnis nicht verwerten, da in

beiden Versuchsreihen unterschiedliche Reihenfolgen der PSA-Konzentration gemessen wurden.

Bei einer globalen Betrachtung der Mittelwerte beider Versuchsreihen für sich, aber auch im Vergleich beider miteinander fällt auf, dass die mit PLE transfizierten Zellen immer mehr PSA sezerniert haben als die nativen LNCaP-Zellen, welche lediglich das endogen vorhandene TRPM5-long exprimieren. Darüber hinaus überstieg in ihnen die PSA-Sekretion immer die der mit PE oder PSE transfizierten Zellen, was ebenfalls zu erwarten war (siehe Abbildung 4.11).

#### 5.3.4 Standardabweichung

Um eine Aussage über die Streuung der einzelnen PSA-Konzentrationen treffen zu können, wurde im folgenden Schritt die Standardabweichung der jeweils berechneten Mittelwerte zu den jeweiligen Versuchsbedingungen in allen Zellen und zu allen Messzeitpunkten berechnet. Je größer die berechnete Standardabweichung war, desto weiter streuten die einzelnen PSA-Mittelwerte um einen gemeinsamen Schwerpunkt. In den hier durchgeführten Berechnungen flossen keine Rohdaten-Werte aus beiden Versuchsreihen ein, sondern die Mittelwerte aus den jeweiligen Mittelwerten der PSA-Konzentrationen. Diese Herangehensweise verringert die Exaktheit der Ergebnisse, gibt allerdings eine grobe Übersicht über den Trend der gemessenen PSA-Konzentrationen an. Für eine exaktere Aussage müsste man die einzelnen PSA-Werte aus beiden Versuchsreihen heranziehen, bevor von den im Duplikat ermittelten Konzentrationen ein gemeinsamer Mittelwert berechnet wurde. Zunächst fällt auf, dass die Standardabweichungen in den stimulierten Zellen deutlich größer ist als in den nicht-stimulierten. Dies liegt vermutlich daran, dass die PSA-Konzentrationen nach Stimulation durch DHT generell deutlich höher sind als ohne Stimulation der LNCaP-Zellen. Je größer einzelne Werte sind, die in die Berechnung einfließen, desto wahrscheinlicher ist auch eine größere Streuung der Werte um ihren gemeinsamen Schwerpunkt. Die größte Differenz zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen findet sich bei den mit PLE stabil transfizierten Zellen nach 48 h. Hier liegt die Standardabweichung der stimulierten und stabil transfizierten Zellen bei etwa 17,46 ng/ml, bei den nicht-stimulierten Zellen bei lediglich etwa 1,94 ng/ml. Die Differenz beider Standardabweichungen von etwa 15,52 ng/ml verdeutlicht, dass die Differenz der Streuung bei diesen Versuchsbedingungen insgesamt am höchsten war. Auf der anderen Seite ist der Unterschied der Standardabweichungen bei den mit PE-Zellen nach 24 h am geringsten. Während diese bei den stimulierten Zellen bei etwa

4,04 ng/ml liegt, ist sie bei den nicht-stimulierten Zellen mit einem Wert von etwa 1,97 ng/ml nur etwas geringer. Die Differenz beider Werte ergibt lediglich 2,07 ng/ml, was darauf hindeutet, dass unter diesen Versuchsbedingungen nur geringe Unterschiede in der Streuung beobachtet wurden. Auch diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, da die Zahlenwerte, die zur Berechnung der jeweiligen Standardabweichung herangezogen wurden, bei den stimulierten PLE-Zellen nach 48 h deutlich höher ist als bei den stimulierten PE-Zellen nach 24 h. Zudem ist unter diesen Versuchsbedingungen der Unterschied der PSA-Konzentrationen zwischen den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen relativ groß, vor allem verglichen mit den Zeitpunkten vor 24 h.

Die abnehmende Reihenfolge der absoluten Standardabweichungen nach 24 h sieht in den stimulierten Zellen wie folgt aus: PLE > native Zellen > PSE > PE; ohne Stimulation ergibt sich diese Reihenfolge: PE > PLE > PSE > native Zellen. 48 h nach DHT-Stimulation sieht sie folgendermaßen aus: PE > PLE > PSE > native Zellen; ohne Stimulation findet sich diese Reihenfolge: PE > PSE > PLE > native Zellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich über Reihenfolgen der absoluten Standardabweichungen für die PSA-Konzentrationen keine Aussage treffen lässt, da sie bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen jedes Mal anders sind. Die geringste Standardabweichung findet sich nach 48 h in den nativen, nicht-stimulierten LNCaP-Zellen. Die größte beobachtet man nach 48 h in den mit PLE transfizierten Zellen, die durch DHT stimuliert wurden. Demnach war die Streuung der Mittelwerte der PSA-Konzentrationen hier besonders hoch.

Die Streuung von Messwerten kann durch eine unterschiedlich genaue Arbeitsweise oder die verwendeten Messverfahren während der Durchführung der Experimente bedingt sein. Somit gibt es systematische und zufällige Messfehler, die je nach Untersucher und Untersuchungsbedingungen teilweise recht groß ausfallen können. Das RIA hat sich in der Tumordiagnostik zur Bestimmung der PSA-Konzentration etabliert, da es eine einfache und effektive Methode ist, mit welcher bereits geringste Mengen des Serummarkers nachgewiesen werden können (El-Bayoumy *et al.*, 2018). Deshalb ist es meiner Meinung nach sinnvoll, hieran auch in folgenden Studien festzuhalten und damit die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse zu erhalten. Da Messabweichungen, die durch eine unterschiedlich genaue Arbeitsweise bedingt sind, zufällig entstehen, wären weitere Versuchsreihen unter den gleichen Bedingungen sinnvoll. Aufgrund der größeren Datenmenge könnten sich diese zufälligen Messfehler statistisch minimieren, weshalb dann verlässlichere Aussagen über die reellen

Unterschiede der jeweiligen PSA-Konzentrationen getroffen werden könnten. Da hier humane Zellkulturen und nicht Gewebeproben aus einem Gesamtorganismus verwendet wurden, müssen die gemessenen PSA-Konzentrationen nicht zwingend der Realität entsprechen. Durch die Kultivierung außerhalb des menschlichen Körpers ergeben sich Umgebungsbedingungen, die nicht denen eines Gesamtorganismus entsprechen. Nach Gewinnung von Prostata-Gewebeproben könnte dieselbe Fragestellung in Stimulationsversuchen untersucht werden. Dies gewonnen Ergebnisse würden dann die vorhandenen Verhältnisse im Körper der Probanden besser widerspiegeln. Solche Studien durchzuführen, sind zeit- und kostenintensiver. Zudem wäre dieses Vorgehen aufwendiger, da hierfür nicht nur Gewebeproben entnommen, sondern auch für die Stimulationsversuche aufbereitet werden müssten. Aus diesem Grund werden insbesondere bei größeren Studien gerne humane Zellkulturen verwendet, von denen ausgegangen werden kann, dass sie die zu untersuchende Fragestellung möglichst realitätsnah widerspiegeln.

#### 5.3.5 Doppelseitiger t-Test

Im letzten Schritt wurden erneut die Mittelwerte beider Versuchsreihen verwendet, um in einem doppelseitigen t-Test die Signifikanz der Unterschiede der gemessenen PSA-Konzentrationen zu berechnen. Dieser Test konnte nachweisen, dass die Unterschiede der PSA-Konzentrationen bei den mit PLE transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit PSE transfizierten Zellen 24 h und 48 h ohne Stimulation durch DHT signifikant sind, da hier der berechnete Wert  $< 0,05$  ist. Ebenfalls als signifikant erwies sich der Unterschied der PSA-Konzentrationen bei den PLE-Zellen verglichen mit den nativen Zellen nach 24 h ohne sowie nach 48 h mit und ohne DHT-Stimulation. Zusätzlich war der Unterschied der ermittelten PSA-Konzentrationen bei den PSE-Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen 24 h ohne DHT-Stimulation signifikant. Demnach zeigten sich bei den genannten Zellen eindeutig Unterschiede der PSA-Konzentrationen, weshalb ihre Unterschiede der PSA-Konzentrationen anzunehmen sind. Auffallend ist, dass bis auf einen Wert die Unterschiede der PSA-Konzentrationen immer beim Vergleich von PLE- mit anderen Zellen signifikant ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Einbringen des Plasmids, welcher zu einer Überexpression des funktionellen *TRPM5* führt, die PSA-Sekretion in LNCaP-Zellen nach 24 h und 48 h positiv beeinflusst. Diese modifizierte Sekretion könnte eventuell unabhängig von der Stimulation durch DHT sein, da vor allem ohne Hinzufügen des Androgens PSA-Konzentrationen gemessen wurden, deren Unterschied im Vergleich zu anderen

Zellen signifikant ist. Des Weiteren zeigte sich nach 24 h ohne Stimulation bei den PSE- verglichen mit den nativen Tumorzellen ein signifikanter Unterschied ihrer PSA-Werte. Dies ist der einzige Fall, in dem ein signifikanter Unterschied berechnet wurde, ohne dass die PLE-Zellen hierbei involviert waren. Daher kann man nicht sicher sagen, ob das Einbringen des PSE Plasmids in die LNCaP-Zellen und die damit verbundene Expression der kurzen Spleißvariante von TRPM5 tatsächlich nach 24 h und 28 h zu einer modifizierten PSA-Sekretion führt. Alle weiteren Ergebnisse des doppelseitigen t-Tests im Zusammenhang mit den PLE-Zellen sprechen gegen diese Hypothese.

Die anderen Werte erwiesen sich im t-Test als nicht signifikant. Somit sind die Unterschiede der PSA-Konzentrationen, die dort gemessen wurden, nicht sicher vorhanden. Sie könnten zufällig beziehungsweise durch Messungenauigkeiten entstanden sein. Da der modifizierende Einfluss der PLE-Zellen und damit der des funktionellen TRPM5 Ionenkanals auf die PSA-Sekretion unter diesen Bedingungen noch nicht gezeigt werden konnte, kann man sie zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sicher annehmen. Allerdings gab es mehrere Werte, die nur gering über dem Grenzwert von 0,05 lagen. Vor allem die Vergleiche der PLE- mit anderen Zellen waren bis auf drei Werte von einer Signifikanz nicht weit entfernt. So sind die berechneten Unterschiede der PSA-Konzentrationen bei den PLE- verglichen mit den PE-Zellen nach 24 h mit und ohne DHT-Stimulation sowie 48 h nach Stimulation durch DHT nur leicht davon entfernt, signifikant zu sein. Nach 48 h ohne eine Stimulation durch DHT ist der Unterschied von einer Signifikanz allerdings deutlich entfernt. Auch beim Vergleich der PLE- mit den PSE-Zellen ist 24 h und 48 h nach Stimulation der Unterschied der PSA-Werte nicht signifikant. Beim Vergleich der PLE- mit den nativen Zellen findet sich 24 h nach Stimulation durch das Hormon ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von PSA. Allerdings ist der Unterschied hier mit einem Wert von 0,081 nicht weit entfernt vom Grenzwert, der als Grundlage zur Annahme oder Ablehnung der Hypothese diene. Alle weiteren Ergebnisse des doppelseitigen t-Tests weisen darauf hin, dass die jeweiligen Unterschiede der ermittelten PSA-Werte nicht anzunehmen sind und demnach nicht oder nicht sicher vorhanden sind.

Bei einer globalen Betrachtung dieser Ergebnisse zeichnet sich ab, dass fast ausschließlich bei den PLE-Zellen ein signifikanter Unterschied der PSA-Konzentration im Vergleich zu die der anderen Zellen beobachtet werden konnte. Dieser Unterschied erwies sich in fünf von zwölf Fällen als signifikant. Zudem war ein größerer Teil der Ergebnisse beim Vergleich zwischen den PLE- und den anderen

Zellen nur leicht davon entfernt, signifikant zu sein. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Menge des funktionellen TRPM5 nach 24 h und 48 h mit der Sekretion von PSA positiv korreliert. Der statistische Vergleich der PSA-Konzentration in den PSE-, PE- sowie den nativen Zellen lieferte nur einmal ein signifikantes Ergebnis, alle weiteren berechneten Unterschiede waren nicht signifikant. Damit beeinflussen die kurze Spleißvariante von TRPM5 sowie das Kontroll-Plasmid die Sekretion von PSA nach 24 h und 48 h sehr wahrscheinlich nicht.

## 5.4 Gewonnene Erkenntnisse

Die für meine Dissertation durchgeführten Experimente dienten dem gemeinsamen Ziel, den Mechanismus, welcher zur Sekretion des PSA in der Prostata führt, besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang stand die potentielle Bedeutung des TRPM5-Ionenkanals bei diesem subzellulären Prozess im Fokus. Im Folgenden sollen die Hauptkenntnisse, die aus den Versuchen gewonnen werden konnten, genauer beleuchtet werden.

### 5.4.1 Expressionsnachweis von *TRPM5*, *PSA* und *hK2* in LNCaP-Zellen

Eine Expression beider Spleißvarianten von TRPM5 konnte bei der Analyse der drei Zelllinien aus dem Prostatakarzinom lediglich in den LNCaP- und BM1604-Zellen nachgewiesen werden. Die beiden Tumormarker *PSA* und *hK2*, welche bei der Detektion von Prostatakarzinomen bedeutsam sind, werden ausschließlich in LNCaP-Zellen exprimiert.

Demzufolge eigneten sich lediglich die verwendeten LNCaP-Zellen, welche aus einer humanen Lymphknoten-Metastase eines Adenokarzinoms stammten, für die weitere Fragestellung. Denn nur wenn das funktionelle *TRPM5* sowie der Tumormarker *PSA* in den Prostatazellen co-exprimiert werden, können Fragen über ihren möglichen funktionellen Zusammenhang untersucht werden.

### 5.4.2 TRPM5 befindet sich in der äußeren Zellmembran

Die subzelluläre Lokalisation des TRPM5-Ionenkanals wurde mittels stabil transfizierten LNCaP- und BM1604-Zellen visualisiert. Das künstlich in die Zellen integrierte eGFP führt nach entsprechender Anregung zur Fluoreszenz und konnte mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop relativ genau visualisiert und detektiert werden. Während diejenigen LNCaP- und BM1604-Zellen, welche die kurze oder lange



Spleißvariante in ihr Genom integriert haben, vorwiegend in der Plasmamembran fluoreszierten, kam es in denjenigen Zellen, welche lediglich zusätzlich *eGFP* exprimierten, im gesamten Zytoplasma zu einer starken Fluoreszenz. Auch in früheren Studien konnte seine subzelluläre Lokalisation innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden. Nach Einbringen des PE Plasmids, welches lediglich zur zusätzlichen Expression von *eGFP* führt, fluoreszierte auch dort das gesamte Zytoplasma. Allerdings wurden damals keine humanen Tumorzellen, sondern humane embryonale Nierenzellen, kurz HEK 293-Zellen, untersucht (Brixel, 2009). Um eine feinere beziehungsweise exaktere Lokalisierung innerhalb der Plasmamembran oder auch an anderen subzellulären Strukturen wie dem ER aufzuzeigen, wären andere Methoden notwendig. Co-Färbungen wären hierfür eine Möglichkeit. Außerdem könnten Co-Färbungen mit bekannten Interaktionspartnern von TRPM5 Aufschluss über seine physiologische Prostatafunktion geben. Alternativ zur stabilen Transfektion mit Fluoreszenzfarbstoffen hätten *in situ*-Hybridisierungen dazu dienen können, eine möglichst exakte strukturelle Lokalisation des Ionenkanals innerhalb der Zelle zu visualisieren (Bisping, 2013). Des Weiteren könnten immunohistochemische Methoden dafür verwendet werden, die subzelluläre Lokalisation von TRPM5 zu untersuchen. Hierbei würde TRPM5 als Antigen agieren, an welchen ein fluoreszierender Farbstoff bindet und damit fluoreszenzmikroskopisch sichtbar macht. Die neu entwickelte Multiplex Immunohistochemie maximiert die Information, die aus einer einzelnen Probe gewonnen werden kann (Kalra und Baker, 2017). Gerade bei gewonnenen Tumorbiopsien ist diese Methode daher bedeutsam, da nur wenig Probenmaterial benötigt wird. Zudem ist sie zukunftsweisend für die Tumorforschung, da gleich mehrere Moleküle eines Signaltransduktionswegs gleichzeitig lokalisiert werden können. Somit gibt es mehrere Methoden, mit denen man die subzelluläre Lokalisation von TRPM5 weiter aufschlüsseln und zusätzlich Informationen über dessen physiologische Funktion in der Prostata gewinnen könnte.

#### 5.4.3 PSA-Sekretion ist in LNCaP-Zellen abhängig von der DHT-Stimulation

Für die anschließenden Stimulationsversuche musste zunächst geprüft werden, ob die verwendeten LNCaP-Zellen auf eine Stimulation durch das DHT Steroidhormon mit einer gesteigerten Sekretion von PSA reagieren. Diese Stimulation wurde analog zu publizierten Arbeiten mit einer Konzentration von 100 nM DHT durchgeführt (Arnold *et al.*, 2004). Auch hier wurden lediglich LNCaP- und BM1604-Zellen in die Versuche eingeschlossen, da PC<sub>3</sub>-Zellen durch das nicht Vorhandensein eines Androgen-

Rezeptors nicht für eine derartige Stimulation geeignet erschienen (Tai *et al.*, 2011). Aus diesem Grund reagieren sie nicht auf DHT mit einer veränderten PSA-Sekretion (Dillard *et al.*, 2008) und exprimieren, wie hier nachgewiesen, weder *PSA* noch *TRPM5* (siehe 4.1). Eine Involvierung der PC<sub>3</sub>-Zellen in diese Versuche hätte folglich zu keiner PSA-Freisetzung führen können. Des Weiteren fehlt ihnen das *TRPM5*, welches eine Voraussetzung für eine funktionelle Betrachtung des Ionenkanals im Zusammenhang mit dem Serummarker aus der Prostata ist.

Für die BM1604-Zellen konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der DHT-Stimulation und der PSA-Freisetzung gefunden werden, da zu den bei ihnen untersuchten Bedingungen trotz Stimulation kein PSA gemessen werden konnte. Jedoch exprimieren BM1604-Zellen *TRPM5*, weshalb die Stimulationsversuche zeigen, dass *TRPM5* die Synthese von PSA nicht induziert. Wäre dies der Fall, hätten die untersuchten Zellen PSA sekretieren müssen. Zudem konnte das Nichtvorhandensein von PSA in dieser Zelllinie hiermit auf Sekretionsebene bestätigt werden.

Schließlich erwiesen sich lediglich die LNCaP-Zellen für die Fragestellung dieser Arbeit als geeignet, da bei ihnen bereits nachgewiesen wurde, dass sie sowohl *TRPM5* als auch *PSA* exprimieren (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Ein positiver Einfluss von DHT auf die Sekretion von PSA konnte erst ab 24 h nach Stimulation beobachtet werden. Zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 96 h nach Hinzufügen des Androgens wurden signifikant höhere PSA-Konzentrationen in den nativen und unterschiedlich stabil transfizierten LNCaP-Zellen gemessen. Zu den frühen Messzeitpunkten 1 h, 3 h und 6 h nach DHT-Stimulation konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden, da sich die PSA-Konzentration in den verwendeten stimulierten und nicht stimulierten Zellen etwa gleich groß war. Teilweise war die PSA-Menge zu diesen Zeitpunkten in den nicht-stimulierten Zellen sogar höher als in den stimulierten. Vor allem die Zeitpunkte ab 24 h nach DHT-Stimulation erwiesen sich hier als relevant, da dort ein eindeutiger Einfluss der hormonellen Stimulation auf die PSA-Sekretion der Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. In neuen Studien könnten diese zeitlich begrenzten Beobachtungen verifiziert und damit ihre Richtigkeit überprüft werden.

#### 5.4.4 *TRPM5* beeinflusst wahrscheinlich die PSA-Sekretion

Beide Versuchsreihen zeigten, dass das funktionelle *TRPM5* die PSA-Sekretion in LNCaP-Zellen positiv beeinflusst, sodass der Ionenkanal beim Prostatakarzinom sehr wahrscheinlich einen modifizierenden Einfluss auf die Exozytose des Tumormarkers

besitzt. Die genannte Korrelation von TRPM5 und PSA konnte hier zu den Messzeitpunkten 24 h und 48 h nach Stimulation durch DHT aufgezeigt werden. Diese Schlussfolgerung ergibt sich, da zu beiden Zeitpunkten lediglich bei den PLE-Zellen mehrfach ein signifikanter Unterschied der PSA-Konzentration im Vergleich zu den nativen oder zu den mit PSE beziehungsweise PE stabil transfizierten Zellen gemessen wurde. Zwar waren nur fünf der zwölf Vergleiche eindeutig signifikant, jedoch erwiesen sie sich größtenteils als zumindest annähernd signifikant. Somit ist es wahrscheinlich, dass 24 h und 48 h nach Stimulation die Menge des funktionellen TRPM5-Ionenkanals mit der PSA-Sekretion positiv korreliert. Für eine ganz sichere Aussage hierüber müssten allerdings alle Unterschiede der PSA-Konzentrationen zwischen den PLE- und den anderen LNCaP-Zellen signifikant sein. Auch um die Messabweichungen zu minimieren und damit deutlich kleinere Standardabweichungen zu erzielen, wären weitere Versuchsreihen unter gleichen oder optimierten Bedingungen sinnvoll. So könnten beispielsweise Gewebeproben aus dem Prostatakarzinom dazu beitragen, die modifizierende Funktion unter Bedingungen zu untersuchen, welche denen des Gesamtorganismus gleichen. Aus den genannten Gründen ist die modifizierende Funktion des TRPM5-Ionenkanals auf die PSA-Sekretion in der Prostata noch nicht abschließend gesichert und bedarf daher weiterer Untersuchungen.

## 5.5 Schlussfolgerungen

Die beschriebenen Erkenntnisse führen zu Ideen für weitere mögliche Studien. Diese könnten das gewonnene Wissen verifizieren und darüber hinaus weitere Erkenntnisse zu TRPM5 im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom liefern.

### 5.5.1 Wiederholung der DHT-Stimulationsversuche zu relevanten Zeitpunkten und gemeinsame Betrachtung mehrerer Tumormarker

Wie zuvor geschildert, konnte hier wahrscheinlich ein Zusammenhang des funktionellen TRPM5-Ionenkanals mit der PSA-Sekretion in LNCaP-Zellen 24 h und 48 h nach Stimulation durch DHT nachgewiesen werden. Um dies zu verifizieren wären weitere Versuchsreihen zu den relevanten Messzeitpunkten mit Tumorzellen oder Gewebeproben aus der Prostatakarzinom sinnvoll. Dabei sind vor allem die beiden Messzeitpunkte 24 h und 48 h nach Stimulation durch das Steroidhormon, aber auch 1 h, 3 h, 6 h und 96 h für eine kritische Betrachtung dieser Fragestellung sinnvoll. Hierüber könnte zum einen die Korrelation von TRPM5 mit PSA nach 24 h und 48 h

bestätigt und die zu den restlichen Zeitpunkten nicht vorhandene Korrelation beider eventuell verifiziert werden. 96 h nach DHT-Stimulation war die PSA-Konzentration in den untersuchten PLE-Zellen, die zu einer Überexpression des Ionenkanals führt, zwar nur am zweitniedrigsten und damit niedriger als in den PSE- und PE-Zellen, allerdings wurde dieser Messzeitpunkt nur einmal untersucht. Somit könnte es sein, dass die hier gemessene PSA-Konzentration nicht der Realität entspricht. Selbst wenn dies nicht der Fall ist, ist zu diesem Zeitpunkt immer noch ein signifikanter Unterschied der PSA-Sekretion zwischen den verschiedenen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zu sehen. Daher ist es auf jeden Fall sinnvoll, 96 h nach Stimulation in weitere Versuchsreihen miteinzubeziehen, um über diesen Zeitpunkt eine klarere Aussage treffen zu können. Zusätzlich kann man diskutieren, ob weitere Zeitpunkte (beispielsweise 144 h nach Stimulation) für neue Versuchsreihen sinnvoll wären, um zu überprüfen, ob der Einfluss des Ionenkanals auch zu späteren Zeitpunkten die Sekretion des Tumormarkers beeinflusst oder ob sein Einfluss auf die Sekretion abnimmt. Allerdings erscheint eine Ausweitung der Messzeitpunkte meines Erachtens eher nicht sinnvoll, da in der Literatur der positive Einfluss von DHT auf die Sekretion von PSA bereits nach wenigen Stunden beobachtet werden konnte und Sekretionsprozesse nach Stimulation zeitlich begrenzt ablaufen. So fanden Rekasi *et al.* bereits 18 h nach Stimulation durch 100 nM DHT einen signifikanten Anstieg der PSA-Sekretion (2001). Damit verläuft die Freisetzung von PSA deutlich langsamer ab als die des Steroidhormons selbst. Die rasche Synthese von DHT und anderer Steroidhormone führt 1 min nach einer Stimulation zu einer messbaren Freisetzung des betreffenden Hormons, das Sekretionsmaximum wird bereits 10-15 min erreicht (Schulz *et al.*, 2015). Bei PSA dauert der zelluläre Prozess von Stimulation bis Sekretion vermutlich deutlich länger, da seine Synthese wesentlich komplexer abläuft als die des DHT. Dennoch sieht man auch bei Steroidhormonen eine zeitlich begrenzte Sekretion nach einem Stimulus, weshalb bei PSA hiervon ebenfalls ausgegangen werden muss. Erst wenn abschließend geklärt ist, ob der TRPM5-Ionenkanal die PSA-Sekretion in der Prostata fördert und in welchem genauen Zeitraum dieser Zusammenhang besteht, kann man hieraus Konsequenzen für weitere medizinische Forschungen ableiten.

Da die Rolle von Tumormarkern und speziell die des PSA in der Prostata in seiner Relevanz noch unsicher ist, ist genau dies unabdingbar. Bisher gab es viele Diskussionen darüber, ob die Verwendung von PSA zur Frühdetektion des Prostatakarzinoms sinnvoll ist oder nicht. Immer wieder wird diese Herangehensweise

in Frage gestellt. (Kawachi *et al.*, 2010). Daher wäre es wichtig, hierüber neue Erkenntnisse zu gewinnen, um die Bedeutung von PSA bei der Diagnostik eines Prostatakarzinoms zu sichern. Regelmäßig wird diskutiert, welche Bedeutung Tumormarkern bei Krebserkrankungen zukommt. So gibt es welche, die sich bisher nur zur (Früh-)detektion eignen, wohingegen andere auch für eine Verlaufskontrolle während oder nach therapeutischen Maßnahmen etabliert haben. So dient beispielsweise CYFRA 21-1 zur Verlaufskontrolle und Parameter der Nachsorge beim nicht-kleinzelligen Bronchiolarkarzinom, da es gegenüber benignen Lungenerkrankungen eine gute Spezifität aufweist. Ein CYFRA 21-1 Wert  $>10$  ng/ml ist nur bei etwa 1 % mit einem benignen Ereignis vereinbar (Stieber *et al.*, 1993), wohingegen bei gutartigen Lungenerkrankungen derselbe Tumormarker zu 95 %  $< 3,3$  ng/ml liegt (Gruber, 2008). Im Vergleich hierzu besitzt die PSA-Konzentration allein nur eine geringe Spezifität, da sie beispielsweise bei der BPH oder auch bei Harnwegsinfekten erhöht sein kann (Saini, 2016). Damit es zwar ein Prostata-spezifischer, aber nicht Prostatakarzinom-spezifischer Serummarker (Zhu *et al.*, 2016). Die Spezifitätsrate in seiner sogenannten „Grauzone“ (4-10 ng/ml) liegt bei lediglich 48,6 %, weshalb es sehr oft zu einer Fehldiagnose kommt (Mao *et al.*, 2018). Da nicht nur die PSA-Konzentration, sondern auch die des hK2 beim Prostatakarzinom in der Regel erhöht ist (Satkunasivam *et al.*, 2014), wäre eine kombinierte Betrachtung durchaus sinnvoll. In publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Betrachtung von PSA, hK2 sowie PCA3 die Sensitivität und Spezifität der Frühdetektion von Prostatakarzinomen deutlich verbessert werden kann und ist demnach der alleinigen Bestimmung der PSA-Konzentration deutlich überlegen (Mao *et al.*, 2018). PCA3 (Prostate Cancer Gene 3) ist ein Tumormarker, welcher in malignem Prostatagewebe im Vergleich zu benignem oder Prostatagewebe aus einem gesunden Menschen deutlich überexprimiert wird. Damit besitzt PCA3 normalerweise eine höhere Spezifität als PSA für die Detektion eines Prostatakarzinoms (Roberts *et al.*, 2015). Mao *et al.* (2018) konnten demzufolge aufzeigen, dass die konventionelle Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms deutlich ausbaufähig ist. Es bleibt interessant, welche Serummarker sich für eine potenzielle Frühdetektion durchsetzen und welchen Nutzen Patienten vor allem in Hinblick auf ihre Prognose erfahren werden. Aus diesem Grund wäre es von Interesse zu untersuchen, ob TRPM5 nicht nur die PSA-Sekretion, sondern auch die weiterer Tumormarker aus dem Prostatakarzinom modifiziert. Um diese Fragestellung zu klären, könnten ähnliche Stimulationsversuche beispielsweise in mit hK2 stabil transfizierten LNCaP-Zellen durchgeführt werden. Des Weiteren wäre

es von großem Interesse, zu klären, ob im Umkehrschluss eine Beeinflussung der PSA-Sekretion die Progression des Prostatakarzinoms beeinflusst. Es ist bisher bekannt, dass nicht alle Karzinome der Prostata mit dem PSA-Level korrelieren. Gerade besonders aggressive Tumore haben in Untersuchungen immer wieder besonders niedrige PSA-Konzentrationen aufgezeigt (Thompson *et al.*, 2004). Diese Frage zu klären, wäre zentral und könnte möglicherweise zu neuen Kenntnissen für die Therapie des Prostatakarzinoms beitragen.

Da das Prostatakarzinom aktuell die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes ist und am dritthäufigsten als krebsbedingte Todesursache festgestellt wird (Torre *et al.*, 2015; Ferlay *et al.*, 2013), ist diese Klärung nicht nur von großem wissenschaftlichen Interesse, sondern von größter sozialer und wirtschaftlicher, aber auch emotionaler Relevanz. Denn Krebs ist eine der häufigsten Erkrankungen des Menschen. Im Jahr 2016 erkrankten 492.000 Menschen in Deutschland an Krebs. Vergleicht man die Zahlen mit der Situation im Jahr 1970, hat sich die Zahl der Betroffenen verdoppelt (Internetquelle 8). Damit ist Krebs ein enormes gesellschaftliches Problem unserer Zeit, dessen Verbesserung in unser aller Interesse liegt.

### 5.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen von TRPM5 in der Prostata

In anderen humanen Zellen konnte die funktionelle Bedeutung von TRPM5 bereits nachgewiesen werden. Der Sekretionsmechanismus von Insulin unter Beteiligung des TRPM5-Ionenkanals ist ein prominentes Beispiel, dass auf subzellulärer Ebene gut erforscht ist. In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird neben der Insulinsekretion, die zur Senkung des Blutglukosespiegels führt, auch *TRPM5* exprimiert. Dies wird hierbei auf zweierlei Wege gewährleistet. Für den sogenannten Hauptweg ist der GLUT-2 Transporter entscheidend, der bei steigenden Blutglukosewerten diese in die Zellen aufnimmt und zu ATP metabolisiert (Cook *et al.*, 1988). Das veränderte ATP/ADP-Verhältnis verursacht daraufhin das Schließen der ( $K_{ATP}$ )-Kanäle (Ashcroft *et al.*, 1984; Cook und Hales, 1984), was wiederum über die Membrandepolarisation zur Öffnung von VDCCs führt und über den Calciumeinstrom (Safayhi *et al.*, 1997) eine pulsatile Sekretion von Insulin ermöglicht (Gilon *et al.*, 1993; Lang, 1999). Für den  $K_{ATP}$ -unabhängige Nebenweg wird TRPM5 benötigt, um nach Aktivierung durch den raschen  $Ca^{2+}$ -Anstieg einen  $Na^+$ -Einstrom über seine Porenregion zu ermöglichen. Hierdurch wird die Zellmembran weiter depolarisiert, was eine optimale Öffnung der VDCCs und damit Feinjustierung der Insulinfreisetzung ermöglicht. Zusätzlich scheint TRPM5 auf direktem Weg die Fusion der Insulin-Vesikel mit der Zellmembran zu

fördern (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Neben seiner Funktion bei der Insulinfreisetzung ist der Sekretionsmechanismus des Schleimbildners MUC5AC in den Becherzellen des Colons unter Beteiligung von TRPM5 bekannt. Dort führt der über TRPM5 bedingte Na<sup>+</sup>-Einstrom dazu, dass der NCX-Austauscher Na<sup>+</sup>-Ionen aus der Zelle und Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Zelle hinein transportiert. Der rasche Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ermöglicht daraufhin die Sekretion von MUC5AC (Mitrovic *et al.*, 2013).

Diese Erkenntnisse führten zur Hypothese, dass TRPM5 bei der Sekretion von PSA in der Prostata eine ähnliche Funktion übernimmt und waren daher grundlegend für diese Arbeit. Um den exakten subzellulären Mechanismus, welcher zur Freisetzung von PSA aus den Zellen der Prostata und die putative Rolle des TRPM5-Ionenkanals hierbei zu verstehen, benötigt man elektrophysiologische Untersuchungen humaner Prostatakarzinomzellen. Da die genannte Hypothese allerdings bisher nicht geklärt ist, gibt es hierzu bislang keine Publikationen.

Die Genexpression von PSA wird durch Androgene, Gestagene, Gluko- und Mineralkortikoide hormonell reguliert (Zarghami *et al.*, 1997). Um die Produktion des Glykoproteins zu steigern, binden unter anderem Androgene an ihren Rezeptor im Zellkern der Drüsenepithelzelle. Der aktivierte Androgenrezeptor fungiert nun als Transkriptionsfaktor und bindet als dieser an zwei funktionelle Androgen-Response Elemente (AREs) im proximalen Promotor des *PSA*-Gens (Riegmann *et al.*, 1991; Cleutjens *et al.*, 1996). Doch nicht nur Androgene, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise p53 modifizieren seine Genexpression (Tsui *et al.*, 2004). Nach Transkription wird die entstandene mRNA in ein 261 AS langes Propeptid translatiert (Gan *et al.*, 2000). Dieses wird schließlich durch posttranslationale Modifikation in das 237 AS lange Endprodukt gespalten, welches nach Sekretion seine enzymatische Funktion übernehmen kann (Moradi *et al.*, 2019).

Aus der Literatur ist über den Sekretionsmechanismus von PSA bekannt, dass das Glykoprotein in den Epithelzellen der Prostata synthetisiert (Riegman *et al.*, 1989) und anschließend per Exozytose in das Drüsenvolumen abgegeben wird (Büker, 2008). Im Seminalplasma angekommen führt es zur Proteolyse von Fibronectin sowie in ähnlicher Weise wie hK2 zur Spaltung von Semenogelin I und II, was die Verflüssigung des Samens nach der Ejakulation ermöglicht (Lilja *et al.*, 1987; Holdenrieder und Stieber, 2019). Die Verflüssigung findet normalerweise innerhalb von etwa 20 min statt (Lilja und Laurell, 1985). Ohne diesen Schritt ist die Wanderung der Spermien innerhalb des Uterus sowie entlang der Tuben und damit eine Befruchtung der reifen

Eizelle nicht möglich, weshalb PSA für ihre physiologische Funktion unabdingbar ist. Stimuliert wird die Freisetzung von PSA durch Androgene wie DHT (Arnold *et al.*, 2005; 007), weshalb dieses Steroidhormon für die hier durchgeführten Stimulationsversuche verwendet wurde.

Der subzelluläre Mechanismus, welcher die Mucin-Sekretion unter Beteiligung von TRPM5 modifiziert, ist sehr gut verstanden und könnte zum Verständnis der durch TRPM5 modifizierten PSA-Sekretion beitragen. Auch die bekannten Mechanismen  $\beta$ -pankreatische Insulinsekretion könnte hierbei helfen. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass der Mechanismus der Geschmackswahrnehmung der drei Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami dem der Sekretion von PSA auf zellulärer Ebene teilweise gleicht. Da es sich dort allerdings nicht um einen Sekretionsmechanismus, sondern um den ersten zellulären Schritt, welcher in Folge zu einer Sinneswahrnehmung führt, handelt, ist es unwahrscheinlich, dass sich die zellulären Mechanismen beider ähneln. Somit kann man aktuell nur Vermutungen darüber anstellen, wie es zur Freisetzung des Tumormarkers auf zellulärer Ebene kommt.

Damit gibt es allerdings mehrere gut bekannte Mechanismen, welche zum Verständnis der PSA-Sekretion unter Beteiligung von TRPM5 beitragen könnten. Die Signalkaskade, welche zur Exozytose von PSA in den Epithelzellen der Prostata führt, ist bisher allerdings nicht geklärt. Daher ist aktuell unklar, inwiefern er den bekannten Mechanismen gleicht und welche Rolle TRPM5 hierbei übernehmen könnte. Dies zu klären könnte mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungen gelöst werden. Damit könnten wichtige Informationen über die physiologischen Abläufe innerhalb der Prostata gewonnen werden, welche vor allem für die Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms von Bedeutung sein könnten. Therapeutische Ansätze hieraus abzuleiten scheinen zum aktuellen Stand der Wissenschaft allerdings sehr schwierig, da TRPM5 sehr verschiedene physiologische Funktionen in verschiedensten Organen übernimmt. Nur nach Etablierung gewebespezifischer Wirkstoffe gäbe es hierfür sinnvolle Ansätze. Ohne diesen Schritt wäre eine Regulation des Ionenkanals sehr unspezifisch und könnte weitreichende Folgen auf andere Funktionen innerhalb des Körpers, wie beispielsweise der Insulinsekretion, haben.

### 5.5.3 Möglicher Wirkmechanismus von TRPM5 und TRPM4 für die PSA-Sekretion in der Prostata

Wie zuvor besprochen, wäre es vonnöten, weitere Untersuchungen anzustreben, um den möglichen Wirkmechanismus von TRPM5 im Rahmen der PSA-Sekretion in

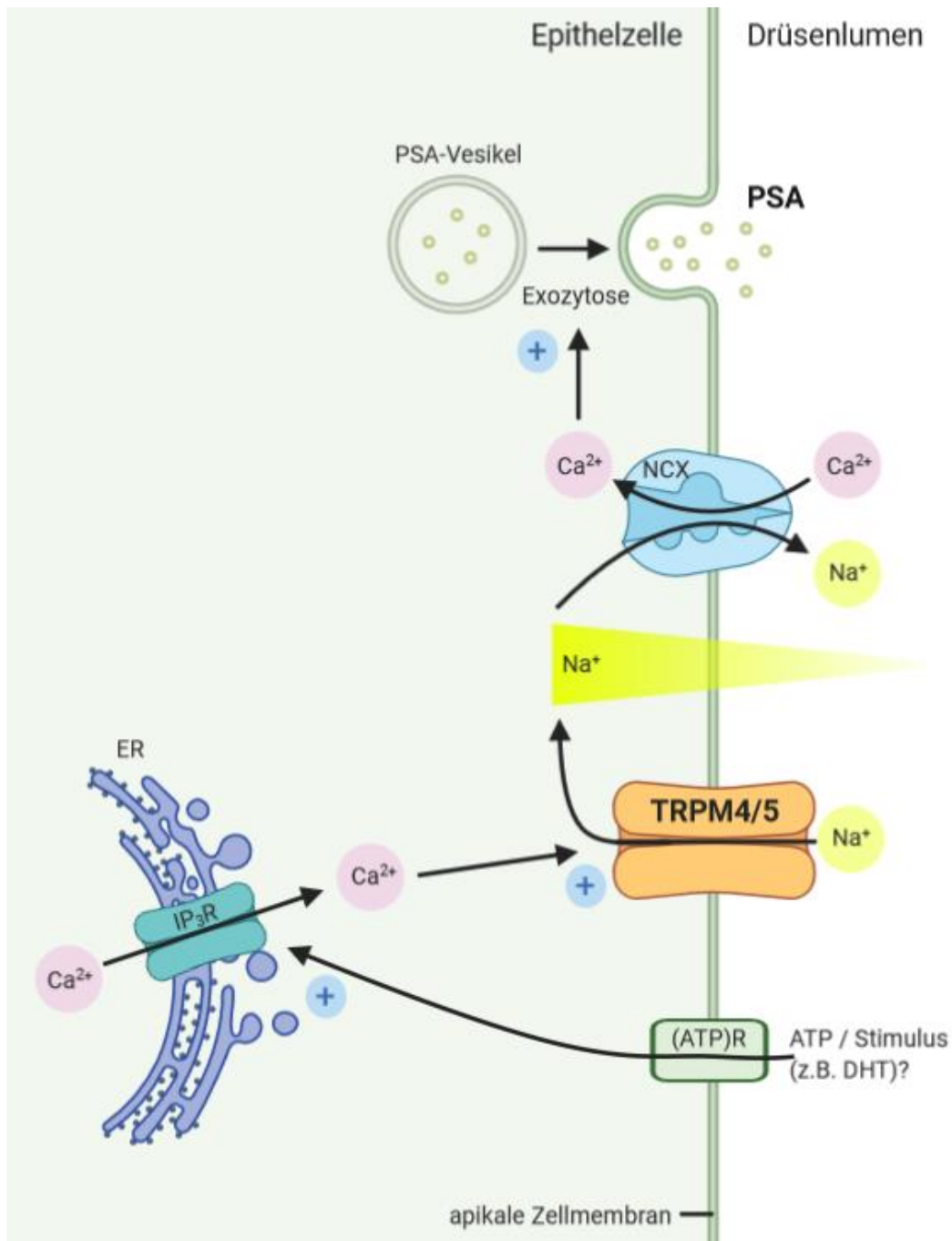


Prostatazellen zu verstehen. Für eine funktionelle Betrachtung von TRPM5 in Zusammenhang mit der PSA-Sekretion erwiesen sich PC<sub>3</sub>- und BM1604-Zellen hier als nicht sinnvoll. Den durchgeführten Untersuchungen zufolge exprimieren PC<sub>3</sub>-Zellen kein *TRPM5*. In BM1604-Zellen kommt es zwar zur Expression des Ionenkanals, allerdings konnte keine endogene Expression von *PSA* sowie dem nah verwandten Tumormarkers *hK2* nachgewiesen werden. Die mit den BM1604-Zellen durchgeführten Sekretionsversuche zeigten, dass TRPM5 die *PSA*-Sekretion nicht induziert, sondern wenn überhaupt dann modifiziert. In LNCaP-Zellen hingegen konnte zum einen eine endogene Expression sowohl des Ionenkanals als beider betrachteter Tumormarker nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der gewebespezifischen Expression von TRPM5 in der Prostata (Prawitt *et al.*, 2000). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass das funktionelle TRPM5 wahrscheinlich die *PSA*-Sekretion fördert. Dieser Zusammenhang konnte 24 h und 48 h nach Stimulation durch DHT beobachtet werden. Daher würden sich LNCaP-Zellen für weitere Studien in diesem Zusammenhang gut eignen. Des Weiteren konnte hier wie in 5.4.2 beschrieben eine überwiegend membranöse Lokalisation des Ionenkanals in BM1604- und LNCaP-Zellen aufgezeigt werden, welche sich mit den Ergebnissen aus embryonalen Nierenzellen Zellen deckt (Brixel, 2009).

Da TRPM5 sich, wie für TRP-Ionenkanäle typisch, zu einem Homo- oder Heterotetramer zusammenlagert, um seine physiologische Funktion innerhalb der Zelle zu übernehmen (Clapham, 2003b; Ramsey *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010), müsste dies auch in LNCaP-Zellen der Fall sein. Obwohl seine Aminosäuresequenz lediglich zu 40 % homolog zu der von TRPM4 ist (Wu *et al.*, 2010), teilen beide Ionenkanäle viele funktionelle Ähnlichkeiten. Vor allem die Tatsache, dass sie durch einen schnellen und starken intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg trotz ihrer Impermeabilität für Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert werden (Hofmann *et al.*, 2003; Liu und Liman, 2003; Prawitt *et al.*, 2003) macht sie zu potentiellen funktionellen Partnern. So werden sowohl TRPM5 als auch TRPM4 für eine normale Wahrnehmung der drei Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami benötigt. Bei einem *Knockout* einer der beiden Ionenkanäle ist die Geschmackswahrnehmung dieser Qualitäten in Mäusen noch vorhanden, allerdings deutlich reduziert ist (Banik *et al.*, 2017). Auch bei der stimulierten Mucin-Sekretion im Colon lagern sich beide Kanäle zusammen. Nach Stimulation durch beispielsweise ATP kommt es zu einer raschen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER, welche wiederum TRPM4/5 aktiviert. Nach Aktivierung der zusammengelagerten Ionenkanäle kommt es

über diese zum  $\text{Na}^+$ -Einstrom. Der dadurch entstehende Protonengradient führt dazu, dass  $\text{Na}^+$  über NCX aus der Zelle hinaus und  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle hinein transportiert wird. Der rasche intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg fördert zuletzt die Sekretion von Mucin (Cantero-Recasens *et al.*, 2019). Daher wäre es denkbar, dass sich TRPM4 und TRPM5 in verschiedenen Zelltypen zu einem Heterotetramer assemblieren, um in ihnen zelluläre Prozesse zu modifizieren. Demzufolge wäre es beim Prostatakarzinom möglich, dass sie gemeinsam die Sekretion von PSA fördern.

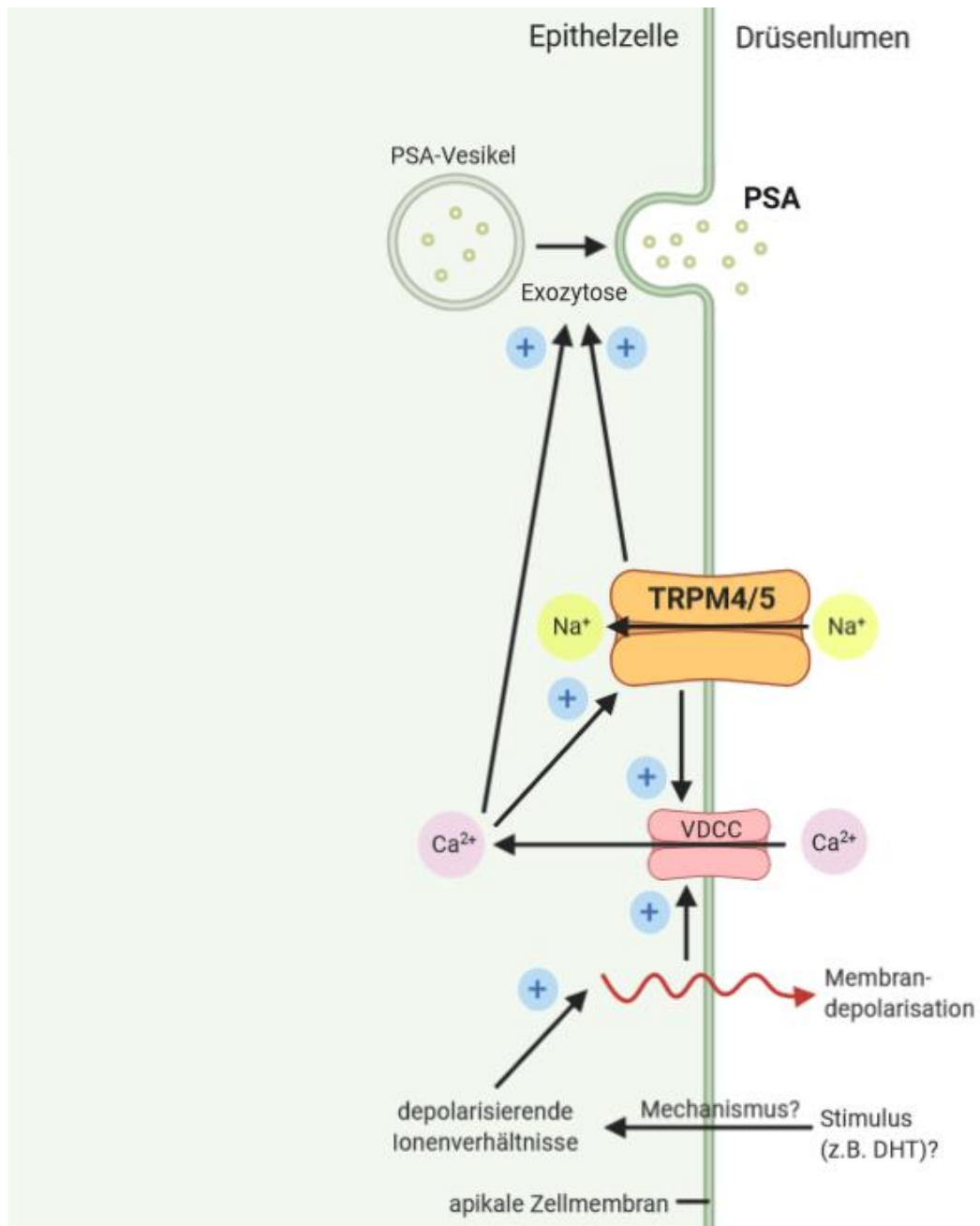
Der Wirkmechanismus der induzierten Mucin-Sekretion unter Beteiligung von TRPM4 und TRPM5 (Cantero-Recasens *et al.*, 2019) sowie der allgemeine Sekretionsmechanismus des Gel-Bildners (Mitrovic *et al.*, 2013) dienen hier als Grundlage für die Erstellung eines ersten möglichen Wirkschemas und könnte demnach wie folgt aussehen (siehe Abbildung 5.1): Nach Stimulation durch ATP oder stimulierende Substanzen wie das Androgen DHT kommt es über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Der rasche zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert den zusammengelagerten TRPM4/5-Ionenkanal, über den es dann zum  $\text{Na}^+$ -Einstrom kommt. Der dadurch entstehende Protonengradient wird über NCX im Antiport mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wieder abgebaut. Schließlich fördert der rasche intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg die Exozytose des PSA aus den Epithelzellen in das Drüsenlumen der Prostata.



**Abbildung 5.1: Modell zur physiologischen Funktion von TRPM4 und TRPM5 in der Prostata auf Grundlage eines Protonengradienten.**

Schematisch dargestellt ist eine mögliche Signalkaskade der PSA-Freisetzung unter Beteiligung von TRPM4 und TRPM5. Die Stimulation durch ATP oder einen anderen Stimulus (z. B. DHT) führt über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Der rasche zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Anstieg aktiviert den zusammengelagerten TRPM4/5-Ionenkanal. Über TRPM4/5 kommt es zum Na<sup>+</sup>-Einstrom, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird. Dieser wird wieder abgebaut, indem NCX Na<sup>+</sup> aus der Zelle hinaus und Ca<sup>2+</sup> in die Zelle hinein transportiert wird. Der rasche Ca<sup>2+</sup>-Anstieg fördert schließlich die Exozytose von PSA aus den Epithelzellen der Prostata (ATP-R: ATP-Rezeptor, IP<sub>3</sub>-R: IP<sub>3</sub>-Rezeptor).

Nimmt man allerdings den Mechanismus der Insulinsekretion, welche durch TRPM5 feinjustiert wird (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010) als Grundlage hierfür, könnte sich folgendes Bild der modifizierten PSA-Sekretion unter Beteiligung von TRPM4 und TRPM5 ergeben (siehe Abbildung 5.2): Über einen bisher unbekanntem Mechanismus kommt es unter Beteiligung von stimulierenden Substanzen wie z. B. DHT zur Depolarisation der Zellmembran, was in Folge zur Öffnung von VDCCs führt. So könnten ermöglichte oder unterbundene Ionenverschiebungen aus intra- und/oder extrazellulären Speichern und die damit veränderten zellulären Ionenverhältnisse zur Depolarisation der Zellmembran führen. In den  $\beta$ -pankreatischen Zellen z. B. führt der unterbundene  $K^+$ -Ausstrom zur Depolarisation der Zellmembran (Brixel *et al.*, 2010). Die dadurch geöffneten VDCCs führen über den  $Ca^{2+}$ -Einstrom zu einem raschen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dies fördert schließlich die Freisetzung von PSA. Durch den raschen  $Ca^{2+}$ -Anstieg kommt es zudem zur Aktivierung des TRPM4/TRPM5 Heterotetramers. Der aktivierte TRPM4/TRPM5-Ionenkanal führt zum  $Na^+$ -Einstrom, welcher die Zellmembran weiter depolarisiert und so zu einer optimalen Öffnung der VDCCs führt. Zusätzlich fördern TRPM4/TRPM5 die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran direkt. Auf diese Weise könnten TRPM4 und TRPM5 gemeinsam die PSA-Sekretion in der Prostata modifizieren, die dem der Insulinsekretion im Pankreas gleicht. Denn auch dort bewirkt der TRPM5-Ionenkanal Oszillationen der Membrandepolarisation sowie der  $Ca^{2+}$ -Signalantwort (Colsoul *et al.*, 2010). Damit ergeben sich zwei verschiedene Modelle für TRPM4 und TRPM5 bei der PSA-Sekretion aus den Prostataepithelzellen. Während es beim ersten Modell aufgrund eines Protonengradienten zur PSA-Sekretion kommt, diene beim zweiten eine Membrandepolarisation als Grundlage für dessen Freisetzung aus der Epithelzelle der Prostata. Wie man am Beispiel der durch TRPM5 feinjustierten Insulinsekretion sehen kann (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010) und die Ergebnisse der hier durchgeführten Stimulationsversuche vermuten lassen, könnte es allerdings auch sein, dass TRPM5 alleine in der Lage ist, die PSA-Sekretion in der Prostata zu fördern. Diese Fragen zu klären, bedarf es weiterer Studien. Die bisherigen Studien aus Pankreas und Colon zeigen (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010; Mitrovic *et al.*, 2013; Cantero-Recasens *et al.*, 2019) dass sowohl extra- als auch intrazelluläres  $Ca^{2+}$  dazu genutzt werden kann, in Sekretionsprozessen modifizierend einzugreifen.



**Abbildung 5.2: Modell zur physiologischen Funktion von TRPM4 und TRPM5 in der Prostata auf Grundlage einer Depolarisation der Zellmembran.**

Zu sehen ist ein möglicher Mechanismus der PSA-Sekretion unter der Beteiligung von TRPM4 und TRPM5. Über einen unbekanntem Mechanismus kommt es zu depolarisierenden Ionenverhältnissen, welche zur Depolarisation der Zellmembran führen. Über die dadurch geöffneten VDCCs kommt es zu einem raschen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, welcher die PSA-Sekretion fördert. Der rasche zyttoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Anstieg aktiviert zudem das TRPM4/TRPM5 Heterotetramer. Dies ermöglicht einen Na<sup>+</sup>-Einstrom über den TRPM4/TRPM5. Die hierdurch verstärkte Membrandepolarisation führt zur optimalen Öffnung der VDCCs. Zudem fördert TRPM4/TRPM5 direkt die Exozytose von PSA aus den Prostataepithelzellen.

Außerdem wäre bei der Betrachtung der PSA-Sekretion nicht nur die mögliche Bedeutung von TRPM5 von Interesse. Man könnte die Untersuchungen auf eine gemeinsame Betrachtung von TRPM5 und TRPM4 ausweiten, um hierüber eventuell Informationen über den stimulierten Sekretionsmechanismus von PSA zu erlangen. So könnte beispielsweise ein *Knockout* des *Trpm5*- und *Trpm4*-Gens hilfreich dafür sein, ihre funktionelle Bedeutung bei der PSA-Sekretion aufzuschlüsseln. Ähnliche Studien halfen dabei, neue Erkenntnisse über das Zusammenwirken beider Ionenkanäle im Rahmen der Geschmackswahrnehmung zu erlangen (Banik *et al.*, 2017). Um den hier zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu verstehen und damit bessere Aussagen zur physiologischen Rolle von TRPM5 in der Prostata treffen zu können, wären elektrophysiologische oder weitere Methoden wie z. B. die Multiplex Immunohistochemie vonnöten.

#### 5.5.4 Untersuchung weiterer potentieller Funktionen von TRPM5 in der Prostata

TRP-Ionenkanäle spielen in verschiedenen Tumorentitäten eine bedeutende Rolle, da sie oftmals den Zellzyklus beeinflussen. So modifizieren sie die Transkription von Genen oder verschiedene zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Apoptose oder Motilität der Zellen (Pedersen *et al.*, 2005). Auch im Prostatakarzinom wurden bereits mehrere TRP-Ionenkanäle entdeckt, die einen Einfluss auf die Progression des Tumors haben. So ist die Expression von TRPM8 im Prostatakarzinom verglichen mit normalem Prostata-Gewebe deutlich höher (Tsavaler *et al.*, 2001), nimmt allerdings bei Androgen-Unabhängigkeit in weiter fortgeschrittenen Stadien wieder ab (Zhang und Barritt, 2004, Bidaux *et al.*, 2005). In Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomen fungiert TRPM8 als Inhibitor der Migration der Tumorzellen, indem es in Verbindung mit weiteren Proteinen die Adhäsionskinase inaktiviert (Gkika *et al.*, 2015, Genova *et al.*, 2017). Zudem ist die erhöhte TRPM8-Expression während der Androgen-abhängigen Phase mit einer erhöhten Zellwachstumsrate verbunden (Berges *et al.*, 1995, Kiessling *et al.*, 2003), wohingegen der Verlust von TRPM8 während der Androgen-unabhängigen Phase der Krankheit zu einer reduzierten Verdopplungszeit von LNCaP-Zellen führt (Prevarskaya *et al.*, 2010).

Auch weitere TRP-Ionenkanäle sind im Prostatakarzinom von Bedeutung. TRPV2 verstärkt die Zellmigration und Invasion der Tumorzellen (Monet *et al.*, 2010), wohingegen TRPV6 und TRPC6 die Proliferation der Zellen im Prostatakarzinom steigern (Thebault *et al.*, 2006; Lehen'kyi *et al.*, 2007). Neben TRPM8 scheinen auch weitere Mitglieder der TRPM Subfamilie in Prostatakarzinom Zellen regulatorische

Funktionen zu übernehmen. So wird TRPM2 in diesen Tumorzellen vermehrt exprimiert (Hantute-Ghesquier *et al.*, 2018) und fördert die Proliferation der Zellen (van Haute *et al.*, 2010, Zeng *et al.*, 2010). TRPM7 ist bei der Migration und Invasion der Prostatakarzinom-Zellen involviert, weshalb dieses in seinem Gewebe im Vergleich zur Prostatahyperplasie verstärkt exprimiert wird. Durch einen *Knockdown* des Ionenkanals wurden die Migration und Invasion der Zellen nachweislich unterdrückt. Zudem führte der *Knockdown* zu einer Umkehrung des epithelial-mesenchymalen Übergangs-Status, indem MMPs herunter- und E-Cadherin hochreguliert wurde (Chen *et al.*, 2017). Schließlich kommt es im Prostatakarzinom auch zu einer gesteigerten Expression von TRPM4, dem nächsten Verwandten des hier untersuchten TRPM5-Ionenkanals. Durch den *Knockdown* von TRPM4 wurde ein Rückgang der Migration, nicht aber der Proliferation von DU145 und PC<sub>3</sub>-Zellen beobachtet. Somit scheint der Ionenkanal, welcher mit TRPM5 am nächsten verwandt ist, einen krebsfördernden Einfluss in der Androgen-unabhängigen Phase des Tumors zu übernehmen, indem es die Migration der Zellen fördert (Holzmann *et al.*, 2015).

Durch veränderte Expressionsniveaus der TRP-Kanäle kommt es vermittelt über die veränderten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zur Beeinflussung der proliferativen Wege. Dies fördert oder hemmt folglich die Apoptose in den betroffenen Zellen. Zudem kann das Migrationsverhalten und damit die Invasivität der Tumorzellen durch TRP-Kanäle beeinflusst werden.

Wie hier nachgewiesen werden konnte, fördert TRPM5 wahrscheinlich die PSA-Sekretion im Prostatakarzinom. Dies scheint zumindest zeitlich begrenzt der Fall zu sein. Daher wäre es interessant und auch nicht unwahrscheinlich, dass der Ionenkanal auch weitere Funktionen in diesen Tumorzellen übernimmt. Da TRP-Ionenkanäle unter anderem die Proliferation, Apoptose und Motilität von Zellen sowie die Transkription von Genen beeinflussen, könnten in zukünftigen Studien diese zellulären Prozesse in Zusammenhang mit TRPM5 in der Prostata untersucht werden. Diese könnten dabei helfen, ein umfassenderes Bild über die funktionelle Bedeutung des TRPM5-Ionenkanals für das Prostatakarzinom zu bekommen. Die hieraus gewonnenen Kenntnisse könnten dann als Grundlage dafür dienen, neue therapeutische Ansätze für diese Tumorerkrankung zu etablieren oder die bereits vorhandenen zu optimieren.

## 6 Zusammenfassung

TRPM5 lagert sich als Mitglied der *transient receptor potential*-Ionenkanäle (TRP) zu einem Homo- oder Heterotetramer zusammen, um seine Funktion als Ionenkanal zu übernehmen. Der TRPM5-Ionenkanal wird durch einen raschen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert und transportiert nichtselektiv monovalente Kationen. In mehreren Geweben ermöglicht er mittels Depolarisation der Zellmembran oder über einen aufgebauten Protonengradienten die Freisetzung eines zellulären Proteins. So ist er beispielsweise an der Insulinsekretion beteiligt und feinjustiert diese. Da er in einigen Drüsengeweben stark exprimiert wird, ist eine mögliche Beteiligung an weiteren Sekretionsprozessen wahrscheinlich. Diese Kenntnisse waren grundlegend für die vorliegende Dissertation und führten zu Untersuchungen bezüglich seiner möglichen physiologischen Rolle bei der PSA-Sekretion in der Prostata. Beim Prostatakarzinom dient PSA als Tumormarker der Frühdiagnostik. Die Signalkaskade, welche zu seiner Freisetzung aus den Epithelzellen der Prostata führt, ist bisher allerdings noch nicht geklärt.

In einer der drei hierfür untersuchten humanen Zelllinien aus dem Prostatakarzinom konnte eine endogene Co-Expression von *TRPM5* und *PSA* nachgewiesen werden. Sowohl *PSA* als auch ein weiterer Tumormarker namens *hK2* zeigten in dieser Zelllinie eine starke Expression. Damit erwiesen sich LNCaP-Zellen für eine gemeinsame Betrachtung von TRPM5 und PSA als geeignet. Die nachfolgende Überexpression des funktionellen TRPM5-Ionenkanals wies seine subzelluläre Lokalisation innerhalb der Plasmamembran nach. Die mit den Zellen durchgeführten Stimulationsversuche durch DHT führten zu einer zeitlich begrenzt verstärkten Freisetzung von PSA. Somit gelang es in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal, aufzuzeigen, dass der funktionelle TRPM5-Ionenkanal wahrscheinlich die PSA-Sekretion fördert. Die positive Korrelation beider konnte hier nach 24 h und 48 h beobachtet werden. Um den Zusammenhang zu verifizieren und ausschließlich signifikante Ergebnisse zu erhalten, wären weitere Studien zu den genannten relevanten Messzeitpunkten mit Tumorzellen oder Gewebeproben aus dem Prostatakarzinom vonnöten. Erst wenn abschließend gesichert ist, ob TRPM5 die PSA-Sekretion in der Prostata fördert und in welchem genauen Zeitraum dieser Zusammenhang besteht, können hieraus Konsequenzen für weitere medizinische Forschungen ableiten. Darüber hinaus könnten vergleichbare Stimulationsversuche in Tumorzellen durchgeführt werden, welche andere Tumormarker wie beispielsweise *hK2* überexprimieren. Das gewonnene Wissen könnte dazu



dienen, die Frühdiagnostik des Tumors zu verbessern, indem mehrere Tumormarker aus der Prostata gleichzeitig betrachtet werden. Zusätzlich wäre von Interesse, den Mechanismus der PSA-Sekretion aufzuschlüsseln. Die bekannten Signalkaskaden der Mucin- und Insulinsekretion unter Beteiligung von TRPM5 könnten hierbei zu seinem Verständnis beitragen. Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit mit TRPM4 wäre es denkbar, dass TRPM5 sich genauso wie bei der Mucin-Sekretion nach Stimulation mit TRPM4 zusammenlagert, um den Na<sup>+</sup>-Einstrom in die Zelle zu ermöglichen. Der dadurch entstehende Protonengradient könnte über NCX im Antiport mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen wieder abgebaut werden. Schließlich könnte der rasche intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Anstieg die PSA-Freisetzung fördern. Alternativ hierzu könnte diskutiert werden, dass der Mechanismus der PSA-Sekretion der feinjustierten Insulinsekretion unter Beteiligung von TRPM5 ähnelt. Demnach könnte eine Depolarisation der Zellmembran dazu führen, dass es unter Beteiligung von VDDC und dem damit verbundenen raschen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg zu einer gesteigerten Freisetzung des Tumormarkers kommt. Mithilfe elektrophysiologischer oder auch weiterer Methoden wie der Multiplex Immunohistochemie könnte die Signalkaskade, welche die Freisetzung von PSA ermöglicht, aufgeklärt werden. Ein *Knockout* von *TRPM5* könnte die Auswirkungen auf den Gesamtorganismus verdeutlichen und dabei helfen, daraus Rückschlüsse auf seine physiologische Rolle in der Prostata zu ziehen.

Da TRP-Ionenkanäle die Proliferation, Apoptose und Motilität von Zellen sowie die Transkription von Genen beeinflussen, könnte dies für TRPM5 ebenfalls zutreffen. Zukünftige Studien zu TRPM5 könnten daher dazu beitragen, ein umfassenderes Bild über das Prostatakarzinom zu erlangen, die Frühdiagnostik zu verbessern, neue therapeutische Ansätze zu etablieren oder die bereits vorhandenen Therapien zu optimieren.

## 7 Literaturverzeichnis

**Ahrén B, Winzell M, Pacini G (2008)** The augmenting effect on insulin secretion by oral versus intravenous glucose is exaggerated by high-fat diet in mice. *Journal of Endocrinology* 197(Pt 1):181–187.

**Arnold J, Le H, McFann K, Blackman M (2005)** Comparative effects of DHEA vs testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(Pt 3):E573–E584.

**Arnold J, Liu X, Allen J, Le H, McFann K, Blackman M (2007)** Androgen Receptor or Estrogen Receptor- $\beta$  Blockade Alters DHEA-, DHT-, and E<sub>2</sub>-Induced Proliferation and PSA Production in Human Prostate Cancer Cells. *The Prostate* 67(Pt 11):1152–1162.

**Ashcroft F, Harrison D, Ashcroft S (1984)** Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446–448.

**Ashcroft F, Rorsman P (1989)** Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54(Pt 2):87–143.

**Aydar E, Yeo S, Djamgoz M, Palmer C (2009)** Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int* 9:23.

**Banik D, Martin L, Freichel M, Torregrossa A-M, Medler K (2017)** TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *PNAS* 115(Pt 4):E772-E781.

**Bauer A, Wassner A (2019)** Thyroid hormone therapy in congenital hypothyroidism an pediatric hypothyroidism. *Endocrine* 66 (Pt 1):51-62.

**Berges R, Vukanovic J, Epstein J, CarMichel M, Cisek L, Johnson D, Veltri R, Walsh P, Isaacs J (1995)** Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1(Pt 5):473–480.

**Bernhardt S, Naim M, Zehavi U, Lindemann B (1996)** Changes in IP<sub>3</sub> and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J Physiol* 490(Pt 2):325–336.

**Berridge M, Bootman M, Roderick H (2003)** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(Pt 7):517–529

**Bidaux G, Beck B, Zholos A, Gordienko D, Lemonnier L, Flourakis M, Roudbaraki M, Borowiec A, Fernandez J, Delcourt P, Lepage G, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2012)** Regulation of activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms. *J Biol Chem* 287(Pt 5):2948–2962

**Bisping F (2013)** Expression und Lokalisation der Kationenkanäle TRPC3, TRPC6 und TRPV5 in verschiedenen Geweben der Maus [Dissertationsschrift]. Greifswald: Fachbereich Medizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität.

**Bolanz K, Hediger M, Landowski C (2008)** The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* 7(Pt 2):271–279.

**Bostwick D, Burke H, Djakiew D, Euling S, Ho A, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters D, Timms B (2004)** Human Prostate Cancer. Risk Factors Cancer Supplement 101(Pt 10):2371–2400.

**Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R (2001)** Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. Proc Natl Acad Sci USA 98(Pt 21):12174–12179.

**Brixel L (2009)** Funktionelle Charakterisierung des TRPM5-Gens [Dissertationsschrift]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität.

**Brixel L, Monteilh-Zoller M, Ingenbrandt C, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel B, Prawitt D (2010)** TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. Pflugers Arch 460(Pt 1):69–76.

**Bruch H, Schmidt E, Laven R, Kehrer G, Wasner K (1978)** The role of prostaglandines in peristalsis of the human colon. Acta Hepato-gastroenterologica 25(Pt 4):303–307.

**Büker N (2008)** Die PSA-Dynamik zur Verfeinerung der Biopsieindikation beim Prostatakarzinom [Dissertationsschrift]. Berlin: Medizin der Charité.

**Cantero-Recasens G, Butnaru C, Brouwers N, Mitrovic S, Valverde M (2019)** Sodium channel TRPM4 and sodium/calcium exchangers (NCX) cooperate in the control of Ca<sup>2+</sup>-induced mucinsecretion from goblet cells. J Biol Chem 294(Pt 3):816-826.

**Catalina W, Smith D, Ornstein D (1997)** Prostate cancer detection in men with serum PSA concentration of 26 to 40 ng/ml and Benign Prostate Examination. JAMA 277(Pt 18):1452–1455.

**Caterina M, Schumacher M, Tominaga M, Rosen T, Levine J, Julius D (1997)** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389(Pt 6653):816–824.

**Caterina M, Julius D (2001)** The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. Annu Rev Neurosci 24:487–517.

**Chen L, Cao R, Wang G, Yuan L, Qian G, Guo Z, Wu CL, Wang X, Xiao Y (2017)** Downregulation of TRPM7 suppressed migration and invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells. Med Oncol 34(Pt 7):127.

**Clapham D, Montell C, Schultz G, Julius D (2003a)** International Union of Pharmacology XLIII Compendium of voltage-gated ion channels: Transient receptor potential channels. Pharmacol Rev 55(Pt 4):591–596.

**Clapham D (2003b)** TRP channels as cellular sensors. Nature 426:517–524.

**Clark A, Wells C, Buley I, Cruickshank J, Vanhegan R, Matthews D, Cooper G, Holman R, Turner R (1988)** Islet amyloid, increased  $\alpha$ -cells, reduced  $\beta$ -cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. Diabetes Res 9(Pt 4):151–159.

**Cleutjens K, van Eekelen C, van der Korput H, Brinkmann A, Trapman J (1996)** Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. J Biol Chem 271(Pt 11):6379-6388.

**Colsoul B, Schraenen A, Lemaire K, Quintens R, van Lommel L, Segal A, Owsianik G, Talavera K, Voets T, Margolskee R, Kokrashvili Z, Gilon P, Nilius**

**B, Schuit F, Vennekens R (2010)** Loss of high-frequency glucose-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in Trpm5<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(Pt 11):5208–5213.

**Col soul B, Vennekens R, Nilius B (2011)** Transient receptor potential cation channels in pancreatic beta cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 161:87–110.

**Cook D, Hales C (1984)** Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311:271–273.

**Cook D, Satin L, Ashford M, Hales N (1988)** ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in Pancreatic  $\beta$ -Cells: Spare-Channel Hypothesis. *Diabetes* 37(Pt 5):495–498.

**Cook S, Lockyer P (2006)** Recent advances in Ca<sup>(2+)</sup>-dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell Calcium* 39(Pt 2):101–112.

**Corfield A, Carroll D, Myerscough N, Probert C (2001)** Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 6:D1321–D1357.

**Cuzick J, Thorat M, Andriole G, Brawley O, Brown P, Culig Z, Eeles R, Ford L, Hamdy F, Holmberg L, Illic D, Key T, Veccia C, Lilja H, Marberger M, Meyskens F, Minasian L, Parker C, Parnes H, Perner S, Rittenhouse H, Schalken J, Schmid H, Schmitz-Dräger B, Schröder F, Stenzl A, Tombal B, Willt T, Wolk A (2014)** Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. *Lancet Oncol* 15(Pt 11):484–492.

**Czifra G, Varga A, Nyeste K, Marincsak R, Toth B, Kovacs I, Kovacs L, Biro T (2009)** Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(Pt 4):507–514.

**Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokarshvili Z, Pérez C, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B Jr, Glendinning J, Ninomiya Y, Margolskee R (2006)** Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31(Pt 3):253–264.

**Duncan L, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren L, Woolf E, Tepper R, Shyjan A (1998)** Down-Regulation of the Novel Gene Melastatin Correlates with Potential for Melanoma Metastasis. *Cancer Res* 58(Pt 7):1515–1520.

**El-Bayoumy A, Keshta A, Sallam K, Ebeid N, Elsheikh H, Bayoumy B (2018)** Extraction, purification of prostate-specific antigen (PSA), and establishment of radioimmunoassay system as a diagnostic tool for prostate disorders. *J Immunoassay Immunochem* 39(Pt 1):12–29.

**Enklaar T, Esswein M, Oswald M, Hilbert K, Winterpacht A, Higgins M, Zabel B, Prawitt D (2000)** Mtr1, a novel biallelically expressed gene in the center of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, is a member of the Trp gene family. *Genomics* 67(Pt 2):179–187.

**Fang D, Setaluri V (2000)** Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279(Pt 1):53–61.

**Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J, Comber H, Forman D, Bray F (2013)** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49(Pt 6):1374–1403.

**Fleig A, Penner R (2004)** The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features *Trends. Pharmacol Sci* 25(Pt 12):633–639.

**Flourakis M, Prevarskaya N (2009)** Insights into Ca<sup>2+</sup> homeostasis of advanced prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793(Pt 6):1105–1109.

**Fonfria E, Murdock P, Cusdin F, Benham C, Kelsell R, McNulty S (2006)** Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26(Pt 3):159–178.

**Fong M, Hare R, Jarkowski A (2012)** A new era for castrate resistant prostate cancer: a treatment review and update. *J Oncol Pharm Pract* 18:343–354.

**Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paeper B, Wang K (2000)** Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 257(Pt 1):119-130.

**Gaudet R (2008)** A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4(Pt 5):372–379.

**Gaudet R (2009)** Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol* 133(Pt 3):231–237.

**Genova, T, Grolez G, Camillo C, Bernardini M, Bokhobza A, Richard E, Scianna M, Lemonnier L, Valdembri D, Munaron, L, Philips M, Mattot V, Serini G, Prevarskaya N, Gkika D, Pla A (2017)** TRPM8 inhibits endothelial cell migration via a non-channel function by trapping the small GTPase Rap1. *J Cell Biol* 216(Pt 7):2107–2130.

**Gilon P, Shepherd R, Henquin J (1993)** Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 268(Pt 30):22265–22268.

**Gkika D, Flourakis M, Lemonnier L, Prevarskaya N (2010)** PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression. *Oncogene* 29:4611–4616.

**Gkika D, Prevarskaya N (2011)** TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly? *Asian J Androl* 13(Pt 5):673–676.

**Gkika D, Lemonnier L, Shapovalov G, Gordienko D, Poux C, Bernardini M, Bokhobza A, Bidaux G, Degerny C, Verreman K, Guarmit B, Benahmed M, de Launoit Y, Bindels R, Pla A, Prevarskaya N (2015)** TRP channel-associated factors are a novel protein family that regulates TRPM8 trafficking and activity. *J Cell Biol* 208(Pt 1):89–107.

**Gleason D, Mellinger G (1974)** Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111(Pt 1):58–64.

**Gruber C (2008)** Differentialdiagnose beim Lungenkarzinom durch CEA, CYFRA 21-1, NSE und ProGRP [Dissertationsschrift] München: Fachbereich Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität.

**Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, Lehen'kyi V (2018)** TRPM Family Channels in Cancer. *Pharmaceuticals* 11(Pt 58):58–71.

**Hardie R, Minke B (1992)** The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8(Pt 4):643–651.

**Hardie R (2007)** TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J Physiol* 578(Pt 1):9–24.

- Hardie R, Franze K (2012)** Photomechanical responses in *Drosophila* photoreceptors. *Science* 338(Pt 6104):260–263.
- Hardie R (2014)** Photosensitive TRPs. *Handb Exp Pharmacol* 223:795–826.
- van Haute C, De Ridder D, Nilius B (2010)** TRP channels in human prostate. *Sci World J* 10:1597–1611.
- Henquin J (2000)** Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49(Pt 11):1751–1760.
- Henshall S, Afar D, Hiller J, Horvath L, Quinn D, Rasiah K, Gish K, Willhite D, Kench J, Gardiner-Garden M, Stricker P, Scher H, Grygiel J, Agus D, Mack D, Sutherland R (2003)** Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* 63(Pt 14):4196–4203.
- Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell, C (2003)** TRPM5 is a voltage-modulated and Ca<sup>2+</sup>-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13(Pt 13):1153–1158.
- Holdenrieder S, Stieber P (2019)** Humanes Kallikrein 2. In: Gressner A, Arndt T, Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* 3. Auflage Heidelberg: Springer, 1156-1157.
- Holzmann C, Kappel S, Kilch T, Jochum M, Urban S, Jung V, Stöckle M, Rother K, Greiner M, Peinelt C (2015)** Transient receptor potential melastatin 4 channel contributes to migration of androgen-insensitive prostate cancer cells. *Oncotarget* 6(Pt 39):41783–41793.
- Huang L, Shanker Y, Dubauskaite J, Zheng J, Yan W, Rosenzweig S, Spielman A, Max M, Margolskee R (1999)** Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* 2(Pt 12):1055–1062.
- Huang Y, Roper S (2010)** Intracellular Ca<sup>2+</sup> and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol* 588(Pt 13):2343–2350.
- Huggins C, Hodges C (1941)** Studies on prostatic cancer I The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1(Pt 4):293–297.
- Hwang P, Verma A, Brecht D, Snyder S (1990)** Localization of phosphatidylinositol signaling components in rat taste cells: role in bitter taste transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(Pt 19):7395–7399.
- Ikehata F, Satoh J, Nata K, Tohgo A, Nakazawa T, Kato I, Kobayashi S, Akiyama T, Takasawa S, Toyota T, Okamoto H (1998)** Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/ cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes patients. *J Clin Invest* 102(Pt 2):395–401.
- Jordt S, Tominaga M, Julius D (2000)** Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(Pt 14):8134–8139.
- Kalra J, Baker J (2017)** Multiplex Immunohistochemistry for Mapping the Tumor Microenvironment Methods. *Mol Biol* 1554:237–251.

- Kamikochi A, Inagaki H, Effertz T, Hendrich O, Fiala A, Gopfert M, Ito K (2009)** The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature* 458:165–171.
- Kaske S, Krasteva G, Konig P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, Chubanov V (2007)** TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci* 8:49.
- Kato I, Yamamoto Y, Fujimura M, Noguchi N, Takasawa S, Okamoto H (1999)** CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca<sup>2+</sup>], and insulin secretion. *J Biol Chem* 274(Pt 4):1869–1872.
- Kawachi M, Bahnson R, Barry M, Busby J, Carroll P, Carter H, Catalona W, Cookson M, Epstein J, Etzioni R, Giri V, Hemstreet G, MD, Howe R, Lange P, Lilja H, Loughlin K, Mohler J, Moul J, Nadler R, Patterson S, Presti J, Stroup A, Wake R, Wei J, (2010)** Prostate Cancer Early Detection. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 8(Pt 2):240–262.
- Ketterer C, Mussig K, Heni M, Dudziak K, Randrianarisoa E, Wagner R, Machicao F, Stefan N, Holst J, Fritsche A, Haring H, Staiger H (2011)** Genetic variation within the TRPM5 locus associates with prediabetic phenotypes in subjects at increased risk for type 2 diabetes. *Metabolism* 60(Pt 9):1325–1333.
- Kim S, Lee Y, Akitake B, Woodward O, Guggino W, Montell C (2010)** *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(Pt 18):8440–8445.
- Kiessling A, Fussel S, Schmitz M, Stevanovic S, Meye A, Weigle B, Klenk U, Wirth M, Rieber E (2003)** Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate* 56(Pt 4):270–279.
- Kokrashvili Z, Rodriguez D, Yevshayeva V, Zhou H, Margolskee R, Mosinger B (2009)** Release of endogenous opioids from duodenal enteroendocrine cells requires Trpm5. *Gastroenterology* 137(Pt 2):598–606.
- Kuhn F, Luckhoff A (2004)** Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem* 279(Pt 45):46431–46437.
- Kwon Y, Kim S, Ronderos D, Lee Y, Akitake B, Woodward O, Guggino W, Smith D, Montell C (2010)** *Drosophila* TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Curr Biol* 20(Pt 18):1672–1678.
- Kyprianou N, Isaacs J (1988)** Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122(Pt 2):552–562.
- Lang J (1999)** Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J Biochem* 259(Pt 1–2):3–17.
- Launay P, Fleig A, Perraud A, Scharenberg A, Penner R, Kinet, J (2002)** TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109(Pt 3):397–407.
- Leanza L, Biasutto L, Manago A, Gulbins E, Zoratti M, Szabo I (2013)** Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol* 4:227.
- Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007)** TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26:7380–7385.

- Lein M (2003)** Molekulare Formen des PSA in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* 5:3–7.
- Li J, Mahajan A, Tsai M (2006)** Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* 45(Pt 51):15168–15178.
- Li W, Kang L, Piggott B, Feng Z, Xu X (2011)** The neural circuits and sensory channels mediating harsh touch sensation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2:315.
- Lilja H, Laurell C (1985)** The predominant protein in human seminal coagulate. *Scand J Clin Lab Invest* 45(Pt 7):635-641.
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell C-B (1987)** Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 80(Pt 2):281–285.
- Lilja H, Ulmert D, Vickers A (2008)** Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 8(Pt 4):268–278.
- Liman E, Corey D, Dulac C (1999)** TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(Pt 10):5791–5796.
- Liman E (2010)** A TRP channel contributes to insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Islets* 2(Pt 5):331–333.
- Liman E (2014)** Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. *Handbook of Experimental Pharmacology* 222:489–502.
- Lin W, Ezekwe E, Zhao Z, Liman E, Restrepo D (2008)** TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium. *BMC Neurosci* 9:114.
- Lindemann B (2001)** Receptors and transduction in taste. *Nature* 413(Pt 6852):219–225.
- Liu C, Montell C (2015)** Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem and Biophys Res Communications* 460(Pt 1):22–25.
- Liu D, Liman E (2003)** Intracellular  $Ca^{2+}$  and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(Pt 25):15160–15165.
- Liu D, Zhang Z, Liman E (2005)** Extracellular acid block and acid-enhanced inactivation of the  $Ca^{2+}$ -activated cation channel TRPM5 involve residues in the S3–S4 and S5–S6 extracellular domains. *J Biol Chem* 280(Pt 21):20691–20699.
- Liu P, Shah B, Croasdell S, Gilbertson T (2011)** Transient receptor potential channel type M5 is essential for fat taste. *J Neurosci* 31(Pt 23):8634–8642.
- Luboldt H, Rübber H (2000)** PSA – Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Der Urologe* 39:22–26.
- Mao Z, Ji A, Yang K, He W, Hu Y, Zhang Q, Zhang D, Xie L (2018)** Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer. *Medicine (Baltimore)* 97(Pt 42):e12806.
- Mitrovic S, Nogueira C, Cantero-Recasens G, Kiefer K, Fernández-Fernández J, Popoff J, Casano L, Bard F, Gomez R, Valverde M, Malhotra V (2013)** TRPM5-mediated calcium uptake regulates mucin secretion from human colon goblet cells. *eLife* 2:1–25.



**Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos S, Veldhuisen B, Saris J, Reynolds D, Cai Y, Gabow P, Pierides A, Kimberling W, Breuning M, Deltas C, Peters D, (1996)** PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272 (Pt 5266):1339–1342.

**Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat J, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarskaya N (2010)** Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70(Pt 3):1225–1235.

**Monteith G, McAndrew D, Faddy H, Roberts-Thomson S (2007)** Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat Rev Cancer* 7(Pt 7):519–530.

**Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985)** Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230(Pt 4729):1040–1043.

**Montell C, Rubin G (1989)** Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2(Pt 4):1313–1323.

**Montell C (2001)** Physiology, phylogeny and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2001(Pt 90), re1.

**Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford E, Caterina M, Clapham D Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg A, Schultz G, Shimizu N, Zhu M (2002a)** A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9(Pt 2):229–231.

**Montell C, Brinbaumer L, Flockerzi V (2002b)** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108(Pt 5):595–598.

**Montell C (2005)** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005, re3.

**Montell C (2012)** *Drosophila* visual transduction *Trends. Neurosci* 35:356–363.

**Montgomery R, Mostaghel E, Vessella R, Hess D, Kalthorn T, Higano C, True L, Nelson P (2008)** Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration resistant tumor growth. *Cancer Res* 68(Pt 11):4447–4454.

**Moradi A, Srinivasan S, Clements J, Batra J (2019)** Beyond the biomarker role: prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 38(Pt 3):333–346.

**Morelli M, Liberati S, Amantini C, Nabiss M, Santoni M, Farfariello V, Santoni G (2013)** Expression and function of the transient receptor potential ion channel family in the hematologic malignancies. *Curr Mol Pharmacol* 6(Pt 3):137–148.

**Mosavi L, Cammett T, Desrosiers D, Peng Z (2004)** The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13(Pt 6):1435–1448.

**Nauli S, Alenghat F, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia A, Lu W, Brown E, Quinn S, Ingber D, Zhou J (2003)** Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33(Pt 2):129–137.

**Newsholme P, Gaudel C McClenaghan N (2010)** Nutrient Regulation of Insulin Secretion and  $\beta$ -Cell Functional Integrity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 654:91–114.

- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003)** Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup> activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278(Pt 33):30813–30820.
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Droogmans G (2004)** Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4b. *Pflugers Arch* 448(Pt 1):70–75.
- Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Zhu M (2005a)** Regulation of the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280(Pt 8):6423–6433.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005b)** Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567(Pt 1):35–44.
- Nilius B, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Wang C, Zhu M, Voets T (2005c)** The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280(Pt 24):22899–22906.
- Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R, Voets T (2006)** The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J* 25(Pt 3):467–478.
- Nilus B, Owsianik G (2011)** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 12:218.
- Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba N, Zuker C (2013)** High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494(Pt 7438):472–475.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003)** Regulation of cell death: the calciumapoptosis link *Nature reviews*. *Mol Cell Biol* 4:552–565.
- Ortiga-Carvalho T, Chiamolera M, Pazos-Moura C, Wondisford F (2016)** Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr Physiol* 6(Pt 3):1387–1428.
- Ozougwu J, Obimba K, Belonwu C, Unakalamba C (2013)** The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(Pt 4):46–57.
- Pedersen S Owsianik G, Nilius B (2005)** TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38(Pt 3–4):233–252.
- Perraud A, Fleig A, Dunn C, Bagley L, Launay P, Schmitz C, Stokes A, Zhu Q, Bessman M, Penner R, Kinet J, Scharenberg A (2001)** ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411(Pt 6837):595–599.
- Pérez C, Huang L, Rong M, Kozak J, Preuss A Zhang H, Max M, Margolskee R (2002)** A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5(Pt 11):1169–1176.
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R (2008)** Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27(Pt 50):6407–6418.
- Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, Gartner B, Spangenberg C, Winterpacht A, Higgins M, Pelletier J, Zabel B (2000)** Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p155 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9(Pt 2):203–216.

**Prawitt D, Monteilh-Zoller M, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R (2003)** TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *PNAS* 100(Pt 25):15166–15171.

**Prescott E, Julius D (2003)** A modular PIP<sub>2</sub> binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300(Pt 5623):1284–1288.

**Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, Thebault S, Skryma R (2007a)** Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 1):133–135.

**Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007b)** TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1772(Pt 8):937–946.

**Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2010)** Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16(Pt 3):107–121.

**Rahier J, Goebbels R, Henquin J (1983)** Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24(Pt 5):366–371.

**Ramsey S, Delling M, Clapham D (2006)** An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647.

**Rekasi Z, Schally A, Plonowski A, Czompoly T, Csernus B, Varga J (2001)** Regulation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Gene Expression and Release in LNCaP Prostate Cancer by Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone and Vasoactive Intestinal Peptide. *The Prostate* 48(Pt 3):188–199.

**Ren Z, Rhyu M, Phan T, Mummalaneni S, Murthy K, Grider J, Desimone J, Lyall V (2013)** TRPM5-dependent amiloride- and benzamil-insensitive NaCl chorda tympani taste nerve response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(Pt 1):G106–G117.

**Riegman P, Vlietstra R, van der Korput J, Romijn J, Trapman J (1989)** Characterization of the prostate-specific antigen: a novel human kallikrein-like gene. *Biochem and Biophys Res Commun* 159(Pt 1):95–102.

**Riegman P, Vlietstra R, van der Korput J, Brinkmann A, Trapman J (1991)** The Promoter of the Prostate-Specific Antigen Gene Contains a Functional Androgen Responsive Element. *Mol Endocrinol* 5(Pt 12):1921–1930.

**Roberts M, Chow C, Schirra H, Richards R, Buck M, Selth L, Doi S, Samaratunga H, Perry-Keene J, Payton D, Yaxley J, Lavin M, Gardiner R (2015)** Diagnostic performance of expression of PCA3, Hepsin and miR biomarkers in ejaculate in combination with serum PSA for the detection of prostate cancer. *Prostate* 75(Pt 5):539–549.

**Roderick H, Cook S (2008)** Ca<sup>2+</sup> signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8(Pt 3):361–375.

**Rodrigues D, Butler L, Estelles D, de Bono J (2013)** Molecular pathology and prostate cancer therapeutics: from biology to bedside. *J Pathol* 232:178–184.

**Rohacs T, Lopes C, Michailidis I, Logothetis D (2005)** PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8(Pt 5):626–634.

**Romanski K, Bochenek W (1983)** Effect of secretin, pancreaticozymin OP-CCK, and glucagon on bile flow and bile lipid secretion in rats. *Gut* 24(Pt 9):803–806.

**Rose M, Voynow J (2006)** Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86(Pt 1):245–278.

**Rosler P, Kroner C, Freitag J, Noe J, Breer H (1998)** Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur J Biol* 77(Pt 3):253–261.

**Runnels L, Yue L, Clapham D (2001)** TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291(Pt 5506):1043–1047.

**Safayhi H, Haase H, Kramer U, Bihlmayer A, Roenfeldt M, Ammon H, Froschmayr M, Cassidy T, Morano I, Ahlijanian M, Striessnig J (1997)** L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol* 11(Pt 5):619–629.

**Saini S (2016)** PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol* 39(Pt 2):97–106.

**Satkunasivam R, Zhang W, Trachtenberg J, Toi A, Yu C, Diamandis E, Kattan M, Narod S Nam R (2014)** Human kallikrein-2 gene and protein expression predicts prostate cancer at repeat biopsy. *Springerplus* 3:295.

**Schmitz C, Perraud A, Johnson C, Inabe K, Smith M, Penner R, Kurotaki T, Fleig A, Scharenberg A (2003)** Regulation of vertebrate cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis by TRPM7. *Cell* 114(Pt 2):191–200.

**Schulz C, Oster H, Lehnert H (2015)** Einführung in die Prinzipien der Endokrinologie. In: Lehnert H, Hrsg. *Rationale Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel* 4. Auflage Stuttgart: Thieme 36–47.

**Schönberg D, Bao S, Rich J (2012)** TRP-ing up brain tumors. *Nat Med* 18:1175–1176.

**Shah B, Liu P, Yu T, Hansen D, Gilbertson T (2011)** TRPM5 is critical for linoleic acid-induced CCK secretion from the enteroendocrine cell line, STC-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(Pt 1):C210–C219.

**Shin J, Adams D, Paukert M, Siba M, Sidi S Levin M, Gillespie P, Gründer S (2005)** *Xenopus* TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(Pt 35):12572–12577.

**Sidi S, Friedrich R, Nicolson T (2003)** NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 301(Pt 5629):96–99.

**Siegel R, Miller K, Jemal A (2016)** Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66(Pt 1):7–30.

**Smani T, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N, Rosado J (2015)** Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochim et Biophys Acta* 1853(Pt 8):1772–1782.

**So A, Hurtado-Coll A, Gleave, M (2003)** Androgens and prostate cancer. *World J Urol* 21:325–337.

**Somlo S (1996)** PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272(Pt 5266):1339–1342.

**Spielman A, Nagai H, Sunavala G, Dasso M, Breer H, Boekhoff I, Huque T, Whitney G, Brand J (1996)** Rapid kinetics of second messenger production in bitter taste. *Am J Physiol* 270(3 Pt 1):C926–C931.

**Stanbrough M, Bubley G, Ross K, Golub T, Rubin M, Penning T, Febbo P, Balk S (2006)** Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 66(Pt 5):2815–2825.

**Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger R (1982)** Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31(8 Pt 1):694–700.

**Stenman U, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O (1991)** A complex between prostate-specific antigen and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Research* 51(Pt 1):222–226.

**Stieber P, Bodenmüller H, Banauch D, Hasholzner U, Dessauer A, Ofenloch-Hähnle B, Jaworek D, Fateh-Moghadam A (1993)** Cytokeratin 19 fragments: a new marker for non-small-cell lung cancer. *Clin Biochem* 26(Pt 4):301–304.

**Story G, Peier A, Reeve A, Eid S, Mosbacher J, Hricik T, Earley T, Hergarden A, Andersson D, Hwang S, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003)** ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112(Pt 6):819–829.

**Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau J, Kennedy J, Acierno J, Bove C, Kaneshki C, Nagle J, Bromley M, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt S (2000)** Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* 9(Pt 17):2471–2478.

**Sun Y, Liu L, Ben-Shahar Y, Jacobs J, Eberl D, Welsh M (2009)** TRPA channels distinguish gravity sensing from hearing in Johnston's organ. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(Pt 32):13606–13611.

**Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee R, Nilius B (2005)** Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438(Pt 7070):1022–1025.

**Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A, Gordienko D, Roudbaraki M, Delcourt P, Panchin Y, Shuba Y, Skryma5 R, Prevarskaya N (2005)** Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 280(Pt 47):39423–39435.

**Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal J, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N (2006)** Differential role of transient receptor potential channels in  $Ca^{2+}$  entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66(Pt 4):2038–2047.

**Timmermand O, Elgqvist J, Beattie K, Örbom A, Larsson E, Eriksson S, Thorek D, Beattie B, Tran T, Ulmert D, Strand S-E (2019)** Preclinical efficacy of hK2 targeted [ $^{177}Lu$ ]hu11B6 for prostate cancer theranostics. *Theranostics* 9(Pt 8):2129–2142.

**Thompson I, Pauler D, Goodman P, Tangen C, Lucia M, Parnes H, Minasian L, Ford L, Lippman S, Crawford E, Crowley J, Coltman C (2004)** Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  40 ng per milliliter. *NEJM* 350(Pt 22):2239–2246.

**Thompson L (2006)** PSA: a biomarker for disease A biomarker for clinical trials How useful is it? *Journal of Nutrition* 136:2704.

**Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015)** Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(Pt 2):87–108.

**Tsavalier L, Shapero M, Morkowski S, Laus R (2001)** Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61(Pt 9):3760–3769.

**Tsui K, Chang P, Lin H, Juang H (2004)** Down-regulation of the prostate specific antigen promoter by p53 in human prostate cancer cells. *J Urol* 172(Pt 5):2035–2039.

**Venkatachalam K, Hofmann T, Montell C (2006)** Lysosomal localization of TRPML3 depends on TRPML2 and the mucopolidosis-associated protein TRPML1. *J Biol Chem* 281(Pt 25):17517–17527.

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

**Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004)** The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430(Pt 7001):748–754.

**Walker R, Willingham A, Zuker C (2000)** A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287(5461):2229–2234.

**Wang M, Valenzuela L, Murphy G, Chu T (1979)** Purification of a human prostate specific antigen. *Investig Urol* 17(Pt 2):159–163.

**Watson P, Arora V, Sawyers C (2015)** Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 15(Pt 12):701–711.

**Welch H, Black W (2010)** Overdiagnosis in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 102(Pt 9):605–613.

**Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park J, Reynolds D, Maeda Y, Le T, Hou H, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (1998)** Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93(Pt 2):177–188.

**Wu L, Sweet T, Clapham D (2010)** International Union of Basic and Clinical Pharmacology LXXVI Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev* 62(Pt 3):381–404.

**Yagui K, Shimada F, Mimura H, Hashimoto N, Suzuki Y, Tokuyama Y, Nata K, Tohgo A, Ikehata F, Taksawa S, Okamoto H, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A (1998)** A missense mutation in the CD38 gene, a novel factor for insulin secretion: association with Type II diabetes mellitus in Japanese subjects and evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia* 41(Pt 9):1024–1028.

**Yan Z, Zhang W, He Y, Gorczyca D, Xiang Y, Cheng L, Meltzer S, Jan L, Jan Y (2013)** *Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation. *Nature* 493(Pt 7431):221–225.

**Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart C (2006)** Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85.

**Zarghami N, Grass L, Diamandis E (1997)** Steroid hormone regulation of PSA gene expression in breast cancer. *Br J Cancer* 75(Pt 4):579–588.

**Zeng X, Sikka S, Huang L, Sun C, Xu C, Jia D, Abdel-Mageed A, Pottle J, Taylor J, Li M (2010)** Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13(Pt 2):195–201.

**Zhang L, Barritt GJ (2004)** Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 64(Pt 22):8365–8373.

**Zhang Y, Hoon M, Chandrashekar J, Mueller K, Cook B, Wu D, Zuker C, Ryba N (2003)** Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112(Pt 3):293–301.

**Zhang Z, Okawa H, Wang Y, Liman E (2005)** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J Biol Chem* 280(Pt 47):39185–39192.

**Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E (2007)** The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci* 27(Pt 21):5777–5786.

**Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996)** trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Cell* 85(Pt 5):661–671.

**Zhu Y, Han C, Zhang G, Liu F, Ding Q, Xu J, Vidal A, Freedland S, Ng C, Ye D (2016)** Effect of body mass index on the performance characteristics of PSA-related markers to detect prostate cancer. *Sci Rep* 6:19034.

**Zitt C, Zobel A, Obukhov A, Harteneck C, Kalkbrenner F, Luckhoff A, Schultz G (1996)** Cloning and functional expression of a human  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16(Pt 6):1189–1196.

Internetquelle 1 [zitiert am 25.05.2018]

<https://www.krebsinformationsdienst.de/vorbeugung/frueherkennung/frueherkennung.php>

Internetquelle 2 [zitiert am 13.07.2019]

[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html)

Internetquelle 3 [zitiert am 25.05.2018]

<https://www.prostata.de/wissen/untersuchung/psa-bestimmung>

Internetquelle 4 [zitiert am 12.03.2018]

<https://openwetware.org/wiki/Nanodrop>

Internetquelle 5 [zitiert am 17.03.2018]

<http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/images/gelbox.jpg>

Internetquelle 6 [zitiert am 01.04.2018]

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4a/Polymerasekettenreaktion.svg>

Internetquelle 7 [zitiert am 23.04.2016]

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

Internetquelle 8 [zitiert am 05.09.2019]

<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsstatistiken.php>



## 8 Danksagung

# LEBENS LAUF



