

# Über die physiologische Funktion von TRPV6-Ionenkanälen in Plazenta, Eihülle und Uterus

Aus der medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Dr. rer. nat.

eingereichte Dissertation

von  
Herrn Manuel Winter  
geb. am 02.07.1990  
in  
Neunkirchen (Saar)

Homburg, Juli 2021

Tag der Promotion: 16.03.2022

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Stephan Philipp  
Prof. Dr. med. Erich-Franz Solomayer

„Ein Experte ist jemand, der in einem begrenzten Bereich  
schon alle möglichen Fehler gemacht hat.“

(Niels Henrik David Bohr 1885-1962, dänischer Physiker)

## Danksagung

Danke sagen möchte ich vor allem Dr. Claudia Fecher-Trost, die mich fachlich und menschlich über die gesamte Zeit begleitete und mir sehr viele wertvolle Tipps mit auf den Weg gegeben hat. Mein Dank gilt Professor Dr. Veit Flockerzi für die Betreuung und die Möglichkeit, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Meinem Erstgutachter PD Dr. Stephan Philipp danke ich für die vielen Stunden anregender Diskussionen bezüglich möglicher Interpretationen meiner Daten und die tatkräftige Unterstützung bei deren Niederschrift.

Dr. Thabet Belkacemi danke ich, dass er sich immer viel Zeit genommen hat, um mir diverse Techniken beizubringen. PD Dr. Ulrich Wissenbach danke ich für die vielen fachlich produktiven Diskussionen. Diese haben mich immer aufs Neue motiviert und auf neue Ideen gebracht. Dr. Petra Weissgerber danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung. Sie hat mir viel über Strategien bei der Herstellung von Mausmodellen beigebracht. Herzlichen Dank geht auch an Sandra Plant. Sie hat mir gezeigt, wie es im Labor läuft und hat mich über die gesamte Zeit mit ihrer praktischen Expertise unterstützt. Ich danke Francis Glaser, Johannes Stegner und Tanja Maurer für die Unterstützung bei meinen Experimenten. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Heidi Löhr, Christine Wesely, Stefanie Buchholtz, Martin Simon-Thomas, Ute Soltek, Claudia Ecker, Rene Tinschert, Tillmann Pick und Mahsa Mahlipour für die angenehme Zeit im Labor und für alle fachlichen und technischen Ratschläge. Ich danke ALLEN Mitarbeitern der Pharmakologie. Sehr dankbar bin ich auch meinen Eltern, meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin Marie Christin Bodon, ohne deren Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre.

Für folgende Tätigkeiten, die nicht von mir persönlich durchgeführt wurden möchte ich mich besonders bedanken. Die Verpaarungen der Tiere wurden von Johannes Stegner organisiert und durchgeführt. Die Genotypisierung der Mäuse wurde von Johannes Stegner und Francis Glaser übernommen. Tanja Maurer hat die Zyklusbestimmungen durchgeführt. Karolin Klein hat im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit einen Teil der Aufarbeitung und der massenspektrometrischen Analyse der primären Trophoblasten übernommen. Frau Dr. Claudia Fecher-Trost und Francis Glaser haben den Fibronectin-Hydrolyse-Assay durchgeführt. Der TRPV6-Antagonist wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Michael Schäfer aus Leipzig zur Verfügung gestellt.

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
II.	Abbildungsverzeichnis .....	X
III.	Tabellenverzeichnis .....	XII
1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Murine Plazenta.....	5
2.1.1	Entwicklung, Aufbau und Funktion der murinen Plazenta.....	5
2.1.2	Entwicklung und Funktion muriner Trophoblasten .....	8
2.2	Entwicklung, Aufbau und Funktion der murinen Eihülle.....	9
2.3	Funktion des murinen Uterus während des Estruszyklus und der Schwangerschaft.....	10
2.3.1	Die hormonelle Regulation des murinen Estruszyklus.....	10
2.3.2	Der murine Uterus während Adhäsion und Implantation des Embryos .....	12
2.4	TRP-Ionenkanäle.....	13
2.5	TRPV6-Ionenkanäle .....	16
2.5.1	Struktur und Expression des <i>Trpv6</i> -Gens.....	16
2.5.2	Struktur und Funktion von TRPV6-Ionenkanälen.....	17
2.5.3	TRPV6-assoziierte Erkrankungen des Menschen .....	18
2.5.4	Physiologische Funktionen von TRPV6-Ionenkanalproteinen.....	19
2.5.5	Expression und mögliche Funktionen von <i>Trpv6</i> in Plazenta, Eihülle und Uterus der Maus.....	20
2.6	Zielsetzung .....	21
3	Material und Methoden .....	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Chemikalien .....	22
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	22
3.1.2.1	Lösungen für die primäre Zellkultur .....	22
3.1.2.2	Lösungen für proteinbiochemische Experimente .....	22
3.1.2.3	Lösungen für massenspektrometrische Experimente .....	24
3.1.2.4	Lösung für elektrophysiologische Experimente.....	25
3.1.2.5	Lösungen für Ca <sup>2+</sup> - Imaging Experimente.....	25
3.1.3	Antikörper.....	26
3.1.4	Mauslinien.....	27
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Kultivierung und Charakterisierung von Mäusen .....	27
3.2.2	Isolierung von Plazenta, Eihülle und Uterus .....	28
3.2.3	Morphometrische Analyse der Chorionplatte.....	28
3.2.4	Herstellung und Färbung von Kryoschnitten.....	28
3.2.5	Trophoblastenprimärkultur.....	29
3.2.5.1	Isolierung von primären Trophoblasten aus der murinen Plazenta .....	29
3.2.5.2	Azur- und Eosin- Färbung .....	30
3.2.5.3	Analyse des Wachstums primärer Trophoblasten in Zellkultur .....	30
3.2.5.4	Transwell Migration Assay.....	30
3.2.5.5	Zellaktivitätstest.....	31
3.2.5.6	Apoptose / Nekrose-Assay.....	31
3.2.5.7	Immunzytochemie .....	32
3.2.5.8	Ca <sup>2+</sup> -Imaging.....	32
3.2.6	Proteinbiochemie .....	33
3.2.6.1	Herstellung von RIPA-Lysat .....	33
3.2.6.2	Proteinbestimmung (BCA-Assay).....	33
3.2.6.3	Immunpräzipitation.....	33
3.2.6.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.2.6.5	Western-Blot .....	34
3.2.6.6	Fibronektin-Hydrolyse-Assay.....	34

3.2.7	Massenspektrometrie .....	35
3.2.7.1	Probenvorbereitung.....	35
3.2.7.2	Massenspektrometrische Analyse.....	36
3.2.7.3	Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten.....	37
3.2.8	Elektrophysiologische Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) der murinen Eihülle (Ussing-Kammer).....	38
3.2.9	Datenverarbeitung und Statistik.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Vorkommen und Funktion von TRPV6 in Plazenta und plazentaren Trophoblasten am Tag E13,5 .....	39
4.1.1	Untersuchungen der murinen Plazenta .....	39
4.1.1.1	Nachweis von TRPV6 in der Plazenta.....	39
4.1.1.2	TRPV6-abhängige Veränderungen von Labyrinthzone und Chorionplatte.....	40
4.1.1.3	Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Plazenten.....	43
4.1.1.4	Die proteolytische Aktivität ist in TRPV6-defizienten Plazenten erhöht.....	45
4.1.2	Untersuchung von primären Trophoblasten.....	45
4.1.2.1	Charakterisierung von primären Trophoblasten aus Mausplazenta .....	46
4.1.2.2	Nachweis von TRPV6 in primären Trophoblasten .....	46
4.1.2.3	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> auf Wachstum und Zellmorphologie von Trophoblasten der Maus .....	47
4.1.2.4	TRPV6 beeinflusst das Migrationsverhalten primärer Trophoblasten nicht.....	49
4.1.2.5	Die Vitalität primärer Trophoblasten ist unabhängig von TRPV6 .....	50
4.1.2.6	Apoptose und Nekrose werden in Trophoblasten nicht durch TRPV6 beeinflusst.....	51
4.1.2.7	Die basale Ca <sup>2+</sup> -Konzentration ist in TRPV6-defizienten Trophoblasten reduziert.....	52
4.1.2.8	Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Trophoblasten.....	53
4.2	Vorkommen und Funktion von TRPV6 in der Eihülle am Tag E13,5 .....	57
4.2.1	Nachweis von TRPV6 in der murinen Eihülle .....	57
4.2.2	TRPV6 beeinflusst die Morphologie der Eihülle nicht .....	58
4.2.3	Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Eihüllen .....	60
4.2.4	Der transepitheliale Widerstand (TER) ist in TRPV6-defizienten Eihüllen erhöht.....	63
4.3	Vorkommen und Funktion von TRPV6 im Uterus am Tag E13,5.....	64
4.3.1	Nachweis von TRPV6 im schwangeren Uterus .....	64
4.3.2	Vergleichende Proteomanalyse von schwangeren WT- und TRPV6-defizienten Uteri .....	65
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Plazenta, Trophoblasten, Eihülle und schwangerem Uterus.....	68
4.5	Einfluss der TRPV6-Expression auf die uterine Proteinexpression während des Estruszyklus der Maus.....	69
4.5.1	TRPV6 wird im nicht schwangeren Uterus zyklusabhängig exprimiert.....	69
4.5.2	Vergleichende zyklusabhängige Proteomanalyse des nicht schwangeren Uterus aus WT- und TRPV6 <sup>mt/mt</sup> -Tieren .....	71
4.5.2.1	Diestrus.....	72
4.5.2.2	Proestrus.....	74
4.5.2.3	Estrus.....	75
4.5.2.4	Metestrus .....	77
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Proteomanalysen von Uteri aus allen vier Zyklusstadien.....	79
5	Diskussion .....	80
5.1	TRPV6 in der murinen Plazenta und Trophoblasten .....	80

5.1.1	Einfluss des TRPV6 Proteins auf Morphologie, Calciumgehalt und Wachstum von Trophoblasten.....	80
5.1.2	TRPV6 steuert die proteolytische Aktivität von Trophoblasten.....	81
5.2	Rolle von TRPV6 in der murinen Eihülle .....	85
5.3	Einfluss von TRPV6 auf die Proteinexpression im schwangeren Uterus .....	87
5.4	Einfluss der Expression des nicht-funktionellen TRPV6-Proteins auf den Estruszyklus .....	88
6	Literaturverzeichnis .....	90
6.1	Eigene Veröffentlichungen.....	105
6.2	Vorträge und Präsentationen .....	105
7	Lebenslauf .....	106

## I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CCC	Zytotrophoblastzellsäulen
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
Cre	causes recombination
CP	chronische Pankreatitis
CTGC	Kanal Trophoblast Riesenzellen
D	Glutamat
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
et al.	et alii
EPC	extraplazentarer Kegel
ExE	extraembryonales Ektoderm
FACS	Durchflusszytometrie
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. G-Kraft
GCM1	Glial cells missing 1
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GlyT	Glykogen Trophoblasten
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IAA	Iodacetamid
ICM	innere Zellmasse
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KO	Knock Out
LH	luteisierendes Hormon
mM	Millimolar
ml	Milliliter
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
mTSC	murine Trophoblasten Stammzellen
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NGS	Normal Goat Serum

PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	potential hydrogenii
PTGC	parietale Trophoblastenriesenzellen
PTH	Parathormon
PLF	Prolactin Releasing Factor
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
SpATGC	Spiralarterien assoziierte Trophoblastenriesenzellen
SpT	Spongiotrophoblasten
STB	Synzytiotrophoblasten
Syn-T1	Synzytiotrophoblasten Schicht 1
Syn-T2	Synzytiotrophoblasten Schicht 2
TBS	Tris-buffered saline
TE	Trophoektoderm
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGC	Trophoblasten Riesenzellen
TNHP	transienter neonataler Hyperparathyroidismus
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin
TRP	Transient Receptor Potential
TNHP	transienter neonataler Hyperparathyroidismus
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatographie
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung einer hämochorialen murinen Plazenta (A, modifiziert nach Hemberger et al. 2020) und fetomaternalen Blutbarriere der Labyrinthzone (B, vergrößert, modifiziert nach Woods et al. 2018).....	6
Abbildung 2: Differenzierung von Trophoblastenstammzellen (mTSC, modifiziert nach Natale et al. 2017).....	8
Abbildung 3: Morphologische Unterschiede der Eihüllen von Maus und Mensch (modifiziert nach Furukawa et al. 2019).....	9
Abbildung 4: Aufbau des murinen Uterus (modifiziert nach De Clercq und Vriens 2018).....	11
Abbildung 5: Plasmahormonkonzentrationsverlauf während der vier Stadien Proestrus, Estrus, Metestrus und Diestrus des murinen Estruszyklus (modifiziert nach McLean et al. 2012).....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Adhäsion und Implantation der Blastozyste in das uterine Gewebe (modifiziert nach Qi et al. 2014).....	12
Abbildung 7: Dendrogramm der TRP-Familien in Säugetieren (modifiziert nach Clapham 2003 und Flockerzi 2014).....	13
Abbildung 8: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des N- und C-Terminus der verschiedenen TRP-Familien (modifiziert nach (Méndez-Reséndiz et al. 2020)).....	14
Abbildung 9: Seitliche Ansicht (A) und extrazelluläre Aufsicht (B) der Kristallstruktur eines TRPV6-Homotetramers, jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt (modifiziert nach Saotome et al. 2016).....	17
Abbildung 10: Nachweis des TRPV6-Proteins in der Plazenta (E13,5) von WT-Mäusen nach Immunpräzipitation mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.....	39
Abbildung 11: Morphologische Analyse der murinen Chorionplatte von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Embryonen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.....	41
Abbildung 12: Morphologische Analyse der murinen Labyrinthzone der Plazenta aus WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.....	42
Abbildung 13: Massenspektrometrische Proteomanalyse der murinen Plazenta am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	44
Abbildung 14: Analyse der proteolytischen Aktivität in WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Plazenten (E13,5) (entnommen aus Winter et al. 2020).....	45
Abbildung 15: Immunzytochemischer Nachweis von trophoblasten-spezifischen Markerproteinen in isolierten WT-Trophoblasten.....	46
Abbildung 16: Nachweis des TRPV6-Proteins in isolierten Trophoblasten (E13,5) von WT-Mäusen.....	47
Abbildung 17: Analyse des Wachstums und der Zellmorphologie von isolierten primären Trophoblasten in Zellkultur aus Plazenten (E13,5) von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	48
Abbildung 18: Migrationsverhalten von isolierten primären Trophoblasten aus Plazenta am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT-, <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> -Mäusen.....	49
Abbildung 19: Vitalität primärer Trophoblasten aus Plazenten von WT-, <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> -Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft.....	50

Abbildung 20: Apoptose und Nekrose primärer Trophoblasten aus Plazenta vom Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	51
Abbildung 21: Basale Ca <sup>2+</sup> -Konzentration isolierter Trophoblasten (E13,5) von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Tieren am Tag 13,5 der Schwangerschaft.....	52
Abbildung 22: Massenspektrometrische Proteomanalyse von murinen Trophoblasten am Tag 13,5 der Schwangerschaft aus WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	54
Abbildung 23: Immunzytochemie zum Nachweis von Fibronectin in WT und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Trophoblasten von Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft.....	55
Abbildung 24: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion, Ionentransport und Hormonaktivität, die in primären Trophoblasten von WT- (n=5) und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> (n=5)-Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden.....	56
Abbildung 25: Nachweis des TRPV6-Proteins in Eihüllen aus WT-, <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -, <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> - und <i>Trpv6-IC/eRosa-rGFP</i> -Mäusen am Tag 13.5 der Schwangerschaft.....	57
Abbildung 26: Morphologische Analyse der murinen Eihülle von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Embryonen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.....	59
Abbildung 27: Massenspektrometrische Proteomanalyse der murinen Eihülle am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	61
Abbildung 28: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion und Ionentransport, die in Eihüllen von WT- (n=5) und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> (n=5)-Mäusen an Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden.....	62
Abbildung 29: Elektrophysiologische Messung des transepithelialen Widerstands der Eihüllen von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft mittels Ussing-Kammer .....	63
Abbildung 30: Nachweis von TRPV6 in schwangerem Uterus (E13,5) von WT-Mäusen mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.....	64
Abbildung 31: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen schwangeren Uterus am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	66
Abbildung 32: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion, Ionentransport und Hormonaktivität, die in Uteri von WT- (n=3) und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> (n=3)-Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden.....	67
Abbildung 33: Analyse von TRPV6 in Uteri von WT-, <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> - und <i>Trpv6</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen während der Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.....	70
Abbildung 34: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus zu den verschiedenen Estruszyklusstadien (Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus) von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> - Mäusen.....	72
Abbildung 35: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Diestrus von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> -Mäusen.....	73
Abbildung 36: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Proestrus von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> -Mäusen.....	75
Abbildung 37: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Estrus von WT- und <i>Trpv6</i> <sup>mt/mt</sup> -Mäusen.....	76

Abbildung 38: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Metestrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Mäusen.....78

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper für Western-Blot (WB), Immunzytochemie (ICC), Immunpräzipitation (IP).....	26
Tabelle 2: Sekundärantikörper für Western-Blot (WB), Immunzytochemie (ICC).....	26
Tabelle 3: Verwendete Mausmodelle und ihre genetischen Modifikationen.....	27
Tabelle 4: Signalgebung Apoptose / Nekrose-Assay.....	32
Tabelle 5: Zur Trennung der tryptischen Peptide verwendete HPLC Gradienten.....	36
Tabelle 6: Einstellungen und Parameter der Software Proteom Discoverer 1.4.....	37
Tabelle 7: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Plazenta, Trophoblasten, Eihülle und schwangerem Uterus von WT- und <i>Trpv6<sup>-/-</sup></i> -Tieren bezüglich der Expression von Proteasen, Antitrypsinen, Annexinen und Fibronectin.....	68
Tabelle 8: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Uteri der vier Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus von WT- und <i>Trpv6<sup>mt/mt</sup></i> -Geweben bezüglich der Expression von Proteasen, Antitrypsinen, Annexinen und Fibronectin.....	79

## 1 Zusammenfassung

TRPV6-Ionenkanäle besitzen eine besonders hohe Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und sind an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase verschiedener Gewebe wie z.B. Uterus, Plazenta und Nebenhoden beteiligt. Demgemäß beeinflusst ihr Fehlen die Reproduktionsmechanismen beider Geschlechter. So zeigen homozygote TRPV6-defiziente, männliche Mäuse eine gestörte Spermienreifung, welche auf eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Lumen des Nebenhodens zurückzuführen ist. Dagegen zeigen TRPV6-defiziente Embryonen, die sich in TRPV6-defizienten Müttern entwickeln, ein verzögertes Wachstum und eine unzureichende Knochenmineralisierung. Dieser Phänotyp der Maus ähnelt dem Krankheitsbild eines neonatalen Hyperparathyroidismus beim Menschen, dem eine unzureichende Calciumversorgung des Embryos über die Plazenta aufgrund von *Trpv6*-Genmutationen zugrunde liegt. Die Neugeborenen leiden an Skelettverformungen und untermineralisierten Knochen. Zur Untersuchung der Ursachen embryonaler Fehlbildungen in TRPV6-defizienten Mäusen wurden in dieser Arbeit TRPV6-exprimierende Gewebe analysiert, welche an der Embryogenese beteiligt sind.

Im nicht schwangeren Uterus, im schwangeren Uterus, in Plazenta und in Trophoblasten sowie in der Eihülle konnte das TRPV6-Protein nach Immunpräzipitation durch Massenspektrometrie und Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. TRPV6-defiziente Gewebe zeigten eine verstärkte Expression verschiedener Proteasen. In der Plazenta war Granzyme F, in den Trophoblasten waren die Granzyme C, F, G und HTRA1, im schwangeren Uterus die Granzyme C, E, F und in der Eihülle war Cathepsin D signifikant erhöht. Die Proteaseinhibitoren Alpha-1-antitrypsin 1-4 (A1AT4) und Alpha-1-antitrypsin 1-5 (A1AT5) waren hingegen in Abwesenheit von TRPV6 deutlich reduziert.

In TRPV6-defizienten Plazenten zeigte sich die Oberfläche der Labyrinthzone verringert und die Chorionplatte vergrößert. Die reduzierte Oberfläche der Labyrinthzone führt wahrscheinlich zu einem reduzierten Stofftransport und könnte eine mögliche Ursache für die Unterversorgung von Embryonen in TRPV6-defizienten Tieren sein. Trophoblasten aus der Labyrinthzone von TRPV6-defizienten Plazenten vernetzten sich in Zellkultur schlechter und ihre basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration war signifikant reduziert. Ihr Migrationsverhalten und ihre Vitalität waren unverändert. Konform zu der Erhöhung von Serinproteasen zeigte sich eine deutliche Reduktion des extrazellulären Matrixproteins (ECM) Fibronectin. Entsprechend zeigten Proteinlysate aus TRPV6-defizienten Plazenten verstärkten proteolytischen Abbau von Fibronectin. Diese Daten belegen die Hypothese, dass TRPV6-Proteine die Struktur der extrazellulären Matrix im plazentaren Labyrinth kontrollieren.

Die Eihülle von TRPV6-defizienten Tieren war ebenso wie die Embryonen kleiner. Ihre Dicke war jedoch unverändert. Ähnlich wie in den Trophoblasten und der Plazenta war eine

Protease, Cathepsin D, verstärkt exprimiert, die Proteaseinhibitoren A1AT4 und A1AT5 waren reduziert und Fibronectin degradiert. Dies legt nahe, dass TRPV6 auch in diesem Gewebe eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der extrazellulären Matrix spielt. Daher wurde der transepitheliale Widerstand von Eihüllen in Gegenwart und Abwesenheit von TRPV6 bestimmt. Er zeigte sich (trotz reduziertem Fibronectin) bei TRPV6-defizienten Eihüllen ebenso erhöht, wie in Anwesenheit eines TRPV6-Antagonisten in Eihüllen von WT Mäusen. Offensichtlich beeinflussen TRPV6-Ionenkanäle auch die Permeabilität der Eihülle während der Embryogenese.

Der schwangere und der nicht schwangere Uterus zeigten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen zwischen WT- und TRPV6-defizienten Tieren. Im TRPV6-defizienten schwangeren Uterus war die Expression der Granzyme C, D, E, F und G erhöht, der Proteaseinhibitor A1AT5 reduziert, die Menge an Fibronectin jedoch unverändert. Im nicht-schwangeren Uterus waren keine Granzyme nachweisbar, jedoch war die Menge des Proteaseinhibitors A1AT4 in TRPV6-defizienten Uteri während des Diestrus und Metestrus signifikant reduziert, Fibronectin dagegen war nicht verändert. Der nicht-schwangere Uterus zeigte ein zyklusabhängiges Expressionsmuster von TRPV6 mit der größten Menge TRPV6 während des Estrus. Die zyklusabhängige Expression von TRPV6 und dessen Lokalisation im Uterusepithel legt die Vermutung nahe, dass TRPV6 an initialen Prozessen der Schwangerschaft wie z.B. der Adhäsion und Invasion der Blastozyste oder der Dezidualisierung beteiligt sein könnte.

## Summary

TRPV6 ion channels have a particularly high selectivity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions and are involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis of various tissues such as the uterus, placenta and epididymis. Accordingly, their absence affects the reproductive mechanisms of both sexes. Homozygous TRPV6-deficient male mice show impaired sperm maturation, caused by an enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the lumen of the epididymis. In contrast, TRPV6-deficient embryos from TRPV6-deficient mothers show delayed growth and insufficient bone mineralization. This phenotype in the mouse resembles the clinical picture of neonatal hyperparathyroidism in humans, which is based on an inadequate calcium supply of the embryo via the placenta due to *Trpv6* gene mutations. The newborns suffer from skeletal dysplasia and under-mineralized bones. To investigate the causes of embryonic malformations in TRPV6-deficient mice, TRPV6-expressing tissues, which are involved in embryogenesis, were analyzed in this thesis. In the non-pregnant uterus, the pregnant uterus, the placenta and trophoblasts, as well as the yolk sac, the TRPV6 protein was detected after immunoprecipitation by mass spectrometry and Western blot analysis. Tissues with a lack of TRPV6 showed an increase of various proteases. Granzyme F was significantly higher in the placenta, granzymes C, F, G and HTRA1 in the trophoblasts, granzymes C, E, F in the pregnant uterus and cathepsin D in the yolk sac. In contrast, the protease inhibitors alpha-1-antitrypsin 1-4 (A1AT4) and alpha-1-antitrypsin 1-5 (A1AT5) were significantly reduced in the absence of TRPV6.

In TRPV6-deficient placentas, the surface of the labyrinth zone was reduced and the chorionic plate was enlarged. The decreased surface area of the labyrinth zone probably leads to reduced nutrient and mineral transport and could be a possible cause for the undersupply of embryos in TRPV6-deficient animals. Trophoblasts from the labyrinth zone of TRPV6-deficient placentas networked less well in cell culture and their basal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was significantly reduced. Their migratory behavior and vitality were unaffected. In line with the increase in serine proteases, there was a clear reduction in the extracellular matrix protein (ECM) fibronectin. Accordingly, protein lysates from TRPV6-deficient placentas showed increased proteolytic degradation of fibronectin. This data supports the hypothesis that TRPV6 proteins control the structure of the extracellular matrix in the placental labyrinth zone.

The yolk sac of TRPV6-deficient animals was just as smaller as the embryos. However, their thickness was unchanged. As in the trophoblasts and the placenta, a protease, cathepsin D, was expressed to an increased extent. The protease inhibitors A1AT4 and A1AT5 were reduced, and fibronectin was degraded. This suggests that TRPV6 also plays an essential role in controlling the extracellular matrix in this tissue. Therefore, the transepithelial resistance of yolk sac in the presence and absence of TRPV6 was determined. It was found to be increased (despite reduced fibronectin) in TRPV6-deficient yolk sac as well as in the presence of a

TRPV6 antagonist in the yolk sac of WT mice. Apparently, TRPV6 ion channels also influence the permeability of the yolk sac during embryogenesis.

The pregnant and non-pregnant uterus showed no apparent morphological changes between WT- and TRPV6-deficient animals. In the TRPV6-deficient pregnant uterus, the amount of granzymes C, D, E, F and G was increased, the protease inhibitor A1AT5 was reduced, but the amount of fibronectin was unchanged. Granzymes were not detectable in the non-pregnant uterus. However, the amount of the protease inhibitor A1AT4 in TRPV6-deficient uteri was significantly reduced during the diestrus and metestrus, whereas fibronectin was not changed. The non-pregnant uterus showed a cycle-dependent expression pattern of TRPV6 with the largest amount of TRPV6 during estrus. The cycle-dependent expression of TRPV6 and its localization in the uterine epithelium suggest that TRPV6 may be involved in the initial processes of pregnancy such as adhesion and invasion of the blastocyst or decidualization.

## 2 Einleitung

### 2.1 Murine Plazenta

#### 2.1.1 Entwicklung, Aufbau und Funktion der murinen Plazenta

Die adäquate Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff und der Abtransport von Stoffwechselprodukten ist eine wesentliche Funktion der Plazenta. Darüberhinaus produziert die Plazenta hormonelle Botenstoffe, die die Entwicklung des Embryos steuern und die Mutter auf die Geburt und die anschließende Versorgung des Neugeborenen vorbereiten (Hemberger et al. 2020).

Durch mehrere Zellteilungen kommt es am Embryonaltag (E) 2,5 nach der Befruchtung und Bildung der Zygote zur Bildung der Morula und dadurch zur Etablierung der zellulären Polarität von inneren und äußeren Zellen (**Abb. 1, A**). Zwischen Tag E3,5 und E4,5 bildet die reife Blastozyste den nächsten Entwicklungsschritt. Sie besteht aus der inneren Zellmasse (ICM), bestehend aus Epiblast (EPI) und primitivem Endoderm und dem Trophektoderm (TE). Die Bildung der Plazenta in der Maus beginnt am Tag E4,5 durch Einnistung (Implantation) der murinen Blastozyste in den Uterus (**Abb. 1, A**). Diese Implantation führt unter dem Einfluss von Progesteron und Estrogen zur Umwandlung maternaler Stromazellen des uterinen Endometriums zur Dezidua (Dec, Dezidualisierung). Nach Einstülpung der Blastula (Gastrulation) kommt es zur Ausbildung der Keimblätter am Tag E6,5. Das Trophektoderm (TE) und das extraembryonale Ektoderm (ExE) sind in diesen Stadien Quellen multipotenter Trophoblastenstammzellen (mTSC) (**Abb 1, A, 2**). Diese differenzieren und bilden zunächst den extraplazentaren Kegel (EPC) und das Chorion (Ch) und im weiteren Verlauf Vorläuferzellen der Verbindungszone und der Labyrinthzone (**Abb. 1, A, 2**) (Leiser and Kaufmann 1994, Ralston and Rossant 2008, Natale et al. 2017). Nach der Gastrulation werden am Tag E7,5 neben Chorion (Ch) und extraplazentarem Kegel (EPC) auch Allantois (All), Amnion (Amn) und primitiver Streifen (PS) angelegt.

Durch Fusion von Chorion und Allantois am Tag E8,5 wird die Bildung extraembryonaler Blutgefäße ermöglicht. Mit umgebenden Trophoblasten bilden sie letztendlich die Labyrinthzone der reifen Plazenta, welche einen effizienten Stoffaustausch zwischen Mutter und Fötus ermöglicht. Um den Tag E10 ist die Plazenta schließlich so weit entwickelt, dass sie die Versorgung des Embryos hauptsächlich von der Eihülle übernimmt. Im Unterschied zum Menschen bleibt eine Versorgungsfunktion der Eihülle aber erhalten. Ist die Entwicklung der Plazenta zu diesem Zeitpunkt mangelhaft, kommt es in den meisten Fällen zu einem Schwangerschaftsabbruch (Woods et al. 2018).

Die weitere Entwicklung der Plazenta wird durch Trophoblastenvorläuferzellen vorangetrieben, die u.a. zu parietalen Trophoblastenriesenzellen (PTGC), Spongiotrophoblasten (SpT), Synzytiotrophoblasten (STB) und Glykogen-trophoblasten (GlyT)

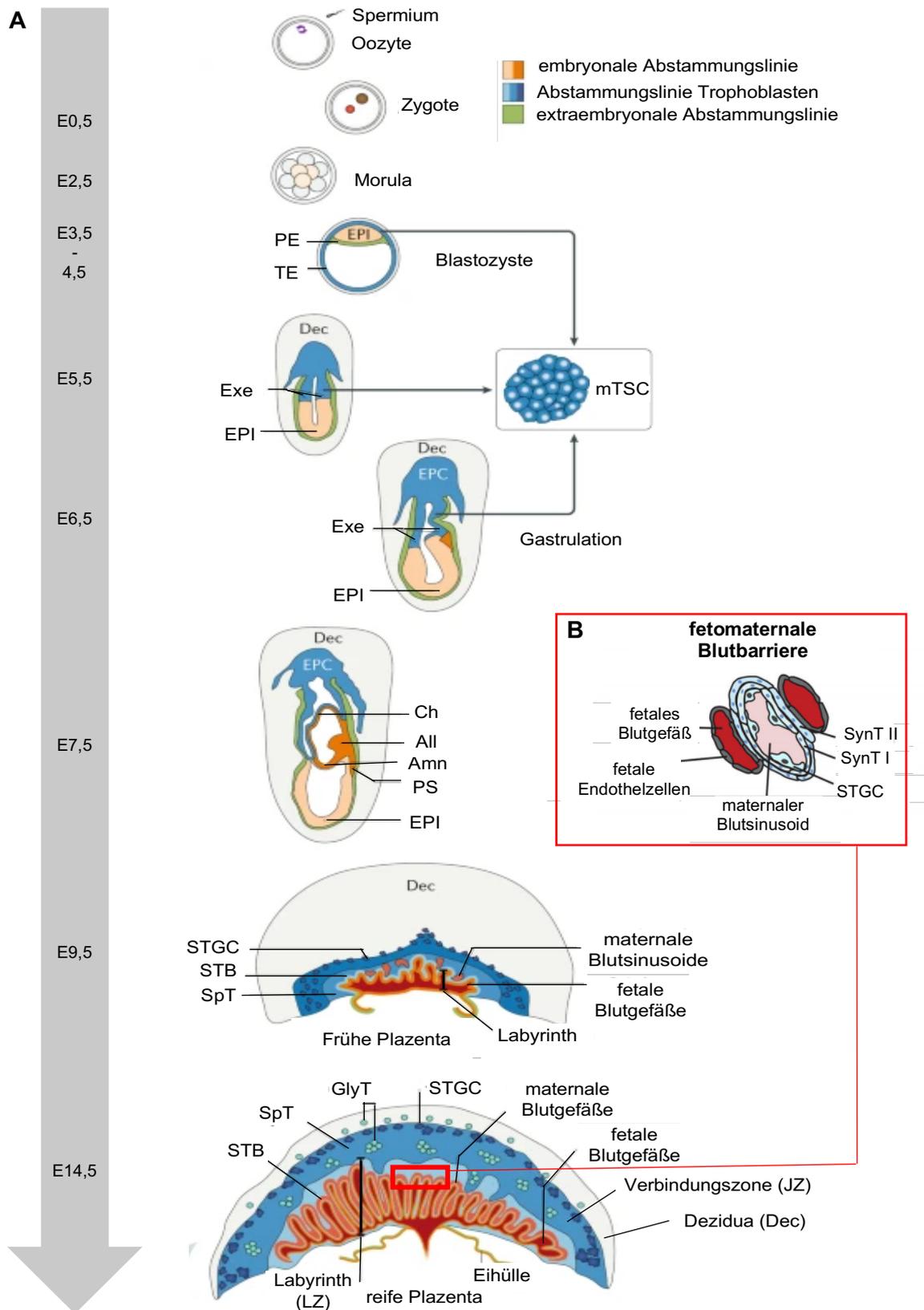


Abbildung 1: Entwicklung einer hämochorialen murinen Plazenta (A, modifiziert nach Hemberger et al. 2020) und fetomaternale Blutbarriere der Labyrinthzone (B, vergrößert, modifiziert nach Woods et al. 2018). Trophoektoderm (TE), primitives Endoderm (PE), Epiblast (EPI), Dezidua (Dec), extraembryonales Ektoderm (ExE), murine Trophoblastenstammzellen (mTSCs), extraplazentärer Kegel (EPC), Chorion (Ch), Allantois (All), Amnion (Amn), primitiver Streifen (PS), Trophoblastenriesenzellen (TGCs), Synzytiotrophoblasten (STB), Spongiotrophoblasten (SpT), Glykogenotrophoblasten (GlyT).

differenzieren (**Abb. 1, A, 2**). Diese verschiedenen Trophoblastensubtypen erfüllen unterschiedliche Aufgaben, wie beispielsweise die Produktion von Plazentalaktogen 1 und 2 (PL-1, PL-2) ab der Mitte der Schwangerschaft, die die Mutter auf die Geburt vorbereiten und die Milchproduktion in den Brustdrüsen stimulieren (Soares 2004).

Die Plazenta ist am Tag E13,5 strukturell vollständig entwickelt und erreicht am E14,5 die maximale Größe. Sie besteht nun aus maternalem und fetalem Gewebe und gliedert sich in drei Schichten: Dezidua (Dec), Verbindungszone (JZ) und Labyrinthzone (LZ) (**Abb. 1, A**). Die Dezidua (Dec) bildet die der Mutter zugewandte äußere Schicht der Plazenta. Sie besteht aus maternalen uterinen Zellen, spiralarterien-assoziierten Trophoblastenriesenzellen (SpATGC) und Glykogen-trophoblasten (GlyT, **Abb. 2**) (Simmons et al. 2007, Simmons et al. 2008). Die Dezidua ist von Spiralarterien durchzogen, durch welche das maternale Blut in die Plazenta gelangt (Hu and Cross 2009, Rai and Cross 2014). Die nächste Schicht, die Verbindungszone, ist zwischen Dezidua und Labyrinthzone lokalisiert und besteht im Wesentlichen aus Spongiotrophoblasten, Glykogen-trophoblasten, Kanaltrophoblastenriesenzellen und parietalen Trophoblastenriesenzellen (**Abb 1, A, 2**). Letztere bilden eine Grenze zwischen Dezidua und Verbindungszone (Simmons et al. 2007, Hu and Cross 2009, Natale et al. 2017). Die Labyrinthzone (Labyrinth) bildet die dritte Schicht und gehört zusammen mit der Verbindungszone zum fetalen Teil der Plazenta. Durch Invagination und Verzweigung entsteht in der Labyrinthzone eine extrem große Oberfläche, über welche der Stoffaustausch stattfindet. Die maternalen Blutgefäße werden von der Synzytiotrophoblastenschicht I und II (SynT I, SynT II), die fetalen Blutgefäße von fetalen Endothelzellen umgeben (**Abb. 1, B, 2**). Sinusoidale Trophoblastenriesenzellen (STGC) sorgen für die Erneuerung von SynT-I und -II (**Abb. 1, B, 2**). Die drei genannten Zellschichten bilden die einzige Barriere zwischen fetalem und maternalem Blut (**Abb. 1, B**). Ebenso wie in der sogenannten hämochorialen Plazenta des Menschen erfolgt der Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut also ohne dazwischen liegendes mütterliches Endothel (Wooding and Flint 1994, Adamson et al. 2002, Ueno et al. 2013). Diese Übereinstimmung macht die murine Plazenta zu einem interessanten Modell zur Untersuchung des fetomaternalen Stofftransports im Menschen.

## 2.1.2 Entwicklung und Funktion muriner Trophoblasten

Verschiedene Vorläuferzellen entwickeln sich aus Trophoblastenstammzellen (mTSC, **Abb. 2**) (Leiser and Kaufmann 1994, Ralston and Rossant 2008, Natale et al. 2017). Die erste Linie bilden die Vorläuferzellen der Verbindungszone (JZ). Aus ihnen gehen die spiralarterienassoziierten Trophoblastenriesenzellen (SpATGC), Glykogen-trophoblasten (GlyT), parietalen Trophoblastriesenzellen (PTGC), Spongiotrophoblasten (SpT) und Kanaltrophoblastriesenzellen (CTGC) hervor (**Abb. 2**) (Guillemot et al. 1994, Simmons et al. 2007, Mould et al. 2012, Natale et al. 2017). Aus Vorläuferzellen der Labyrinthzone entwickeln

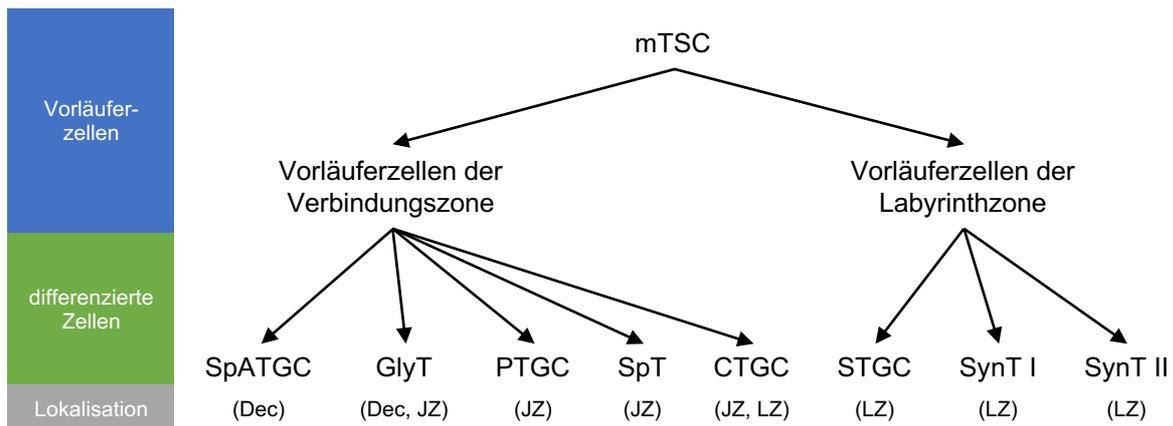


Abbildung 2: Differenzierung von Trophoblastenstammzellen (mTSC, modifiziert nach Natale et al. 2017).

sich sinusoidale Trophoblastenriesenzellen (STGC), Synzytiotrophoblasten I (SynT I) und Synzytiotrophoblasten II (SynT II) (**Abb. 2**) (Natale et al. 2017).

SpATGC sind an den maternalen Spiralarterien lokalisiert, wo sie deren Umbau und den Blutfluss in die Plazenta regulieren (Adamson et al. 2002, Simmons et al. 2007). GlyT dienen vermutlich als Energiespeicher, da sie viele Glykogengranula enthalten (John and Hemberger 2012). Die Verbindungszone der Plazenta besteht zu großen Teilen aus PTGC, SpT und CTGC. PTGC grenzen die Verbindungszone in einer klar definierten Linie von der Dezidua ab. Sie sind an der Bildung der vaskulären Verbindung zwischen Mutter und Embryo beteiligt und sorgen durch die Sekretion von Thrombomodulin für eine verzögerte Blutgerinnung in Plazenta und Eihülle (Weiler-Guettler et al. 1996, Isermann et al. 2003). SpT bilden möglicherweise PL-1 (Iwatsuki et al. 2000, Cross et al. 2002, John and Hemberger 2012). CTGC bilden einen Kanal, durch den das maternale Blut in die Labyrinthzone gelangt (Hu and Cross 2010). Die Labyrinthzone der reifen Plazenta besteht aus Synzytiotrophoblasten der Schicht eins und zwei (SynT I und II). Zusammen mit den sinusoidalen Trophoblast Riesen-zellen (STGC) bilden sie die Barriere zwischen maternalem und fetalem Blut und sind für den Stoffaustausch zwischen Embryo und Mutter zuständig (John and Hemberger 2012).

Alle Trophoblastenriesenzellen SpATGC, PTGC, CTGC und STGC zeigen endokrine und parakrine Funktionen. Die endokrinen Funktionen werden hauptsächlich über PL-1, PL-2 und Progesterone vermittelt (Wiemers et al. 2003, Wiemers et al. 2003, Hu and Cross 2010). Durch

sie werden NK-Zellaktivität, Leberstoffwechsel, Insulinsynthese, ovarielle Progesteronproduktion und das Verhalten der Mutter der Schwangerschaft angepasst (Thordarson et al. 1987, Kishi et al. 1988, Thordarson et al. 1989, Lopez-Jaramillo et al. 1990, Sorenson et al. 1993, Linzer and Fisher 1999, Fleenor et al. 2000).

Parakrine Funktionen werden durch verschiedene Hormone (z.B. Progesteron), Oberflächenproteine (z.B. Integrine), Wachstumsfaktoren (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF) und Proteasen (z.B. Cathepsine) vermittelt (Yamamoto et al. 1994, Metcalf 2003, Ishida et al. 2004, Tayade et al. 2007). Es werden die Implantation der Blastozyste, die Dezidualisierung, die Vaskularisierung der Plazenta und die Aktivität des uterinen Immunsystems beeinflusst (McRae and Church 1990, Yamamoto et al. 1994, Sutherland 2003, Bany and Cross 2006, Herington and Bany 2007).

## 2.2 Entwicklung, Aufbau und Funktion der murinen Eihülle

Die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen erfolgt bis zum Tag E9,5 der Schwangerschaft ausschließlich über die Eihülle. Danach übernimmt die Plazenta den größten Teil des Stoffaustauschs (Furukawa et al. 2019, Hemberger et al. 2020). Darüberhinaus bildet sie den Ursprung verschiedener Zelltypen, wie z.B. Makrophagen. Diese werden vom Embryo selbst nicht gebildet, wandern jedoch in diesen ein und erfüllen lebenswichtige Funktionen wie die Regulation des Immunsystems (Palis et al. 1999, Ferkowicz et al. 2003).

Der murine Fötus wird im Gegensatz zum Menschen von der Eihülle umschlossen (**Abb. 3**).

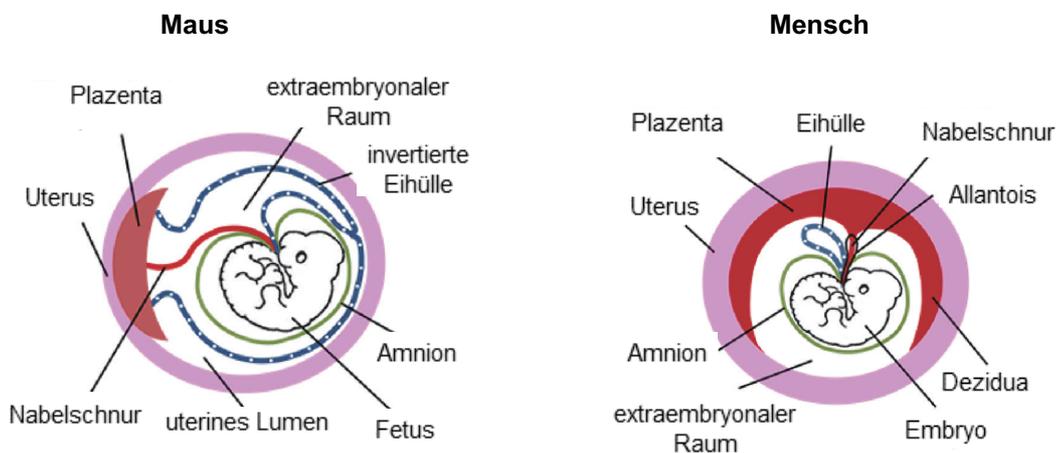


Abbildung 3: **Morphologische Unterschiede der Eihüllen von Maus und Mensch (modifiziert nach Furukawa et al. 2019).**

Diese besteht aus zwei Schichten: einer äußeren parietalen Schicht (parietale Eihülle), welche vom primitiven Endoderm abstammt und einer inneren viszeralen Schicht (viszerale Eihülle), welche sich aus Epiblasten (EPI) entwickelt (Pereira et al. 2011, Yamane 2018, Hemberger et al. 2020). Der zwischen Plazenta und Embryo liegende Abschnitt der Eihülle wird als intraplazentarer Teil, der Rest als extraplazentarer Teil bezeichnet. Zwischen Tag E8,5 und E9,5 kommt es zur Drehung des murinen Embryos in die Eihülle hinein (invertierte Eihülle),

wodurch diese danach mit dem Uterus in Kontakt steht (**Abb. 3**) (Schmidt 1992, Dobрева et al. 2010). Dadurch können Stoffe durch das uterine Lumen zur Eihülle transportiert werden, wo diese über die viszerale Schicht in die embryonalen Blutgefäße gelangen (DeSesso et al. 2012). Beim Menschen bleibt die beschriebene Drehung aus, weshalb die humane Eihülle dem Embryo nur anhaftet und im Laufe der Schwangerschaft keine Rolle mehr bei der Nährstoffversorgung des Embryos spielt (**Abb. 3**) (Furukawa et al. 2019).

Sowohl murine als auch humane Eihülle besitzen zellbildende Eigenschaften. Sie ist der Ort, an dem am Tag E7,5 der Schwangerschaft in der Maus die ersten Blutzellen gebildet werden (Hämatopoese) (Zon 1995). Diese erythroiden Zellen versorgen den Embryo mit Sauerstoff (Ji et al. 2003). Daneben werden auch multipotente hämatopoietische Vorläuferzellen gebildet, welche z.B. zu B-Zellen differenzieren können. Einige dieser Zellen persistieren bis ins Erwachsenenalter, dazu gehören unter anderem B1-B Zellen (Yoshimoto et al. 2011, Ito et al. 2013), Mikroglia (Ginhoux et al. 2010) und Makrophagen (Ginhoux et al. 2010).

## **2.3 Funktion des murinen Uterus während des Estruszyklus und der Schwangerschaft**

### **2.3.1 Die hormonelle Regulation des murinen Estruszyklus**

Der Uterus ist der Teil der weiblichen Geschlechtsorgane, in dem sich nach der Befruchtung die Blastozysten einnisten und sich zu lebensfähigen Embryonen entwickeln. Er ist schlauchförmig aufgebaut und besteht im Wesentlichen aus zwei Schichten. Einer äußeren Muskelschicht, dem Myometrium und einer inneren Schicht, dem Endometrium (**Abb. 4**) (Westwood 2008, De Clercq et al. 2017). Das Endometrium setzt sich aus der Epithelschicht, Drüsen und dem darunterliegenden Stützgewebe, dem Stroma, zusammen. Der Uterus ist über die Eileiter mit den Ovarien verbunden (**Abb. 4**). In ihnen werden die Eizellen gebildet und zyklisch freigesetzt.

Der murine Estruszyklus erstreckt sich über eine Zeitspanne von ca. 96 Stunden und lässt sich in vier verschiedene Phasen unterteilen: Proestrus, Estrus, Metestrus und Diestrus (**Abb. 5**) (McLean et al. 2012). Die morphologische und histologische Veränderung des Uterus während dieser Phasen wird durch Hormone gesteuert (McLean et al. 2012, De Clercq et al. 2017). Beginnend mit der Phase des Proestrus kommt es zu einem prä-ovulatorischen Anstieg des Estradiolspiegels (Walmer et al. 1992) sowie einem kurzen und relativ geringen Anstieg des Prolaktin-Levels (**Abb. 5**) (Parkening et al. 1982). Der Anstieg von Estradiol stimuliert die Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) (Sarkar et al. 1976, Kumar et al. 1997). Der daraus resultierende Anstieg der FSH-Plasmakonzentration löst den Eisprung (Ovulation) aus und leitet die Estrusphase ein

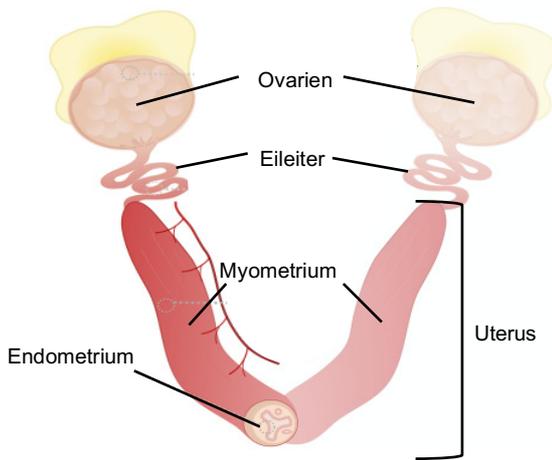


Abbildung 4: **Aufbau des murinen Uterus (modifiziert nach De Clerca und Vriens 2018).**

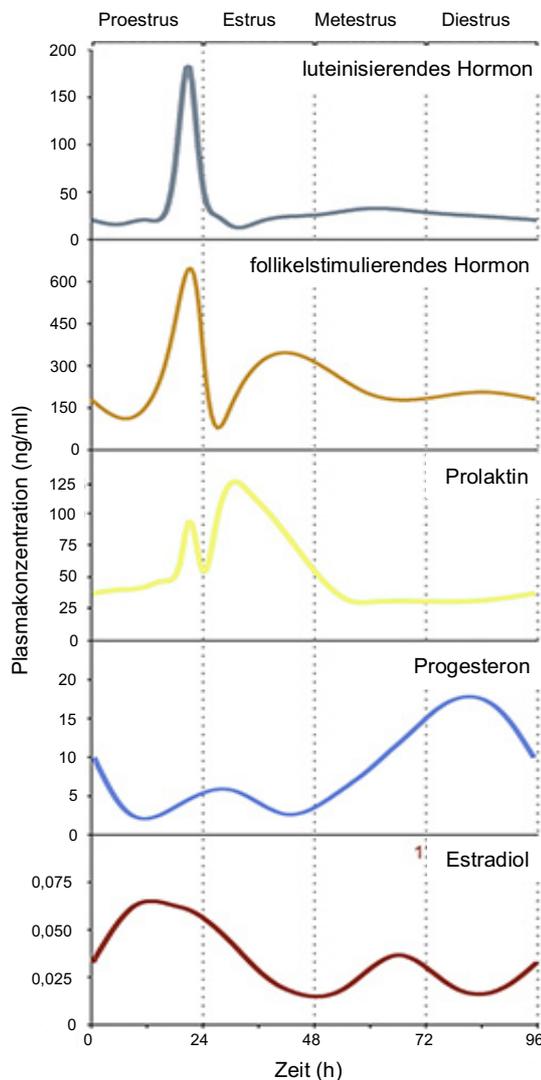


Abbildung 5: **Plasmahormonkonzentrationsverlauf während der vier Stadien Proestrus, Estrus, Metestrus und Diestrus des murinen Estruszyklus (modifiziert nach McLean et al. 2012).**

(Montgomery et al. 1988, Kumar et al. 1997). Während des Estrus kommt es zu einem Anstieg der Prolaktinkonzentration, wodurch die Bildung von Progesteron und Estrogen gehemmt wird (**Abb. 5**), um die Befruchtung der Eizelle in dieser Phase zu ermöglichen (Parkening et al. 1982, Walmer et al. 1992). In der dritten Phase, dem Metestrus, steigt der Progesteronspiegel kontinuierlich an und erreicht während der vierten Phase, dem Diestrus, sein Maximum (**Abb. 5**) (McLean et al. 2012). Der Anstieg von Progesteron in diesen beiden Phasen geht auf die Aktivität des *Corpus Luteum* zurück, welcher als ein Teil des Follikels gebildet wurde und nach der Ovulation zurückbleibt (Appelgren 1969, Walmer et al. 1992, Sander et al. 2009). Wurde die Eizelle während des Zyklus nicht befruchtet, stellt das *Corpus Luteum* die Progesteronproduktion während des Diestrus ein und der Zyklus beginnt von Neuem. Kommt es dagegen zu einer Befruchtung wird das *Corpus Luteum* weiter stimuliert, wodurch der Progesteronspiegel erhöht bleibt und die Schwangerschaft erhalten wird.

### 2.3.2 Der murine Uterus während Adhäsion und Implantation des Embryos

Die reife Blastozyste wird von einer Schutzhülle (*Zona pellucida*) umgeben. Aus ihr schlüpft der Embryo am Tag E4,5 (**Abb. 6**). Dadurch wird der Kontakt zwischen Trophoektoderm der

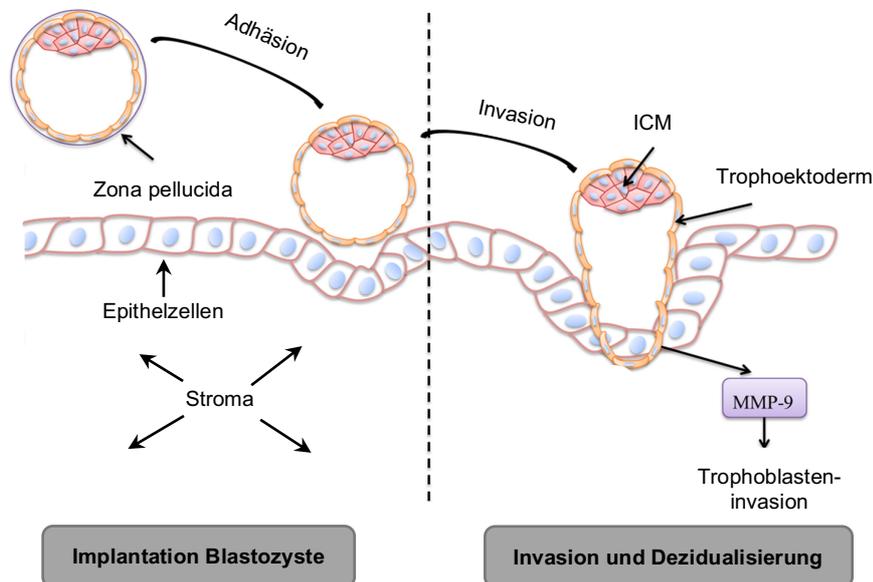


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der Adhäsion und Implantation der Blastozyste in das uterine Gewebe (modifiziert nach Qi et al. 2014).** Innere Zellmasse (ICM), Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9).

Blastozyste und den Zellen des uterinen Epithels ermöglicht und es kommt zur Adhäsion und Invasion der Blastozyste in das uterine Endometrium (**Abb. 6**). Dabei lockern Proteasen wie die Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9) aus Trophoblasten des Trophoektoderms das uterine Gewebe auf (**Abb. 6**). Durch die Invasion des Embryos wird die Dezidualisierung der uterinen Stromazellen ausgelöst. Die vollständige Ausbildung der Dezidua ist ein essentieller Prozess in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, diese Schicht schützt den semi-allogenen Embryo vor der Abstoßung durch das maternale Immunsystem. Die komplexe Kommunikation zwischen Blastozyste, Epithelzellen und Stromazellen wird durch mechanischer Reizung, Prostaglandine, Proteasen, Progesteron, Estrogen und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermittelt (Buxton and Murdoch 1982, Squires et al. 1993, Sakoff and Murdoch 1995, Salamonsen and Nie 2002, Salamonsen et al. 2002). So konnte gezeigt werden, dass durch Applikation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors die Dezidualisierung ausgelöst wird und Zellen in dezidualisierten Bereichen des Uterus eine höhere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufweisen (Hennes et al. 2019).

## 2.4 TRP-Ionenkanäle

Der Name der TRP-Kanäle leitet sich von *transient receptor potential* ab. Dieser Begriff beschreibt einen Effekt, der erstmalig in einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beobachtet wurde. Diese Mutante zeigt auf einen Lichtreiz nur ein transientes Signal im Elektretinogramm. Als Ursache dieses Effekts stellte sich eine Mutation im *transient receptor potential (Trp)*-Gen heraus. (Montell et al. 1985). Später konnte gezeigt werden, dass das *Trp*-Gen einen nicht selektiven Kationenkanal kodiert (Hardie and Minke 1992).

Seit der Entdeckung des TRP-Kationenkanals in *Drosophila melanogaster* wurden 28 TRP-Proteine in Säugern identifiziert (Clapham 2003, Flockerzi and Nilius 2014). Anhand der Sequenzhomologie werden diese TRP-Proteine in sechs verschiedene Familien unterteilt: TRP-C, -V, -A, -M, -P und -ML (**Abb. 7**). Die Proteine der TRPC-Familie ähneln dem TRP-

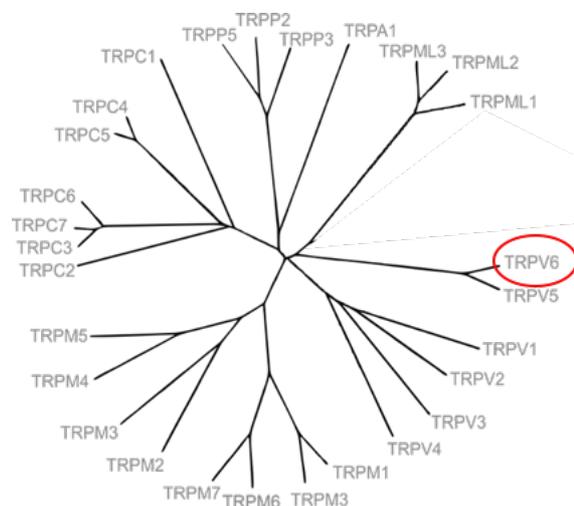


Abbildung 7: **Dendrogramm der TRP-Familien in Säugern (modifiziert nach Clapham 2003 und Flockerzi 2014).**

Protein aus *Drosophila melanogaster* am meisten, daher leitet sich ihr Name vom englischen „classical“ ab. TRPV1 war der erste identifizierte Kanal der TRPV-Familie und wurde nach dem Vanilloid Capsaicin benannt, durch das er aktiviert werden kann (Caterina et al. 1997). Dagegen ist das TRPA1-Protein durch eine hohe Anzahl N-terminaler Ankyrin-Domänen gekennzeichnet (Story et al. 2003). Das *Trpm1*-Gen wirkt als Tumorsuppressor in Melanomen und das codierte Protein wird daher auch als Melastatin bezeichnet. Entsprechend werden alle Mitglieder dieser Familie als TRPM-Proteine bezeichnet (Duncan et al. 2001). Namensgeber der TRPP-Familie ist das *KD2*-Gen, welches das Protein Polycystin kodiert (Mochizuki et al. 1996). Mutationen in diesem Gen führen zu einer polyzystischen Nierenkrankheit. Das TRPML1-Gen schließlich codiert Mucolipin-1 (Sun et al. 2000), das Namensgeber für alle Mitglieder der TRPML-Familie war. Mutationen in diesem Gen führen zur lysosomalen Speicherkrankheit Mucopolidose.

Alle TRP-Proteine sind durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau gekennzeichnet. Sie bestehen aus 6 Transmembrandomänen, intrazellulären Carboxy- (C) und Amino- (N) Termini und einer leitfähigen Kanalpore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne (**Abb. 8**). TRPA1 besitzt N-terminal eine hohe Anzahl an Ankyrin-Domänen. C-terminal weist dieses Protein eine Coiled-Coil-Struktur und eine TRP-Domäne auf (TRP-Box) (Abb. 9). Bei der TRP-Domäne handelt es sich um eine Struktur, welche aus 23-25 Aminosäuren besteht und an der Regulation der Leitfähigkeit des Kanals beteiligt ist (Gregorio-Teruel et al. 2014). Diese stark konservierte Aminosäuresequenz ist C-terminal auch bei Kanälen der TRPV-, TRPM- und TRPC-Familien zu finden (Abb. 9). Proteine der TRPV-Familie besitzen N-terminal ebenfalls mehrere Ankyrin-Domänen und eine Calmodulin-Bindestelle (CaM), welche mit dem  $Ca^{2+}$ -bindenden Protein Calmodulin interagieren kann und damit eine Art  $Ca^{2+}$ -Sensor darstellt (**Abb. 8**). C-terminal befindet sich neben der TRP-Domäne ebenfalls eine Calmodulin-Bindestelle und eine PDZ-Domäne (PDZ). Die PDZ-Domäne ermöglicht möglicherweise eine Wechselwirkung mit anderen PDZ-Domän-Proteinen, welche die Struktur und Funktion der TRP-Kanäle modulieren könnten (Harteneck 2003). TRPC-Proteine besitzen N-terminal mehrere Ankyrin-Domänen und eine Coiled-Coil-Domäne, C-terminal befindet sich neben

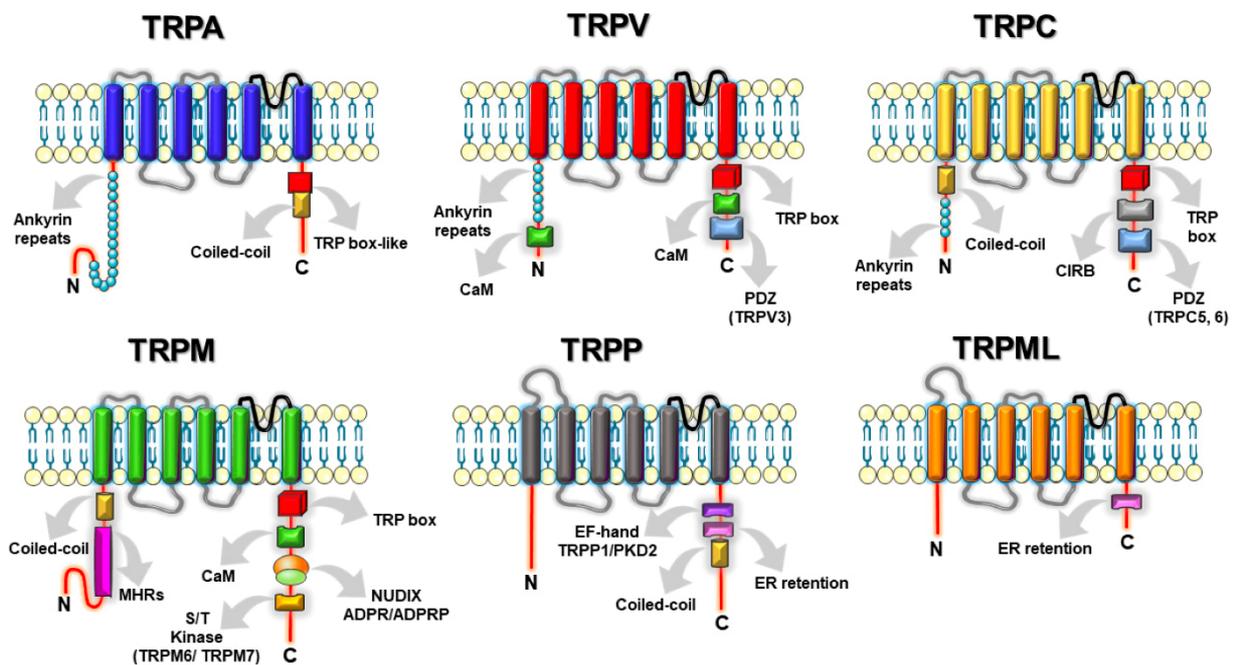


Abbildung 8: **Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des N- und C-Terminus der verschiedenen TRP-Familien (modifiziert nach (Méndez-Reséndiz et al. 2020)).** N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär und besitzen spezifische Domänen, welche den Aufbau, die Aktivierung und die Regulation der Kanäle beeinflussen. Die TRP-Domäne (TRP-Box) ist in den Familien TRPC, TRPV, TRPM und TRPA relativ stark konserviert. Andere Domänen und Motive, welche in verschiedenen TRP-Familien vorkommen, sind: Ankyrin-Domänen (Ankyrin repeats), Coiled-Coil Domänen (CC), Regionen mit hoher Homologie von Melastatinen (MHRs), Calmodulin-Bindestellen (CaM), Inositoltriphosphatrezeptor (InsP3R)-Bindestellen (CIRB), PDZ-bindendes spezifisches Motiv (PDZ), NUDIX-Box (Substrate: Adenosin-5'-diphosphoribose ADPR und ADPR-2'-phosphat (ADPRP), Serin/Threonin-Kinase-Domäne (S/T-Kinase),  $Ca^{2+}$ -bindendes Motiv (EFhand) und die Retentionsdomäne des endoplasmatischen Retikulums.

TRP- und PDZ-Domäne (TRPC5 und C6) eine Inositoltriphosphatrezeptor (InsP<sub>3</sub>R)-Bindestelle (CIRB, **Abb. 8**). CIRB spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von TRPC-Kanälen, eine Trennung des TRPC-InsP<sub>3</sub>R-Komplexes geht mit einer Aktivierung des Kanals einher (Yuan et al. 2003). Der N-Terminus von TRPM-Proteinen weist eine Coiled-Coil-Domäne und hoch-homologe-melastatine-Regionen auf (MHRs) auf, C-terminal befinden sich die TRP-Domäne, eine Calmodulin-Bindestelle, eine NUDIX-Domäne und eine Serin- und Threonin-Kinase-Domäne (TRPM6 und M7, **Abb. 9**). Adenosin-5'-phosphoribose (ADPR) und ADPR-2'-phosphat (ADPRP) sind Substrate der NUDIX-Domäne, wobei die Anwesenheit von ADPR die Kanaleigenschaften von TRPM-Proteinen beeinflussen kann. TRPP-Proteine besitzen charakteristischerweise C-terminal ein Ca<sup>2+</sup>-Bindemotiv (EFhand), eine Coiled-Coil-Domäne und eine Endoplasmatische-Retikulum-Retentions-Domäne (ER-Retention, **Abb. 8**). Die ER-Retention-Domäne verhindert den Transport des Proteins zur Plasmamembran (Cai et al. 1999, Hanaoka et al. 2000) und erst durch Chaperone-like-Faktoren wird die Translokation der TRPP-Proteine in die Plasmamembran möglich (Vassilev et al. 2001, Luo et al. 2003). TRPML-Proteine weisen typischerweise auch eine C-terminale ER-Retentionsdomäne auf (**Abb. 8**). Die beschriebene strukturelle Diversität der N- und C-Termini von TRP-Proteinen ist Ausdruck der komplexen Anpassung der Proteine an spezifische Funktionen.

Hochauflösende Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass sich TRP-Proteine zu tetrameren Komplexen zusammenlagern und dadurch funktionsfähige Kationenkanäle bilden (Strübing et al. 2001, Liao et al. 2013). Diese Kanalkomplexe verschiedener TRP-Proteine unterscheiden sich in ihrer Selektivität und Permeabilität der Pore für Kationen. Kanalkomplexe bestehend aus Proteinen der TRPC-Familie bilden beispielsweise nicht-selektive Kationenkanäle (Okada et al. 1998, Plant and Schaefer 2003, Nilius and Szallasi 2014). Dies bedeutet, dass sie gleichermaßen permeabel für monovalente Kationen (z.B. Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>) und divalente Kationen (z.B. Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) sind ( $P_{Ca}/P_{Na} = 1$ ). Im Gegensatz dazu bilden die TRPV1-4 Proteine selektive Kanalkomplexe, welche bis zu 10-mal mehr Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Vergleich zu Na<sup>+</sup>-Ionen leiten ( $P_{Ca}/P_{Na} = 1$  bis 10). TRPV5 und TRPV6 bilden die für Ca<sup>2+</sup> selektivsten Ionenkanäle.

Die Proteine einer TRP-Familie können homomere Kanalkomplexe wie beispielsweise (TRPC6)<sub>4</sub>, aber auch eine Vielzahl verschiedener heteromerer Kanalkomplexe wie z.B. TRPC1/TRPC3 (Lintschinger et al. 2000, Storch et al. 2012), TRPC1/TRPC4 (Hofmann et al. 2002) oder TRPC1/TRPC3/TRPC7 (Zagranichnaya et al. 2005) bilden. Homomere- und heteromere Kanalkomplexe unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. So zeigen heteromere TRPM6/TRPM7-Kanalkomplexe im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte einen signifikant größeren Strom als die homomeren Kanalkomplexe der beiden Proteine (Chubanov et al. 2004). Des Weiteren spielt die Heteromerisierung von TRPM6 und TRPM7 beim Transport

von TRPM6 in die Plasmamembran eine zentrale Rolle. Mutationen, welche keine Interaktion von TRPM6 und TRPM7 zeigen, verhindern die Translokation von TRPM6 in die Plasmamembran (Chubanov et al. 2004). Dies führt beim Menschen zu einem verminderten Transport von Magnesium und dadurch zu primärer Hypomagnesiämie und sekundärer Hypocalcämie.

Darüberhinaus bilden TRP-Proteine auch mit Nicht-TRP-Proteinen heteromere Komplexe. So bildet beispielsweise TRPP2 zusammen mit dem PKD1-Protein einen (TRPP2<sub>3</sub>/PKD1) Rezeptor-Kanal-Komplex (Wang et al. 2019). Dieser ist an der Morphogenese von Nierentubuli (Qamar et al. 2007) und der Ausbildung der Links-rechts-Asymmetrie während der Embryogenese beteiligt (Hofherr and Köttgen 2011). Neben den bereits genannten Komplexen können sich mehrere TRP-Proteine zusammen mit anderen Proteinen auch zu supramolekularen Verbindungen, sogenannten Signal-Komplexen, zusammenlagern (Montell 2005).

TRP-Kanäle werden in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert und erfüllen verschiedenste Funktionen. TRPM5 ist z.B. an der Wahrnehmung der Geschmäcker Süß und Bitter (Liman 2007), andere Kanäle sind an der Wahrnehmung von verschiedenen Temperaturen beteiligt (TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM8 und TRPA1, Montell 2005). Die Regulation des Zellvolumens wird über TRPV4 gesteuert (Moore and Liedtke 2017). Der vaskuläre Tonus und der Blutdruck wird unter anderem über TRPC4 (Freichel et al. 2001) und TRPC6 (Dietrich et al. 2005, Venkatachalam and Montell 2007) reguliert. Die Sekretion von Insulin wird durch TRPM2 (Togashi et al. 2006), TRPM3 (Becker et al. 2020) und TRPM4 (Cheng et al. 2007) gesteuert. TRPV5 ist an der Ca<sup>2+</sup>-Rückresorption in den Nieren beteiligt (Hoenderop et al. 2003) und spielt somit eine wichtige Rolle im Mineralstoffhaushalt.

## **2.5 TRPV6-Ionenkanäle**

TRPV6 gehört zur TRPV-Familie und wurde erstmalig aus dem Dünndarm von *Rattus norvegicus* (Peng et al. 1999) und humaner Plazenta (Wissenbach et al. 2001) kloniert.

### **2.5.1 Struktur und Expression des *Trpv6*-Gens**

Das *Trpv6*-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 7 und bei der Maus auf Chromosom 6. TRPV6 setzt sich bei der Maus aus 767 Aminosäuren (rechnerisches Molekulargewicht 87,38 kDa) und beim Menschen aus 765 Aminosäuren (rechnerisches Molekulargewicht 87,28 kDa) zusammen (Nilius and Flockerzi 2014). Die Identität der Aminosäuresequenz zwischen TRPV6 (Maus) und TRPV6 (Mensch) liegt bei 88,5 % (Recherche Uniprot-Datenbank). Dies ist eine relativ große Abweichung verglichen z.B. mit TRPC1 von Mensch und Maus, die bei annähernd 100 % liegt (Nett et al. 2021). Bei Menschen konnten exklusiv zwei *TRPV6*-Allele, *Trpv6a* und *Trpv6b*, identifiziert werden (Wissenbach et al. 2001). Die cDNA-Sequenzen von

*Trpv6a* und *Trpv6b* unterscheiden sich in 5 Basenpaaren, dies führt zur Änderung von 3 Aminosäuren im Protein. In den drei Positionen sind die Aminosäuren R197, V418 und T721 in der a-Variante und die Aminosäuren C197, M418 und M721 in der b-Variante exprimiert (Akey et al. 2006, Hughes et al. 2008, Kessler et al. 2009). Die Verteilung von *Trpv6a*- und *Trpv6b*-Allelen ist ethnien-abhängig. So nimmt die Häufigkeit des *Trpv6b*-Allels mit der geographischen Distanz zum afrikanischen Kontinent kontinuierlich zu.

## 2.5.2 Struktur und Funktion von TRPV6-Ionenkanälen

Der TRPV6-Kanal besitzt ebenfalls sechs Transmembrandomänen. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine *ankyrin-repeat*-Domäne mit sechs Ankyrin-Wiederholungen (Saotome et al. 2016) und am C-terminalen Ende die TRP-Domäne und zwei Bindestellen für Calmodulin (Niemeyer et al. 2001). Die Translation des TRPV6-Proteins beginnt nicht, wie bei der Proteinbiosynthese üblich, an dem ersten AUG-Triplett, sondern 120 Basen davor, an einem ACG-Triplett. Dadurch kommt es zur Bildung eines um 40 Aminosäuren verlängerten N-Terminus. Obwohl das ACG-Triplett für Threonin codiert, ist die initiale Aminosäure Methionin, welche normalerweise durch ein AUG-Triplett codiert und durch eine spezifische Initiator t-RNA transportiert wird (Fecher-Trost et al. 2013). Dieser verlängerte N-Terminus scheint ein charakteristisches Merkmal von Plazenta-Tieren zu sein (Nett et al. 2021). Der leitfähige TRPV6-Ionenkanal wird durch vier Untereinheiten, welche sich zu einem Kanalkomplex zusammenlagern, gebildet (**Abb. 9**). In nativem Gewebe konnte jedoch bis

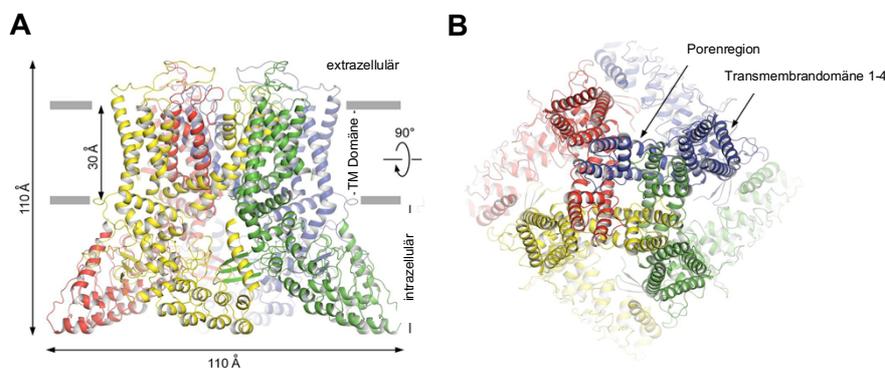


Abbildung 9: **Seitliche Ansicht (A) und extrazelluläre Aufsicht (B) der Kristallstruktur eines TRPV6-Homotetramers, jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt (modifiziert nach Saotome et al. 2016).**

heute kein endogener TRPV6-Strom gemessen werden. TRPV6-überexprimierende Zellen (HEK293) dagegen zeigen nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Applikation einen messbaren TRPV6-Strom, wenn sie zuvor in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium inkubiert wurden. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch TRPV6 ist dann mit fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren wie Fura-2 und *Whole-cell-patchclamp*modus elektrophysiologisch messbar (Wissenbach et al. 2001, Nilius et al. 2002, Voets et al. 2003, Voets et al. 2004). TRPV6 wird durch den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

inhibiert. Dies kann jedoch durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren wie beispielsweise Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA) unterbunden werden, wodurch die Signale des TRPV6-Stroms vergrößert werden (Nett et al. 2021). Neben homotetrameren Kanalkomplexen kann TRPV6 auch heterotetramere Kanalkomplexe bilden. In TRPV6- und TRPC1-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK-Zellen) kommt es zur Interaktion der beiden TRP-Proteine, wodurch der TRPV6-Strom durch verminderte Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran reduziert wird (Schindl et al. 2012). In *Xenopus*-Oozyten konnte dagegen gezeigt werden, dass TRPC1 zwar ebenfalls den TRPV6-Strom unterdrückt, jedoch nicht die Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran reduziert (Courjaret et al. 2013). TRPV6 und TRPV5 können bei gleichzeitiger Überexpression in *Xenopus*-Oozyten ebenfalls heterotetramere Kanalkomplexe bilden ( $\text{TRPV5}_x/\text{TRPV6}_x$ ). Die verschiedenen Komplexe unterscheiden sich in ihrer Selektivität für  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Inaktivierung (Hoenderop et al. 2003).

TRPV6 ist neben TRPV5 der TRP-Kanal mit der höchsten Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$  (Peng et al. 1999, Wissenbach et al. 2001). In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen oder  $\text{Na}^+$ -Ionen durch den Kanal fließen, jedoch kommt dies unter physiologischen Bedingungen praktisch nicht vor (Voets et al. 2001).

### 2.5.3 TRPV6-assozierte Erkrankungen des Menschen

In Karzinoma von Prostata- (Wissenbach et al. 2001), Brust- (Bolanz et al. 2008), und Lungengewebe (Fan et al. 2014) ist die Expression von TRPV6 signifikant erhöht. Die Expression von TRPV6 in Prostatakarzinomen korreliert mit deren Progression und eignet sich daher als Marker für die Diagnose und Kategorisierung verschiedener Tumorstadien (Fixemer et al. 2003).

Verschiedene Mutationen von *Trpv6* können beim Menschen zu chronischer Pankreatitis und Hyperparathyroidismus führen. Bei der chronischen Pankreatitis (CP) handelt es sich um ein progressives fibroinflammatorisches Syndrom der Pankreas, welches durch genetische Faktoren und Umweltfaktoren verursacht wird. Die bekannten auslösenden Faktoren der Krankheit, wie z.B. Medikamenteneinnahme (Diuretika, Zytostatika), Hyperparathyreoidismus, Hyperlipidämie, chronische Niereninsuffizienz oder Mutationen im Trypsinogen- und Serinproteaseinhibitor-Gen, erklären nur einen Teil der erkrankten Patienten. Deshalb wurde eine Genomanalyse von CP-Patienten und Kontrollgruppen durchgeführt, wobei 25 *Trpv6*-Varianten entdeckt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Mutationen zur Funktionsstörung des Kanals führen und dass es in der CP-Patientengruppe signifikant mehr Personen (1,35%) mit den nicht-funktionellen *Trpv6*-Varianten gab als in der Kontrollgruppe (0,16%). Eine Mutation im *Trpv6*-Gen kann also die Wahrscheinlichkeit an chronischer Pankreatitis zu erkranken erhöhen (Masamune et al. 2020, Zou et al. 2020).

Transienter neonataler Hyperparathyreoidismus (TNHP) ist eine Knochenkrankheit bei Neugeborenen. Sie geht auf einen TRPV6-bedingten Knochenmineralisierungsmangel während der Schwangerschaft zurück und ist durch reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die Plazenta, Knochendysplasien und hohe Parathormonkonzentrationen im Blut gekennzeichnet. Es sind mehrere *Trpv6*-Mutationen bekannt, welche TNHP auslösen können. Dazu gehören eine Frameshift-Mutation des den Aminoterminus-codierenden Genabschnitts und Punktmutationen des S2-S3 Loops, sowie der vierten und sechsten Ankyrin-Repeatdomäne. Die skeletalen Fehlbildungen des Embryos können sich nach der Geburt zurückbilden, wenn das Kind nicht mehr auf die plazentare Calciumversorgung angewiesen ist (Burren et al. 2018, Suzuki et al. 2018, Yamashita et al. 2019, Almidani et al. 2020, Mason et al. 2020, Suzuki et al. 2020).

#### **2.5.4 Physiologische Funktionen von TRPV6-Ionenkanalproteinen**

*Trpv6*-Transkripte und TRPV6-Proteine konnten u.a. in Nebenhoden (Weissgerber et al. 2011, Weissgerber et al. 2012), im Magen-Darm-Trakt (Peng et al. 1999), in Niere (Hoenderop et al. 1999), in Pankreas (Hirnet et al. 2003) und in Knochen (Lieben and Carmeliet 2012) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass TRPV6-Kanäle beim transepithelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport eine Rolle spielen, da der Ionenkanal  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv ist und häufig in Epithelzellen exprimiert wird (Hoenderop et al. 2003, Peng et al. 2003). Dabei geht man davon aus, dass es zu einer apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch TRPV6 in die Zelle kommt,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dann an Calciumbindeproteine wie Calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$  und Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$  gebunden, zur basolateralen Seite transportiert und schließlich durch Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen PMCA1 und PMCA4 oder  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ausgeschleust werden (Boros et al. 2009). Dieser Transportmechanismus wird von Experten hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme im Darm jedoch kontrovers diskutiert (Bronner 2003, Woudenberg-Vrenken et al. 2012), da TRPV6- und Calbindin-defiziente Mäuse ihre Eigenschaft, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unter einer reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Diät zu erhöhen, nicht verlieren (Benn et al. 2008, Woudenberg-Vrenken et al. 2012). Darüberhinaus spielt TRPV6 eine zentrale Rolle bei der Spermienreifung im Nebenhoden. In Abwesenheit von TRPV6 kommt es zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Lumen des Nebenhodens (*Ductus epididymidis*), wodurch die Spermien absterben bzw. nicht vollständig ausreifen können (Weissgerber et al. 2011, Weissgerber et al. 2012). Dies führt zu einer an Infertilität grenzenden Hypofertilität.

Um die physiologische Funktion von TRPV6 in verschiedenen Geweben untersuchen zu können, wurden verschiedene Mausmodelle mittels Genetargeting entwickelt. Bei einer Mauslinie wurden die Exons 13 - 15 aus dem *Trpv6*-Gen entfernt, welche die Porenregion und den C-Terminus von TRPV6 kodieren. Dadurch sind in diesen Tieren nur noch verkürzte *Trpv6*-Transkripte nachweisbar und es kann kein vollständiges TRPV6-Protein gebildet

werden (Weissgerber et al. 2012). In einem anderen Mausmodell wurde lediglich die Leitfähigkeit des TRPV6-Kanals durch eine Punktmutation im Bereich der Kanalpore vollständig blockiert. Dazu wurde die Aminosäure Aspartat an Position 581 gegen Alanin ausgetauscht (D581A) (Weissgerber et al. 2011). Um die Expression von *Trpv6* in Geweben zu untersuchen, wurde eine Mauslinie entwickelt, bei der eine *ribosomal entry site* (IRES) gefolgt von einer Cre-Rekombinase in das *Trpv6*-Gen integriert wurde (*Trpv6*-IRES-Cre, *Trpv6*-IC) (Fecher-Trost et al. 2019). Werden Tiere dieser Mauslinie mit eRosa26-floxed-stop-tGFP (eR26-tGFP) Expressionsreportertieren verpaart (Wen et al. 2011), so kommt es zur Bildung des grün fluoreszierenden Reporterproteins tGFP in *Trpv6* exprimierenden Zellen.

### **2.5.5 Expression und mögliche Funktionen von *Trpv6* in Plazenta, Eihülle und Uterus der Maus**

Das *Trpv6*-Gen wird im maternalen und fetalen Teil der murinen Plazenta am Tag E14,5 exprimiert (Fecher-Trost et al. 2019). Die Expression konnte ab Tag E12,5 nachgewiesen werden und steigt bis zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich an (Lee et al. 2009). In diesem Zeitraum hat der Embryo aufgrund der Knochenmineralisierung einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf. Embryonen aus *Trpv6*-defizienten Müttern zeigen, ähnlich wie beim transienten neonatalen Hyperparathyreoidismus (TNHP) beim Menschen, eine verminderte Knochenmineralisierung und verzögertes Wachstum (Fecher-Trost et al. 2019). Dies legt nahe, dass TRPV6 beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport von Mutter zum Fötus eine Rolle spielt. Da *Trpv6* (Moreau et al. 2002, Fecher-Trost et al. 2019) ebenso wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Moreau et al. 2003), Calbindin D9k (Belkacemi et al. 2004), Calbindin D28k (Belkacemi et al. 2003) und L- und T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle (Cemerikic et al. 1998, Del Toro et al. 2003) in Synzytiotrophoblasten, welche die Kontaktfläche zwischen maternalem und fetalem Blut bilden, exprimiert wird, geht man davon aus, dass TRPV6 ähnlich wie im Darm am transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die fetomaternalen Barriere beteiligt ist.

Auch in der murinen Eihülle konnten TRPV6 (Suzuki et al. 2008, Fecher-Trost et al. 2019) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und Calbindin-D9 nachgewiesen werden (Kovacs et al. 2002), weshalb man auch hier eine Beteiligung von TRPV6 am transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport vermutet.

Das *Trpv6*-Gen wird in Mäusen zyklusabhängig exprimiert (Lee and Jeung 2007, De Clercq et al. 2017). Übereinstimmend sind TRPV6-Proteine immunhistochemisch während des Estrus verstärkt und im Diestrus nicht nachweisbar (Lee and Jeung 2007). Aufgrund ihrer Lokalisation im uterinen Epithel (De Clercq et al. 2017) und dem Wissen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Kommunikation von Blastozyste und uterinen Epithel- und Stromazellen involviert sind, wird spekuliert, dass TRPV6 an Prozessen wie Adhäsion/Invasion der Blastozyste und Dezidualisierung der Stromazellen beteiligt sein könnte (De Clercq and Vriens 2018).

Im schwangeren Uterus wird das *Trpv6*-Gen ebenfalls exprimiert (Lee and Jeung 2007, Lee et al. 2009). Auch hier ist die physiologische Funktion des Kanals unbekannt. Wenn WT-Embryonen in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Weibchen oder *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Embryonen in WT-Mütter transferiert werden, weisen die Embryonen jeweils einen signifikanten Ca<sup>2+</sup>-Mangel auf (Fecher-Trost et al. 2019). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl in maternalen (Uterus, Dezidua) als auch fetalen (plazentare Labyrinthzone) Strukturen an der Ca<sup>2+</sup>-Versorgung des Embryos beteiligt sind.

## **2.6 Zielsetzung**

*Trpv6* wird während der Schwangerschaft in Plazenta, Eihülle und Uterus exprimiert. Eine TRPV6-Dysfunktion führt zu unterentwickelten Embryonen mit mangelhafter Knochencalzifizierung. TRPV6-Kanäle sind sowohl in maternalen als auch fetalen Geweben an der Calciumversorgung beteiligt.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war deshalb die Identifikation von Proteinen, die in diesen Geweben funktionell und/oder strukturell zu TRPV6 in Beziehung stehen. Dazu wurden mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden die Proteome von WT- und TRPV6-defizienten Geweben quantitativ verglichen und nachfolgend strukturelle bzw. funktionelle Wechselwirkungen zwischen TRPV6 und identifizierten Proteinen mit Hilfe geeigneter Methoden wie Morphometrie, Ca<sup>2+</sup>-Imaging und Messung des transepithelialen Widerstandes überprüft.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war schließlich die Klärung der Frage, inwiefern TRPV6-Proteine einen Einfluss auf den Estruszyklus der Maus haben.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Chemikalien**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), VWR International (Darmstadt), Sigma Aldrich (Taufkirchen), AppliChem (Darmstadt), GE Healthcare (Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

##### **3.1.2 Puffer und Lösungen**

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit deionisiertem Wasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore) angesetzt.

###### **3.1.2.1 Lösungen für die primäre Zellkultur**

###### **Waschlösung für Trophoblasten-Isolation:**

10 % (v / v) 10x Medium 199 (Gibco®)  
20 mM HEPES  
10 mM NaHCO<sub>3</sub>  
100 U / ml Penicillin (Sigma-Aldrich)  
100 µg / ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)  
pH 7,4

###### **Dissoziationspuffer für Trophoblasten-Isolation:**

0,005 % (v / v) DNase I 5 mg / ml (Roche)  
0,01 % (m / v) Collagenase I (Gibco®)  
in Waschlösung

###### **Zellkulturmedium für Trophoblasten:**

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco®)  
10 % (v / v) fetales Kälberserum (Gibco®)  
100 U / ml Penicillin (Sigma-Aldrich)  
100 µg / ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)

###### **Percoll-Gradienten-Lösung für die Ultrazentrifugation der Trophoblasten:**

8,6 ml Percoll (GE-Healthcare)  
1 ml 10x Medium 199 (Gibco®)  
12 ml Waschlösung

###### **3.1.2.2 Lösungen für proteinbiochemische Experimente**

###### **2x Lämmli-Puffer zur Denaturierung der Proteine:**

120 mM TRIS-HCl  
20 % (v / v) Glycerin  
10 % (v / v) β-Mercaptoethanol  
8 % (w / v) SDS  
0,01 % (w / v) Bromphenolblau  
pH 6,8

**RIPA-Puffer zur Herstellung von Lysaten:**

150 mM NaCl  
50 mM TRIS-HCl  
5 mM EDTA  
1 % (w / v) Nonidet-P40  
0,1 % (w / v) SDS  
0,5 % (w / v) Na-Deoxycholat  
zuzüglich Proteaseinhibitoren  
pH 8,0

**Proteaseinhibitoren und deren Endkonzentration:**

0,9 mM Iodacetamid (Stocklösung: 300 mM in H<sub>2</sub>O)  
1 mM Benzamidin (Stocklösung: 1 M in H<sub>2</sub>O)  
1 mM Phenanthrolin (Stocklösung: 1 M in Ethanol)  
4 µM Leupeptin (Stocklösung: 4 mM in 50 % Ethanol)  
2 µM Pepstatin (Stocklösung: 1 mM in 50% Ethanol)  
1,45 µM Antipain (Stocklösung: 1,45 mM in 50% Ethanol)  
100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Stocklösung: 100 mM in Ethanol)  
0,3 µM Aprotinin (Stocklösung: 300 µM in H<sub>2</sub>O)

**MOPS-Puffer (Massenspektrometrie):**

1x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20-fach konzentriert), Thermo Scientific

**10x TBS:**

0,5 M TRIS-HCl  
1,5 M NaCl  
pH 7,5

**10x SDS Elektrophoresepuffer (Western-Blot):**

0,25 M TRIS-HCl  
1,92 M Glycin  
1 % (w / v) SDS  
pH 8,3

**Blotting-Puffer für Western-Blot:**

10% (v / v) 10x SDS Elektrophoresepuffer  
20% (v / v) Methanol

**Stripping-Puffer für Western-Blot:**

50 mM TRIS-HCl  
2 % (w / v) SDS  
0,7 % (v / v) β-Mercaptoethanol  
pH 6,8

**PBS:**

140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,4

**Primärantikörperlösung für Western-Blot:**

1 % (w / v) BSA  
0,05 % (w / v) NaN<sub>3</sub>  
Primärantikörper **Tabelle 1**  
in 1x TBS

**Primärantikörperlösung für Immunzytochemie:**

1 % (w / v) BSA

Primärantikörperlösung **Tabelle 1**

in 1x PBS

**Sekundärantikörperlösung für Western-Blot:**

5 % (m / v) Magermilchpulver

Sekundärantikörperlösung **Tabelle 2**

in 1x TBS

**Sekundärantikörperlösung für Immunzytochemie:**

Sekundärantikörperlösung **Tabelle 2**

0,1 % (v / v) Höchst oder DAPI (2 mg / ml)

in 1x PBS

**Blockierungslösung für Immunzytochemie:**

3 % (w / v) BSA

1 % (v / v) Ziegen Serum

0,1 % (v / v) TritonX-100

in 1 x PBS

**Blockierungspuffer für Western-Blot:**

5 % (w / v) Magermilchpulver

in 1x TBS

**Fixierungslösung für Immunzytochemie:**

4 % (v / v) Paraformaldehyd in 1 x PBS

**Permeabilisierungslösung für Immunhistochemie:**

0,5 % (v / v) Triton X-100 in 1 x PBS

**Ponceau-Rot-Lösung für Proteinfärbung:**

0,5 % (w / v) Ponceau S

1 % (v / v) Essigsäure

**3.1.2.3 Lösungen für massenspektrometrische Experimente****Fixierungslösung:**

50 % (v / v) Methanol

10 % (v / v) Essigsäure

**Blue Silver Färbelösung:**

0,125 % (w / v) Coomassie G250

20 % (v / v) Methanol

10 % (v / v) Phosphorsäure

10 % (w / v) Ammoniumsulfat

**Lösung A (wässrig):**

50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

**Lösung B (organisch):**

50 % (v / v) Lösung A

50 % (v / v) Acetonitril

**DTT-Lösung:**

1 M Dithiothreitol in Lösung A

**IAA-Lösung:**

5,3 M Iodacetamid in Lösung A

**Trypsin-Verdauung:**

20 µg "Sequencing Grade Modified Trypsin", Promega  
ad 1 ml Lösung A

**Extraktionspuffer:**

50 % (v / v) Acetonitril  
2,5 % (v / v) Ameisensäure

**Fließmittel A (wässrig):**

0,1 % (v / v) Ameisensäure

**Fließmittel B (organisch):**

0,1% (v / v) Ameisensäure  
90 % (v / v) Acetonitril

**Aufnahmepuffer für nano-HPLC-Proben:**

2 % (v / v) Acetonitril  
0,05 % (m / v) Trifluoressigsäure

**3.1.2.4 Lösung für elektrophysiologische Experimente****Krebs-Puffer:**

115 mM NaCl  
24 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,2 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O  
1,2 mM CaCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O  
25 mM NaHCO<sub>3</sub>  
pH 7,4

**3.1.2.5 Lösungen für Ca<sup>2+</sup>- Imaging Experimente****Fura-2-AM-Lösung:**

1 mM Fura-2-AM (Invitrogen)  
in DMSO

**Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Puffer:**

115 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM KCl  
10 mM HEPES  
pH 7,4

### 3.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper für Western-Blot (WB), Immunzytochemie (ICC), Immunpräzipitation (IP).

Name	Klonalität	Lage Epitop	Herkunft	Hersteller	Anwendung
429 (TRPV6)	Polyklonal	C-Terminus	Kaninchen	FR 2.4 UdS, (Arbeitsgruppe Flockerzi)	1:100 (WB) 10 µg (IP)
20C6 (TRPV6)	Monoklonal	C-Terminus	Maus	FR 2.4 UdS, (Arbeitsgruppe Flockerzi)	1:50 (WB)
GCM1	Polyklonal	N-Terminus	Kaninchen	Acris	1:100 (ICC)
Dysferlin C19	Polyklonal	Interne Region	Ziege	Santa Cruz	1:100 (ICC)
Cytokeratin 7 (H50)	Polyklonal	N-Terminus	Kaninchen	Santa Cruz	1:100 (ICC)
Fibronectin	Monoklonal	-	Maus	Invitrogen	1:750 (ICC) 1:100 (WB)

Tabelle 2: Sekundärantikörper für Western-Blot (WB), Immunzytochemie (ICC).

Name	Klonalität	Epitop	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-mouse HRP (horseradish peroxidase)	Polyklonal	IgG heavy and light chain	Schaf	GE Healthcare	1:20.000 (WB)
Anti-rabbit HRP	Polyklonal	IgG heavy and light chain	Affe	GE Healthcare	1:50.000 (WB)
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	Polyklonal	IgG heavy and light chain	Ziege	Invitrogen	1:1000 (ICC)
Alexa Fluor 488 anti-goat	Polyklonal	IgG heavy and light chain	Affe	Invitrogen	1:1000 (ICC)
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Polyklonal	IgG heavy and light chain	Ziege	Invitrogen	1:1000 (ICC)

### 3.1.4 Mauslinien

Tabelle 3: **Verwendete Mausmodelle und ihre genetischen Modifikationen.**

Mauslinie	Genotyp	Erstbeschreibung
<b><i>Trpv6</i><sup>-/-</sup></b> („Knockout“, TRPV6-KO)	Deletion der <i>Trpv6</i> -Exons 13-15, die für die S5, Porenregion, S6 und C-Terminus codieren.	(Weissgerber et al. 2012)
<b><i>Trpv6</i><sup>mt/mt</sup></b> („Porenmutante“, D581A)	Austausch der Aminosäure Aspartat 581 zu Alanin in der Kanalpore, Punktmutation im <i>Trpv6</i> -Exon 13.	(Weissgerber et al. 2011)
<b><i>Trpv6-IC/eR26-τGFP</i></b> („TRPV6-Expressionsreporter“)	Insertion einer IRES-Cre-Kassette 50 Basenpaare stromabwärts des TRPV6-Stopcodons in Exon 15. Durch die Verpaarung mit einer <i>eR26-τGFP</i> Reportermaus kommt es in der F1-Generation zur Expression des grünfluoreszierenden (Reporter-) Proteins (GFP) in solchen Zellen, welche das <i>Trpv6</i> -Gen exprimieren.	(Fecher-Trost et al. 2019) eR26-GFP (Wen et al. 2011)
<b>Wildtyp WT</b>	129SVJ / C57BL/6	(Dunn 1928, Molomut et al. 1954)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Charakterisierung von Mäusen

Die Mäuse wurden in einer pathogenfreien Umgebung bei einem 12-Stunden Hell-/Dunkel-Lichtrhythmus und einer Temperatur von 22 °C gehalten (SPF Tierhaltung, Leitung Frau Dr. P. Weißgerber). Es wurden maximal 5 Tiere pro Käfig gehalten und sie erhielten pelletiertes Futter sowie Wasser *ad libitum*. Die Einstreu bestand aus Weichholzgranulat sowie Zellstoff zum Nestbau. Da homozygote *Trpv6*<sup>-/-</sup> und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup> Männchen hypofertil sind (3.1.4), wurden zur Verpaarung immer homozygote *Trpv6*<sup>-/-</sup> oder *Trpv6*<sup>mt/mt</sup> Weibchen und heterozygote *Trpv6*<sup>/wt</sup> oder *Trpv6*<sup>mt/wt</sup> Männchen eingesetzt. Die Verpaarungen wurden von Herrn Johannes Stegner betreut und angesetzt. Um homozygote von heterozygoten Nachkommen zu unterscheiden, wurde nach Entnahme von Geweben eine Genotypisierung mit einem Teil der Eihülle oder des Embryoschwanzes durchgeführt. Die Genotypisierung wurde von Frau Francis Glaser oder Herrn Johannes Stegner durchgeführt. Bei allen Experimenten wurden Gewebe von Wildtyp und/oder homozygoten *Trpv6*<sup>-/-</sup> und/oder *Trpv6*<sup>mt/mt</sup> Tieren verwendet. Die zellmorphologische Analyse des Vaginalschmiers zur Bestimmung des Zyklusstatus der Mäuse wurde von Frau Tanja Maurer durchgeführt.

### **3.2.2 Isolierung von Plazenta, Eihülle und Uterus**

Die Tiere der oben beschriebenen Mauslinien (**3.1.4**) wurden mittels zervikaler Dislokation um den Tag E13,5 ± 0,5 der Schwangerschaft getötet und anschließend wurde der Bauchraum geöffnet. Danach wurde der gesamte schlauchförmige Uterus mit den Embryonen entnommen und im Längsschnitt geöffnet. Die Embryos wurden zusammen mit Plazenta und Eihülle mit einer Schere herausgelöst, der separierte Uterus wurde von Blutgefäßen und Fettgewebe befreit und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

Anschließend wurde die Verbindung von Plazenta und Eihülle sowie die Nabelschnur durchtrennt. Die dadurch separierte Plazenta wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei -20 °C verwahrt. Die Eihülle wurde über den Embryo abgezogen und bis zur weiteren Verarbeitung in Krebs-Puffer auf Eis gelagert oder bei -20°C verwahrt. Der freigelegte Embryo wurde dekapitiert.

### **3.2.3 Morphometrische Analyse der Chorionplatte**

Isolierte Plazenten (**3.2.2**) wurden von dem intraplazentalen Teil der Eihülle mithilfe einer Mikroschere befreit, sodass die Chorionplatte sichtbar war. Die Chorionplatte der nativen Plazenta wurde mit dem Stereomikroskop M205FA (Leica) lichtmikroskopisch fotografiert. Die Fläche der gesamten Plazenta und der Chorionplatte wurde mit dem Programm AxioVision (Zeiss) ermittelt und der relative Flächenanteil der Chorionplatte berechnet.

### **3.2.4 Herstellung und Färbung von Kryoschnitten**

Embryos mit Eihülle und Plazenta (**3.2.2**) wurden über Nacht bei 4 °C in Paraformaldehyd (PFA) 4 % fixiert. Danach wurde das Gewebe über Nacht bei 4 °C in 17 % Saccharoselösung eingelegt. 2-Methylbutan wurde auf -80 °C gekühlt und in einem Becherglas auf Trockeneis gelagert. Die Probe wurde mit CEM-Medium (Leica) für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Edelstahlcontainer mit CEM-Medium gefüllt und die Probe komplett darin eingebettet. Die Probe wurde für 3 min in 2-Methylbutan bei -80 °C eingefroren, der gefrorene Block wurde aus dem Edelstahl Container entnommen und im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert. Das Kryomikrotom (Leica, Jung CM 3000) wurde auf -25 °C gekühlt und es wurden 7 µm Gewebeschnitte hergestellt. Jeder Schnitt wurde mithilfe des Kawamoto-Klebefilms (Kawamoto 2003) während und nach dem Schneiden dauerhaft fixiert. Die Schnitte wurden bis zur Färbung und Analyse im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Die Kryoschnitte wurden aufgetaut und für 60 s in Ethanol 100 % getrocknet. Die Schnitte wurden mit 4 % PFA bei RT fixiert und 4 min bei RT mit Leitungswasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Schnitt für 7 min bei RT mit Mayers Hämatoxylin Lösung inkubiert, danach für 8 min mit Leitungswasser gewaschen und anschließend mit Eosin Lösung (0,2 %) für 2 min inkubiert. Der Schnitt wurde mit Leitungswasser für 10 s gewaschen, für 10 s mit

Ethanol 100 % behandelt, nochmals mit Leitungswasser für 10 s gewaschen, in Mounting Medium (SCMM-G1, Section-Lab) eingebettet und bei RT für 30 min getrocknet.

Die Erstellung der Durchlichtaufnahmen erfolgte an einem Stereomikroskop M205FA (Leica) mit einer 20-fachen Vergrößerung. Die Bilder wurden mit der Farbkamera (Zeiss, AxioCam MR<sub>c</sub>) aufgenommen. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder wurde mit den Programmen Axio Vision (Zeiss, Oberkochen), Zen (Zeiss, Oberkochen) und ImageJ (NIH, Bethesda, USA) durchgeführt.

Die morphometrische Analyse der Kryoschnitte bestehend aus den Embryonen, Plazenten und Eihüllen erfolgte nach mikroskopischer Bildaufnahme mithilfe des Programms Axio Vision (Zeiss). Für die morphometrische Analyse der Eihülle wurde der Umfang der gesamten Eihülle und die Dicke des intraplazentalen Teils der Eihülle mit dem Programm Axio Vision (Zeiss) gemessen. Bei der morphometrischen Analyse der plazentalen Labyrinthzone wurde die ungefärbte Fläche der Labyrinthzone vermessen, die Anzahl der ungefärbten geschlossenen Flächen bestimmt und anschließend die durchschnittliche Größe der geschlossenen Flächen berechnet. Die dafür verwendeten Plazentaschnitte stammen von Frau Femke Lux.

### **3.2.5 Trophoblastenprimärkultur**

#### **3.2.5.1 Isolierung von primären Trophoblasten aus der murinen Plazenta**

Am Tag E13,5 der Schwangerschaft wurden die Plazenten entnommen (**3.2.2**) und zur Genotypisierung auf Eis gelagert. Nach der Genotypisierung wurden Wildtyp und *Trpv6*-defiziente Plazenten getrennt voneinander gepoolt. Je Genotyp wurden mindestens 6 Plazenten in 25 ml Dissoziationspuffer (**3.1.2.1**) aufgenommen und im Wasserbad bei 37 °C für 60 min inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Gewebssuspension alle 10 min mithilfe von serologischen Pipetten (25 ml 5x, 10 ml 10x) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein Zellsieb (Fisher Scientific, Porengröße 100 µm, Nylon) filtriert, um unverdautes Gewebe abzutrennen. Die Zell-Suspension wurde zentrifugiert (Heraeus SEPATECH Megafuge 1.0R, 500 x g, 5 min, 4 °C), der Überstand entnommen, das Zellsediment in 10 ml Waschlösung (**3.1.2.1**) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 2 ml Waschlösung resuspendiert und mit 21,6 ml Percoll-Gradienten-Lösung (**3.1.2.1**) vereinigt. Es folgte eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation bei 30000 x g für 30 min bei 4 °C (Beckmann Coulter, Optima XPN-90). Die Trophoblastenschicht, welche sich im oberen Drittel des Röhrchens befand, wurde mit einer blauen Pipettenspitze mit vergrößerter Öffnung (Spitze mit Schere entfernt) entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, auf ein Volumen von 45 ml mit Waschlösung aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 2 ml Zellkulturmedium für Trophoblasten (**3.1.2.1**) aufgenommen. Danach wurde die Lebendzellzahl bestimmt, wobei ein Aliquot der Trophoblasten-Suspension (10 µl)

im Volumenverhältnis 1:1 mit Trypanblau (Sigma) versetzt wurde. Mithilfe der Neubauerzählkammer wurden die nicht gefärbten (lebenden) Zellen gezählt und die Zelldichte der Suspension berechnet. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für maximal 7 Tage in Zellkulturmedium inkubiert (Pennington et al. 2012).

### **3.2.5.2 Azur- und Eosin- Färbung**

Die isolierten Trophoblasten (**3.2.5.1**) wurden mithilfe eines HAEMA-Schnellfärbekits (Eberhard Lehmann GmbH) gefärbt. Dazu wurden Zellen, die auf Glasplättchen ( $\varnothing = 0,5$  cm) oder auf einer Membran gewachsen sind (Migration Assay: **3.2.5.4**), je fünfmal für eine Sekunde in Methanol (Fixierung), Eosin Färbelösung und Azur Färbelösung getaucht. Die gefärbten Zellen auf Glasplättchen wurden direkt mikroskopisch untersucht. Zellen auf Membranen des Migrations-Assays wurden nach der Färbung in DEPEX Medium (Serva Electrophoresis, Heidelberg) eingebettet.

### **3.2.5.3 Analyse des Wachstums primärer Trophoblasten in Zellkultur**

200.000 Trophoblasten (**3.2.5.1**) wurden in einer Zellkulturschale (Falcon,  $\varnothing = 3$ cm) mit Glasplättchen Orsa<sup>tec</sup>  $\varnothing = 1,2$  cm und 2 ml Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert. Nach ca. 16 h wurde einmalig das Medium ausgetauscht. Für die Wachstumsexperimente unter reduziertem Calcium wurde durch Zugabe von 7  $\mu$ l EDTA-Lösung (0,5 M) die Konzentration von freiem Ca<sup>2+</sup> auf 0,1 mM eingestellt (berechnet mit der Software MaxChelator). Pro Tag wurden zwei Glasplättchen mit Azur und Eosin gefärbt (**3.2.5.2**) und mikroskopisch analysiert.

Die mikroskopische Aufnahme erfolgte am Mikroskop Imager M2 (Zeiss, Oberkochen) mit einem 10 x und einem 20 x Objektiv (Zeiss, Oberkochen). Die Weisslicht-Bilder wurden mit der Farbkamera (Zeiss, AxioCam MRc) aufgenommen. Die Aufnahme, Bearbeitung und Analyse der Bilder erfolgte mit den Programmen Axio Vision (Zeiss, Oberkochen), Zen (Zeiss, Oberkochen) und ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

### **3.2.5.4 Transwell Migration Assay**

Zum Aufbau des chemotaktischen Transwell Migration Assays wurden die einzelnen Kavitäten einer 24-Well-Platte mit 1 ml Zellkulturmedium beladen. Jede Kavität wurde mit einem speziellen, zellpermeablen Einsatz (Falcon) bestückt. Die Porengröße der Membran der Einsätze betrug 8  $\mu$ m. Jeder Einsatz wurde mit 0,8 ml Zellkulturmedium ohne FKS und 200.000 Trophoblasten befüllt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 h. Danach wurden die Einsätze entnommen und die Zellen auf der Oberseite der Membran mithilfe eines spitzen Wattestäbchens entfernt und vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und es wurde mit Azur und Eosin gefärbt (**3.2.5.2**).

Anschließend wurde die Membran mit einer Mikro-Schere aus den Einsätzen herausgeschnitten und auf einen Objektträger in DEPEX (Serva Electrophoresis, Heidelberg) eingebettet. Die Objektträger wurden für ca. 1 h getrocknet, die Membranen mikroskopisch fotografiert oder in Dunkelheit bei 4 °C verwahrt.

Durchlichtaufnahmen wurden wie unter **3.2.5.3** beschrieben erstellt. Bei der anschließenden Bildanalyse wurde das Programm Axio Vision verwendet. Die gesamte gefärbte Fläche wurde bestimmt und als Maß für die Menge der migrierten Zellen verwendet. Die Daten wurden abschließend, wie in Abschnitt **3.2.9** beschrieben, verarbeitet und ausgewertet.

### **3.2.5.5 Zellaktivitätstest**

5000 Trophoblasten (**3.2.5.1**) wurden in 100 µl Zellkulturmedium in einer Kavität einer Mikrotiterplatte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 7 Tage kultiviert. In Abständen von 24 h wurden zu je 3 Kavitäten 20 µl 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Lösung (MTS, Promega) gegeben. Nach 4 h wurde die Umwandlung von MTS zu Formazan bei 490 nm quantifiziert (Tecan, Infinite M200).

### **3.2.5.6 Apoptose / Nekrose-Assay**

200.000 Trophoblasten (**3.2.5.1**) wurden, wie unter **3.2.5.3** beschrieben, kultiviert. Nach Austausch des Zellkulturmediums wurden nach insgesamt 72 h je Genotyp zwei Glasplättchen einmal mit PBS gewaschen, 1h bei RT in Dunkelheit mit Apopxin Green Solution, 7-ADD und Cytocalcein Violet 450 (Necrosis Detection Kit, Abcam) inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden am Mikroskop Imager M2 (Zeiss, Oberkochen) mit einem 10 x und einem 20 x Objektiv (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer Lichtquelle HXP 120C (Pulch und Lorenz, March) ausgestattet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit der Kamera (Zeiss, AxioCam MR<sub>m</sub>) aufgenommen. Nach Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge (Cytocalcein: 359 nm, Apopxin: 498 nm, 7-AAD: 550 nm) wurden blaue, grüne und rote Fluoreszenzsignale mit den jeweiligen Filtern (DAPI: 461 nm, eGFP: 516 nm, Cy 3: 570 nm) der Firma AHF Analysetechnik AG, Tübingen, aufgenommen. Die Aufnahme, Bearbeitung und Analyse der Bilder erfolgte mit den Programmen Axio Vision (Zeiss, Oberkochen), Zen (Zeiss, Oberkochen) und ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Die nachfolgende **Tabelle 4** gibt Auskunft über die Zuordnung der Fluoreszenzemissionen zum Zellstatus.

Tabelle 4: **Signalgebung Apoptose / Nekrose-Assay**

<b>Farbstoff</b>	<b>Fluoreszenz (Ex / Em)</b>	<b>apoptotische Zelle</b>	<b>nekrotische Zelle</b>	<b>lebende Zelle</b>
Apopxin	Grün (498 nm / 516 nm)	ja	nein	nein
7-AAD	Rot (550 nm / 570 nm)	ja (Endstadium)	ja	nein
Cytocalcein	Blau (359 nm / 461 nm)	nein	nein	ja

### 3.2.5.7 Immunzytochemie

200.000 Trophoblasten wurden wie in **3.2.5.3** und **3.2.5.6** kultiviert. Nach 72 h oder 120 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (**3.1.2.2**) gewaschen. Danach wurden die Trophoblasten mit 4 % Paraformaldehyd für 15 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden viermal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Permeabilisierungslösung (**3.1.2.2**) für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, Inkubation in 1 ml Blockierungslösung (**3.1.2.2**) für 60 min bei RT und erneutem viermaligem Waschen wurden die Trophoblasten in Erstantikörperlösung (**3.1.2.2, 3.1.3**) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit PBS gewaschen und in Zweitantikörperlösung (**3.1.2.2, 3.1.3**) für 60 min bei RT in Dunkelheit inkubiert, fünfmal gewaschen und für 30 min bei RT getrocknet. Nun wurden die Glasplättchen auf Objektträger in Immu-Mount (ThermoScientific™) oder Vector Shield (Vector Laboratories, Burlingame) eingebettet und für 30 min getrocknet. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4 °C verwahrt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden wie unter (**3.2.5.6**) beschrieben hergestellt und ausgewertet.

### 3.2.5.8 Ca<sup>2+</sup>-Imaging

Zur Messung der relativen Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> - Konzentration wurden 200.000 isolierte primäre Trophoblasten Zellen (**3.2.5.1**) pro Zellkulturschale (Falcon, Ø = 3 cm) mit einem Glasplättchen (Ø = 2,5 cm, Orsa<sup>tec</sup>) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 h in Zellkulturmedium inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen einmalig mit Medium gewaschen. Nach 48 h wurden die Zellen für 30 min in Medium mit 5 µM Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM) beladen (37 °C, dunkel, 5 % CO<sub>2</sub>). Dabei diffundiert das membrangängige Fura-2-AM in die Zelle und wird durch intrazelluläre Esterasen zur Fura-2 hydrolysiert, welches sich im Zytosol der Trophoblasten anreichert. Anschließend wurden die Glasplättchen dreimal mit Fura-Puffer (**3.1.2.5**) gewaschen, in den Objektträger des Mikroskops (Axiovert S100, Zeiss) eingesetzt und mit 300 µl Fura-Puffer beschichtet. Die beladenen Zellen wurden durch die Anregung des Fura-2-Farbstoffs mit 360 nm sichtbar gemacht und markiert. Die Messung der Emission bei 510 nm erfolgte nach alternierender Exzitation mit Licht der Wellenlängen 340

nm und 380 nm für 30 ms einmal pro s. Die Messung der basalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Trophoblasten erfolgte über 60 Sekunden bei Raumtemperatur unter Verwendung eines 20 x Objektivs (Zeiss), einer CCD-Kamera SensiCam (PCO, Kelheim) und der TillVision Software.

### **3.2.6 Proteinbiochemie**

#### **3.2.6.1 Herstellung von RIPA-Lysat**

Je eine Plazenta, ein Uterus, eine Eihülle oder 10<sup>6</sup> Trophoblasten wurden in 300 µl, 600 µl, 200 µl oder 350 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Gewebe wurden durch einen Ultra-Turrax (Kinetamica AG Polytron PT 1200) mechanisch aufgeschlossen und mithilfe einer Kanüle (27G) geschert. Gewebe und Zellen wurden für 45 min bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert, anschließend wurde das Lysat bei 86.000 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert und der Überstand entnommen (Beckmann Coulter Optima™ MAX-E Ultrazentrifuge). Das Proteinlysate wurde 1 : 1 mit 2x Lämmli-Puffer verdünnt, Ultraschall behandelt (5 x 1 s, 31%, Bandelin Sonoplus HD2200, Bandelin Electronic, Berlin), 20 min bei 60 °C inkubiert und bei -20 °C weggefroren.

#### **3.2.6.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)**

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der BCA-Methode bestimmt (Smith et al. 1985). Es wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. 5 µl RIPA-Lysat (**3.2.6.1**) wurden mit Wasser 1:200, 1:400 und 1:800 verdünnt. Eine Eichreihe mit (0, 20, 40, 60, 80, 100 µg / µl BSA) erlaubte die Berechnung der Proteinkonzentration. Verdünnungen und Eichlösungen wurden als Dublikate hergestellt. Von allen Verdünnungen wurden je 50 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit je 300 µl BCA-Lösung (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) vereinigt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl pro Probe in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 562 nm photometrisch bestimmt (Tecan Infinite M200).

#### **3.2.6.3 Immunpräzipitation**

Für jede Immunpräzipitation wurden 60 µl Suspension magnetischer Protein A gekoppelter Partikel (Invitrogen, Dynabeads™) mithilfe eines Magneten zweimal mit je 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die magnetischen Beads in 300 µl RIPA-Puffer mit 10 µg Antikörper (**3.1.3**) für 30 min bei RT in einem Drehschüttler inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die magnetischen Beads dreimal mit je 500 µl RIPA Puffer gewaschen, mit RIPA-Lysat mit 10 mg Protein beladen und über Nacht bei 4 °C inkubiert und dann viermal mit RIPA-Puffer gewaschen. Immunkomplexe wurden schließlich nach Zugabe von 50 µl 2x

Lämmli-Puffer bei 60 °C für 20 min denaturiert und mit Ultraschall (5 x 1 s, 31 %) behandelt (Bandelin Sonoplus HD2200, Bandelin Electronic, Berlin).

#### **3.2.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurden Bis-Tris-Gradientengele (NuPAGE) mit einer Acrylamidkonzentration von 4 % bis 12 % in Kombination mit einem MOPS-Puffer (Novex, NuPAGE) als Laufpuffer zur Trennung der Proteine verwendet. Die Gelelektrophorese wurde zuerst für 15 min bei einer Spannung von 80 V und anschließend bis zur gewünschten Trennung der Proteine bei 180 V durchgeführt.

#### **3.2.6.5 Western-Blot**

In Bis-Tris-Gelen getrennte Proteine wurden in einer Blotting-Kammer (Bio-Rad) unter Verwendung des Blotting-Puffers (3.1.2.2) durch 350 mA Strom für 1,5 h auf eine Nitrocellulosemembran (BioRad) transferiert. Proteine wurden für 10 min mit Ponceau-Rot gefärbt und überschüssiges Farbreagenz wurde mit H<sub>2</sub>O entfernt. Die Membran wurde anschließend in Blocking-Puffer (3.1.2.2) 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran für wenige s mit 1x TBS gewaschen und anschließend mit 10 ml Erstantikörperlösung (3.1.3) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Zweitantikörperinkubation (3.1.3) wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Der Western Blot wurde dreimal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit 1x TBS gewaschen und dann für eine Minute mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Waltham, USA) inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mithilfe des LAS 3000 Imager (Fujifilm, Nikkei, Japan) für 15 sec, 1 min, 5 min und 60 min detektiert. Um einen Western Blot erneut mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, wurde der Blot zunächst viermal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur mit 1x TBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden durch 30 min (50 °C) Inkubation im Stripping-Puffer (3.1.2.2) entfernt.

#### **3.2.6.6 Fibronectin-Hydrolyse-Assay**

Die proteolytische Aktivität von Plazentalysaten wurde durch Hydrolyse von Fibronectin quantifiziert. Dazu wurden RIPA-Lysate von Plazenten ohne Proteaseinhibitoren hergestellt (3.2.6.1) und ihre Proteinkonzentration bestimmt (3.2.6.2). 2,5 µg Fibronectin und 100 µg RIPA-Lysat wurden bei 37 °C für 1h inkubiert und durch die Zugabe 2x Lämmli-puffer gestoppt. Die Proben wurden bei 60 °C für 20 min denaturiert und mittels Westernblot (3.2.6.5) analysiert (Winter et al., 2020).

## **3.2.7 Massenspektrometrie**

### **3.2.7.1 Probenvorbereitung**

Massenspektrometrische Analysen wurden von RIPA-Proteinlysaten nach vorheriger Proteinbestimmung (3.2.6.2) oder von Eluaten der Immunpräzipitationen (3.2.6.3) durchgeführt. Dazu wurden 100 oder 120 µg Protein oder 25 µl des Eluates Immunpräzipitationsansatzes gelelektrophoretisch getrennt (3.2.6.4). Die Proteine wurden im Gel mit Fixierungspuffer (3.1.2.3) für 1 h bei RT fixiert und dreimal für jeweils 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Proteine wurden mithilfe von Blue Silver Färbelösung (3.1.2.3) für maximal 20 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit destilliertem Wasser unter konstantem Schütteln nach Bedarf entfärbt. Das Gel wurde eingescannt, digitalisiert und dokumentiert. Die gefärbten Gele wurden in Abhängigkeit der Laufstrecke in 4 bis 16 gleich große Banden geschnitten. Die Gelstücke wurden für 10 min unter konstantem Schütteln mit jeweils 0,5 ml Lösung A (3.1.2.3) inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Banden wurden für 10 min mit 0,5 ml Lösung B (3.1.2.3) gewaschen. Das alternierende Waschen wurde einmal wiederholt. Danach wurden die Gelstücke für 30 min bei 56 °C mit je 0,5 ml DTT-Lösung (3.1.2.3) inkubiert, wodurch die Disulfidbrückenbindungen der Proteine reduziert wurden. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Banden für 30 min mit je 0,5 ml IAA-Lösung (3.1.2.3) versetzt und im Dunkeln bei RT inkubiert, wodurch die freien Thiolgruppen der Cysteinreste alkyliert wurden. Der Überstand wurde entfernt, die Proben zweimal abwechselnd mit je 0,5 ml Lösung A und 0,5 ml Lösung B und für 10 min mit je 0,5 ml Acetonitril gewaschen. Die Gelstücke wurden in einer Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac Plus) bei 40 °C getrocknet. Die tryptische Hydrolyse der Proteine erfolgte nach Zugabe von 25 µl Trypsin (Promega, V5111) (3.1.2.3) bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert und mit 25 µl Extraktionspuffer (3.1.2.3) für 15 min im Ultraschallbad bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt ein weiteres Mal wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt in der Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac Plus) bei 40 °C getrocknet. Die extrahierten Peptide wurden mit 20 µl 0,1 % Ameisensäure versetzt und im Ultraschallbad (15 min) gelöst. Die Peptidlösung wurden anschließend bei 13,500 x g für 5 min zentrifugiert, um Schwebstoffe zu sedimentieren. 19 µl des Probenvolumens wurde in ein Autosampler geeignetes Glas-Gefäß mit 0,2 ml Einsatz (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) überführt und mit einem Septum verschlossen. Die Proben wurden entweder direkt zur massenspektrometrischen Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.2.7.2 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der peptidhaltigen Proben erfolgte nach chromatographischer Trennung durch eine nano-UHPLC (ultra high pressure liquid chromatography) Einheit und Elektrosprayionisation (ESI) durch mehrfache Fragmentierung und Messung der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse ( $m/z$ ) der Peptidmutterionen und deren Fragmente. Das hierzu verwendete System bestand aus einer Ultimate 3000RSLC nano-UHPLC Einheit, dem Ultimate RS Autosampler und dem LTQ Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (alle Geräte von ThermoScientific, Dreieich, Germany). Zur chromatographischen Trennung der tryptischen Peptide wurde als stationäre Phase eine reversed phase (RP)-C18 Trennsäule (nano viper Acclaim PepMap capillary column, C18, 2  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 50 cm Dionex) mit Vorsäule (75  $\mu\text{m}$  x 2 cm, Acclaim PepMap100C18, 3  $\mu\text{m}$ , Dionex) verwendet. Als mobile Phase dienten die beiden Fließmittel A (0,1 % Ameisensäure, wässrig) und B (90 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure, organisch). 6  $\mu\text{l}$  der Probe wurden aus dem Glasgefäß entnommen und bei einer Flussrate von 200 nl / min (96 % Fließmittel A / 4 % Fließmittel B) auf das Säulensystem geleitet. Die Peptide wurden anschließend durch eine kontinuierliche Erhöhung des Anteils des organischen Fließmittels B ihrer Polarität nach getrennt und eluiert (Gradientenelution). Es wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Gradienten verwendet (**Tabelle 5**). Anschließend wurden die getrennten Peptide in der

Tabelle 5: Zur Trennung der tryptischen Peptide verwendete HPLC Gradienten.

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
<b>6 h Gradient (Fluss: 0,2 <math>\mu\text{l}</math> / min)</b>			<b>94 min Gradient (Fluss: 0,2 <math>\mu\text{l}</math> / min)</b>		
0	96	4	0	96	4
4	96	4	4	96	4
320	45	55	60	45	55
327	10	90	67	10	90
329	10	90	69	10	90
330	50	50	70	50	50
333	50	50	73	50	50
334	10	90	74	10	90
339	10	90	78	10	90
340	96	4	79	96	4
360	96	4	94	96	4

Elektrospray-Ionisationsquelle, ausgestattet mit einer Nano-Kapillare (PicoTipEmitter SilicaTip™, 30  $\mu\text{m}$ , New Objective, Woburn, USA), bei einer Spannung von 2,2 kV, RT und unter atmosphärischem Druck ionisiert und in die Gasphase überführt. Die so erzeugten positiv geladenen Mutterionen wurden unter Verwendung des positiven Messmodus in das Massenspektrometer hinein beschleunigt und mittels TOP10 Methode analysiert. Dazu wurde

zuerst ein MS-Spektrum der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse ( $m/z$ ) der Mutterionen im Bereich von 300 bis 1700 aufgenommen. Die 10 Mutterionen mit den stärksten Signalen (TOP10-Mutterionen) und einer Ladung von  $\geq 2$  wurden anschließend fragmentiert (collision induced dissociation, CID, normalisierte Kollisionsenergie 35 %, Stickstoff). Die resultierenden Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse der Peptid-Fragmente wurden im Orbitrap-Analysator bestimmt. Die Signale der 10 abundantesten Peptide (TOP10-Mutterionen) wurden daraufhin für 30 s nicht gemessen, aus den restlichen Signalen wurden erneut die aktuellen TOP10-Mutterionen ermittelt und der Analyseprozess begann von vorne.

### 3.2.7.3 Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten

Die Analyse der massenspektrometrisch erzeugten Rohdaten erfolgte mit der Software Proteome Discoverer 1.4 (ThermoScientific). Hierzu wurden die Rohdaten in das Programm Proteome Discoverer (ThermoScientific) geladen und mit dem Mascot-Algorithmus (Version 2.4.0) analysiert. Hierbei wurden die in **Tabelle 6** aufgeführten dynamischen und statischen Proteinmodifikationen angenommen. Die durch die Mascot-Analyse erzeugten Ergebnisfiles (dat.files) wurden in das Programm Scaffold 4 (Proteome Software Inc., USA) hochgeladen. Entstanden während der Analyse mit dem Proteomediscoverer mehrere einzelne dat.files, die zu einer Probe gehörten, wurden diese mittels multidimensionaler Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT)-Verfahren im Programm Scaffold wieder vereinigt und analysiert. Im Programm Scaffold betrug die Signifikanzgrenze für Proteine 95 % und für Peptide 90 %. Die Massentoleranz für Mutterionen und Fragmente war auf 7 ppm und 0,5 Da begrenzt. Mindestens 2 spezifische Peptide eines Proteins mussten detektiert werden, damit ein Protein als identifiziert galt. Die „false discovery rate“ (FDR) lag im Programm Proteome Discoverer bei maximal 5 % und 1 % für Proteine und Peptide. Die Abbildungen der Vulcano-Blots wurden mit der Scaffold Software erstellt, alle Venn Diagramme mit mehr als zwei zu vergleichenden Proben wurden mit dem Webtool „Bioinformatics and Evolutionary Genomics Venn diagram“ der Universität Gent generiert.

Tabelle 6: **Einstellungen und Parameter der Software Proteome Discoverer 1.4**

Referenzdatenbank	Swissprot 2018
Taxonomie	Mouse
Enzym	Trypsin
Maximal übersehene Schnittstellen	2
Dynamische Modifikationen	Deamidierung (N, Q), Oxidation (M), Acetylierung (K)
Statische Modifikationen	Carbamidomethylierung (C)

### **3.2.8 Elektrophysiologische Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) der murinen Eihülle (Ussing-Kammer)**

Ein quadratisches Stück (ca. 4 x 4 mm) der Eihülle (3.2.2) wurde in einem Halter (Physiological Instruments, Easy Mount, 0,031 cm<sup>2</sup>) fixiert und in die Ussing Kammer (Physiologic Instruments, Easy Mount) eingeführt. Beide Seiten der Kammer wurden mit jeweils 3 ml Krebspuffer (3.1.2.4) befüllt und das System wurde für 10 min bei 37 °C äquilibriert. Danach wurde die Potentialdifferenz auf 0 mV geklemmt. Anschließend wurde der TER mittels Pulsverfahren gemessen. Dazu wurde die Membran mit einem Spannungspuls von 2 mV für 5 ms elektrisch geladen und der Entladestrom gemessen. Zur Messung des Einflusses eines TRPV6-Antagonisten auf den transepithelialen Widerstand der Eihülle wurden nach der Äquilibrierungsphase je 30 µl einer Antagonistenlösung (5 mM in DMSO) auf beide Kammerseiten gegeben (Endkonzentration 50 µM). Nach 10 und 20 min wurde der transepitheliale Widerstand bestimmt. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit 30 µl DMSO mit einer zweiten Eihülle durchgeführt. Um die Calciumabhängigkeit zu untersuchen, wurde nach der Äquilibrierungsphase freies Ca<sup>2+</sup> durch Zugabe von 30 µl 0,5 M EDTA gebunden und der TER nach weiteren 20 min bestimmt.

### **3.2.9 Datenverarbeitung und Statistik**

Die Auswertung, Darstellung und statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der Student's-t-Test für zwei unabhängige Stichproben, beim Vergleich mehrerer Gruppen eine One-way ANOVA Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei den statistischen Tests galt ein p-Wert von > 0,05 als nicht signifikant (ns), Werte von  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant eingestuft. Die Abbildungen wurden mit den Programmen Microsoft PowerPoint (Version 2019) und CorelDRAW X7 (Corel, Ottawa, Kanada) angefertigt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorkommen und Funktion von TRPV6 in Plazenta und plazentaren Trophoblasten am Tag E13,5

#### 4.1.1 Untersuchungen der murinen Plazenta

##### 4.1.1.1 Nachweis von TRPV6 in der Plazenta

Zum Nachweis von TRPV6 in muriner Plazenta wurden mindestens drei Plazenten von WT-Tieren am Tag 13,5 der Schwangerschaft entnommen (3.2.2), das Gewebe wurde lysiert (3.2.6.1) und es wurde eine Immunpräzipitation mit einem TRPV6-spezifischen, polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (AK429) durchgeführt (3.2.6.3). Anschließend wurden die Immunpräzipitate mittels Western-Blot-Analyse und Massenspektrometrie untersucht. (Abb. 10). Im Western-Blot (Abb. 10, A) konnten starke Signale immunpräzipitierter Proteine (IP)

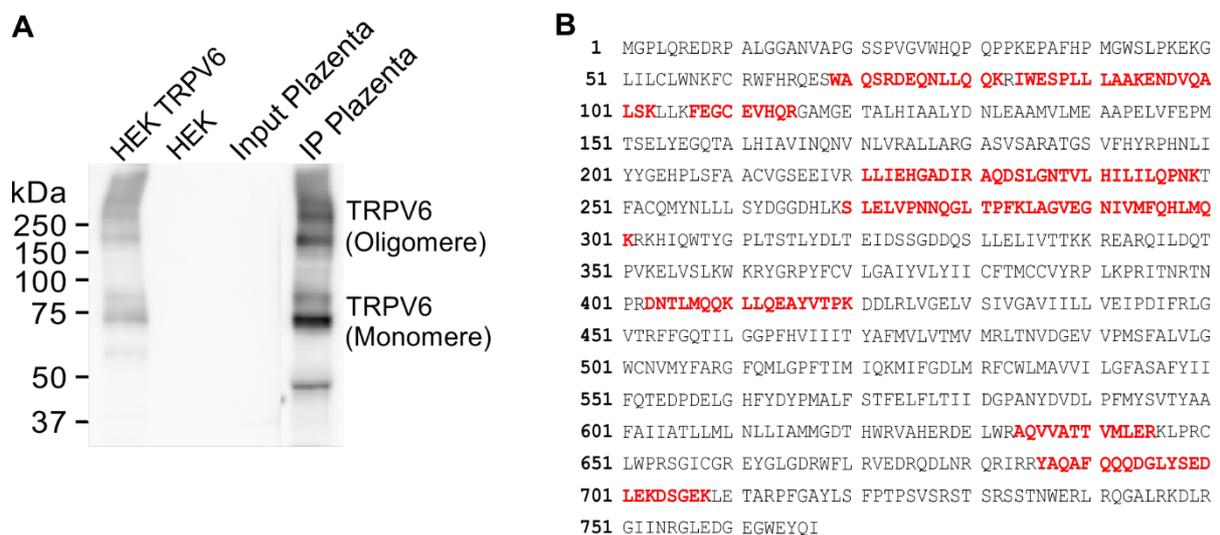


Abbildung 10: Nachweis des TRPV6-Proteins in der Plazenta (E13,5) von WT-Mäusen nach Immunpräzipitation mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.

**A.** Western-Blot Analyse von Proteinlysaten aus TRPV6-transfizierten HEK-Zellen (Positivkontrolle), nicht transfizierten HEK-Zellen (Negativkontrolle), RIPA-Lysat von WT-Plazenten (Inputkontrolle) und der TRPV6-Immunpräzipitation (IP) aus WT-Plazenten. **B.** Massenspektrometrischer Nachweis des TRPV6-Proteins nach Immunpräzipitation aus WT-Plazenten (E13,5). Die Lage der identifizierten, tryptischen TRPV6-Peptide ist in der Proteinsequenz von murinem TRPV6 rot hervorgehoben.

von  $\approx 75$  kDa,  $\approx 150$  kDa und größer 250 kDa detektiert werden, welche auch in mTRPV6 überexprimierenden HEK293 (HEK)-Zellen nachweisbar waren. Die Kontrolle (HEK-Zellen) und Plazentalysate vor Immunpräzipitation (Input) zeigten hingegen keine Signale. Offensichtlich wird im Vergleich zu TRPV6-überexprimierenden HEK293-Zellen TRPV6 in Zellen der Plazenta nur schwach exprimiert und erst durch Anreicherung mithilfe von Immunpräzipitation nachweisbar. Die unterschiedlichen Massen der nachgewiesenen Proteine könnten TRPV6-Monomeren (rechnerische molekulare Masse 87,3 kDa) und TRPV6-Oligomeren entsprechen. Die massenspektrometrische Analyse der Immunpräzipitate zeigte mehrere tryptische TRPV6-Peptide (Abb. 10, B). Diese Peptide deckten 20 % der TRPV6-Aminosäuresequenz ab. Im RIPA-Lysat der Plazenten ohne vorherige Immunpräzipitation konnten hingegen keine TRPV6-Peptide nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische

Analyse bestätigte damit zweifelsfrei die Expression von TRPV6 in der Plazenta der Maus am Tag E13,5.

#### 4.1.1.2 TRPV6-abhängige Veränderungen von Labyrinthzone und Chorionplatte

Während des letzten Trimesters der Schwangerschaft kommt es aufgrund der beginnenden Knochenmineralisierung des Embryos zu einem erhöhten Calciumbedarf (Comar and Wasserman 1956). Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Expression des *Trpv6*-Gens (Suzuki et al. 2008). TRPV6-defiziente Embryonen, die in TRPV6-defizienten Müttern heranwachsen, sind signifikant kleiner und ihre Knochen sind weniger mineralisiert als WT-Embryonen, die von WT-Müttern ausgetragen werden (Fecher-Trost et al. 2019), sodass sich die Frage stellt, inwiefern TRPV6 in der Plazenta eine Rolle beim Calciumtransport spielt. Um Hinweise zu finden, ob die Versorgung des Embryos direkt von der Aktivität des TRPV6-Kanals abhängt oder inwiefern morphologische Veränderungen der Plazenta dabei eine Rolle spielen, wurde die Fläche der Chorionplatte von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten analysiert. Die Chorionplatte entspricht der Fläche des Plazentalabyrinths, welche mit dem intraplazentalen Teil der Eihülle in Verbindung steht (Kaufmann 1998) und damit potentiell zur Versorgung des Embryos beiträgt.

Zur morphologischen Analyse wurden Embryonen am Tag E13,5 der Schwangerschaft entnommen (**Abb. 11, A, B**), die Plazenten isoliert (**3.2.2**) und anschließend lichtmikroskopisch fotografiert (**Abb. 11, C**). Mithilfe des Computerprogramms Axio Vision (Zeiss) wurde die Gesamtfläche der Plazenta und die Fläche der Chorionplatte bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt (**Abb. 11, D**). Der relative Flächenanteil der Chorionplatte im Verhältnis zur gesamten Fläche der Plazenta war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten ( $16,09 \pm 1,56 \%$ ) an Tag 13,5 der Schwangerschaft im Vergleich zu Wildtyp-Plazenten ( $32,93 \pm 4,77 \%$ ) signifikant vergrößert (**Abb. 11, D**), d.h. die Fläche der intraplazentalen Eihülle, über die Stoffe zwischen Mutter und Fötus ausgetauscht werden können, ist in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten vergrößert.

Die Labyrinthzone bildet die Kontaktfläche zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf, über die der größte Teil des Stoffaustausches zwischen Mutter und Fötus stattfindet. Die Labyrinthzone ist in der Plazenta zwischen der Verbindungszone und dem intraplazentalen Teil der Eihülle lokalisiert (**Abb. 11, A, B**). Zur Analyse der Labyrinthzone wurden Plazenten am Tag 13,5 der Schwangerschaft entnommen (**3.2.2**), es wurden Kryoschnitte nach Kawamoto hergestellt (**3.2.4**), mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (**3.2.4**) und lichtmikroskopisch abgebildet. In den gefärbten Schnitten ist zu erkennen, dass die ungefärbten zellfreien Flächen in der Labyrinthzone von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten verglichen mit WT-Plazenten größer erscheinen (**Abb 12, A**). Um dies quantitativ zu analysieren, wurden die zuvor beschriebenen Bilder der Kryoschnitte der Labyrinthzone (zur Verfügung gestellt von Frau Femke Lux) mit der Analysesoftware Axio Vision (Zeiss) untersucht. Dabei wurde die

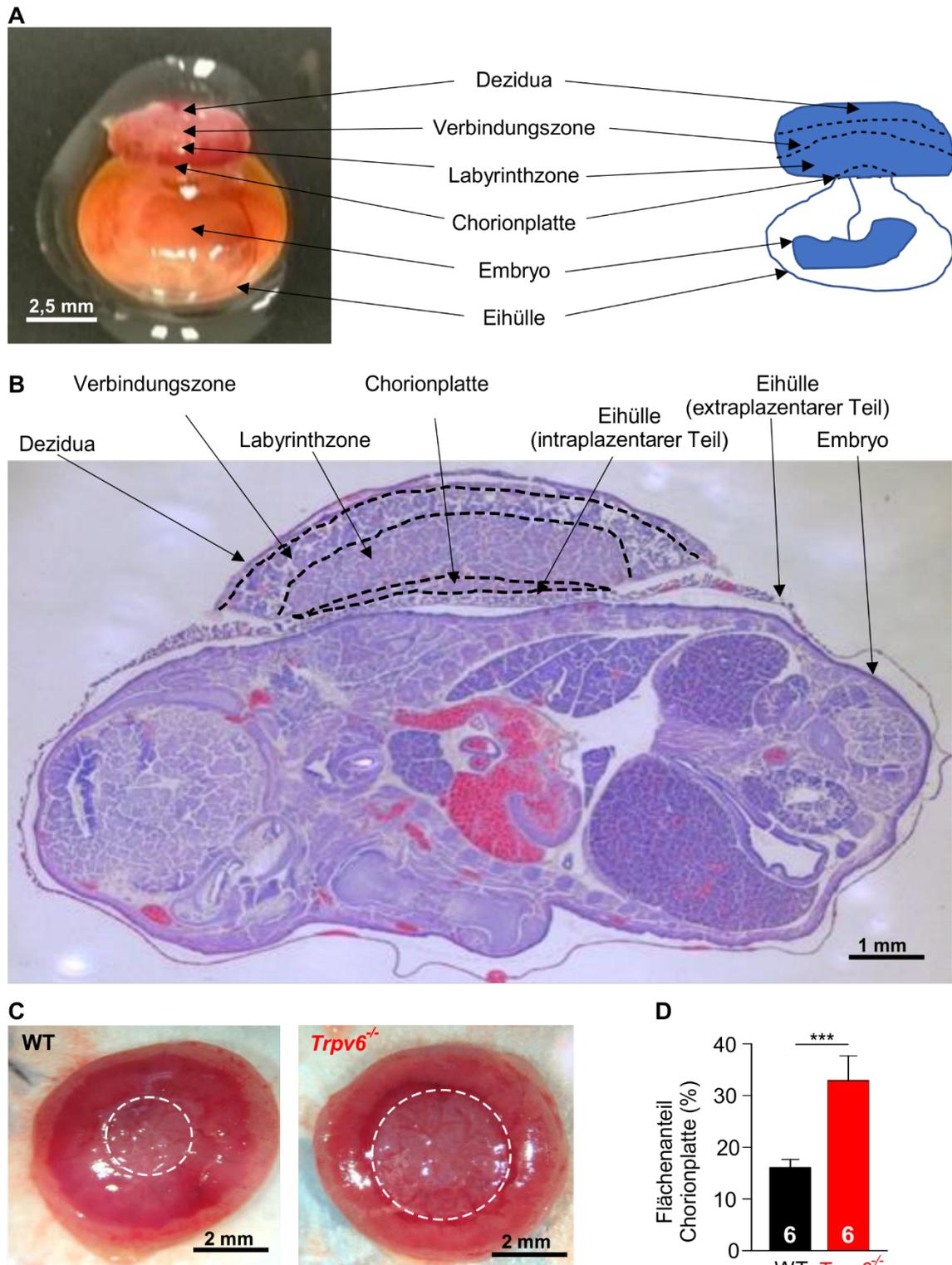


Abbildung 11: **Morphologische Analyse der murinen Chorionplatte von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Embryonen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.**

**A.** Lichtmikroskopische Aufnahme (links) und schematische Darstellung (rechts) eines Embryos mit anhaftender Plazenta und umgebender Eihülle. **B.** Hämatoxylin/Eosin-gefärbter Kryoschnitt eines WT-Embryos mit Eihülle und Plazenta (Sagittalebene). Die Lokalisation von Dezidua, Verbindungszone, Labyrinthzone, Chorionplatte, Eihülle (intra- und extraplazentär) und Embryo sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und durch schwarz-gestrichelte Linien getrennt. **C.** Repräsentative Durchlichtaufnahmen von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten. Die Flächen der Chorionplatten sind mit weiß-gestrichelten Linien umrandet. **D.** Mittelwerte (+SD) der relativen Flächen der Chorionplatten (im Verhältnis zur Fläche der gesamten Plazenten) in sechs Plazenten aus drei WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren. Zweistichproben-t-Test mit Signifikanzniveau \*\*\*  $p < 0,001$ .

nicht gefärbte, zellfreie Fläche benutzt. Diese unterscheidet sich nicht signifikant in WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten (**Abb. 12, B**). Dagegen war die Anzahl geschlossener, nicht-gefärbter Flächen in der Labyrinthzone von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten im Vergleich zu WT-Plazenten signifikant erhöht (**Abb. 12, C**). Die durchschnittliche Größe dieser Flächen war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten signifikant vergrößert (**Abb. 12, D**). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es zu morphologischen Veränderungen der Labyrinthzone in Plazenten von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren kommt und diese signifikant größeren zellfreien Hohlräume aufweisen. Somit besitzen TRPV6-defiziente Tiere eine reduzierte Kontaktfläche innerhalb der Labyrinthzone, über die der Stoffaustausch zwischen Mutter und Fötus erfolgen kann.

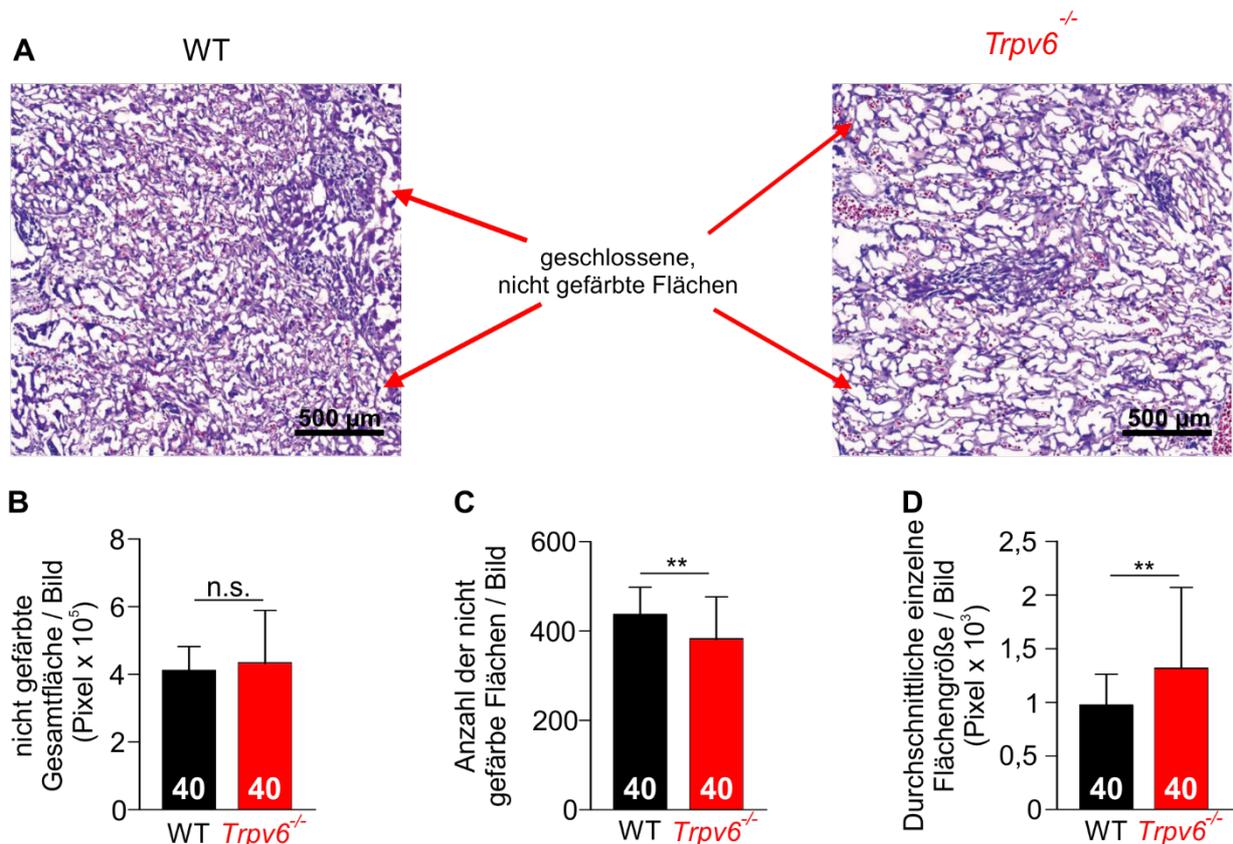


Abbildung 12: **Morphologische Analyse der murinen Labyrinthzone der Plazenta aus WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.**

**A.** Repräsentative Hämatoxylin und Eosin gefärbte Durchlichtbilder von Krioschnitten der Labyrinthzonen aus WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten (entnommen aus Winter et al. 2020). Geschlossene nicht gefärbte Flächen sind beispielhaft mit roten Pfeilen markiert. **B.** Nicht gefärbte Gesamtfläche pro Bild, **C.** Anzahl der einzelnen geschlossenen nicht gefärbten Flächen, **D.** Durchschnittlichen Flächengröße geschlossener nicht gefärbter Flächen pro Bild. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte +SD von je 40 Krioschnitten aus je 4 Embryonen von 2 Muttertieren. Signifikanzniveau \*\*  $p < 0,01$ ; n.s. nicht signifikant.

#### 4.1.1.3 Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Plazenten

Zur vergleichenden Proteomanalyse zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten wurden je drei Plazenten pro Genotyp lysiert (3.2.6.1). Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (3.2.6.2) und jeweils 120 µg Gesamtprotein der Plazenta-Lysate wurden elektrophoretisch getrennt (3.2.6.4). Das Trenngel wurde in vier Streifen geschnitten und für die massenspektrometrische Analyse aufgearbeitet (3.2.7.1) Die Peptide wurden mittels eines HPLC-Gradienten über 6 Stunden getrennt und massenspektrometrisch analysiert (1 Probe = 24 h Messzeit) (3.2.7.2). In der qualitativen Proteomanalyse (Abb. 13, A) konnten in WT-Plazenten insgesamt 859 Proteine identifiziert werden, davon waren 388 Proteine in allen drei WT-Proben nachweisbar. In *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten wurden insgesamt 1719 Proteine identifiziert, davon 503 Proteine in allen drei Proben dieses Genotyps. In beiden Genotypen zusammen wurden insgesamt 1778 Proteine identifiziert (Abb. 13, B). Davon waren 59 Proteine ausschließlich in WT-Plazenten und 919 Proteine ausschließlich in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten nachweisbar. 800 Proteine wurden in Proben beider Genotypen detektiert. Es wurden Proteine aus dem Zytosol, der Plasmamembran und allen Organellen wie Nukleus, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat detektiert und es waren Proteine nahezu aller Gene Ontology (GO)-Kategorien wie Metabolismus, Transport, Zelladhäsion, extrazelluläre Matrix, Ionentransport und Tight Junctions identifizierbar. Die Masse der identifizierten Proteine lag im Bereich von 7 kDa bis 834 kDa. Somit bilden die identifizierten Proteine einen repräsentativen Querschnitt aller zellulären Bestandteile des Gewebes ab. Die plazenta- bzw. schwangerschafts-spezifischen Proteine wie das Schwangerschaftszonenprotein (PZP), Schwangerschaft spezifisches Glykoprotein 22 (PSG22) und das Plazenta-exprimierte Transkript 1 Protein (PLET1) wurden ebenfalls identifiziert.

Eine semiquantitative Analyse der identifizierten Proteine (Abb. 13, C) zeigte, dass 19 in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten und 5 in WT-Plazenten vermehrt vorkommen. Die Proteine Coronin-1C (COR1C) und Granzym F (GRAF) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten am stärksten angereichert. COR1C ist an der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmigration beteiligt (Williamson et al. 2014, Williamson et al. 2015, Behrens et al. 2016). Bei Granzym F handelt es sich um eine Serinprotease. Granzyme C und G (GRAC, GRAG) konnten ebenfalls detektiert werden, unterschieden sich aber in ihrer relativen Menge nicht signifikant zwischen den beiden Genotypen. Eine weitere Funktion der Granzyme besteht darin, die extrazelluläre Matrix umzustrukturieren (Buzza et al. 2005), jedoch erschien das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin (FINC) zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten unverändert. Die Proteine Alpha-1-antitrypsin 1-5 (A1AT5) und zona pellucida-like domain-containing protein 1 (CUZD1) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten am stärksten reduziert. Bei A1AT5 handelt es sich um einen

Serinprotease-Inhibitor und CUZD1 ist ebenfalls in Prozesse wie Zelladhäsion und Proliferation involviert (Kasik 1998).

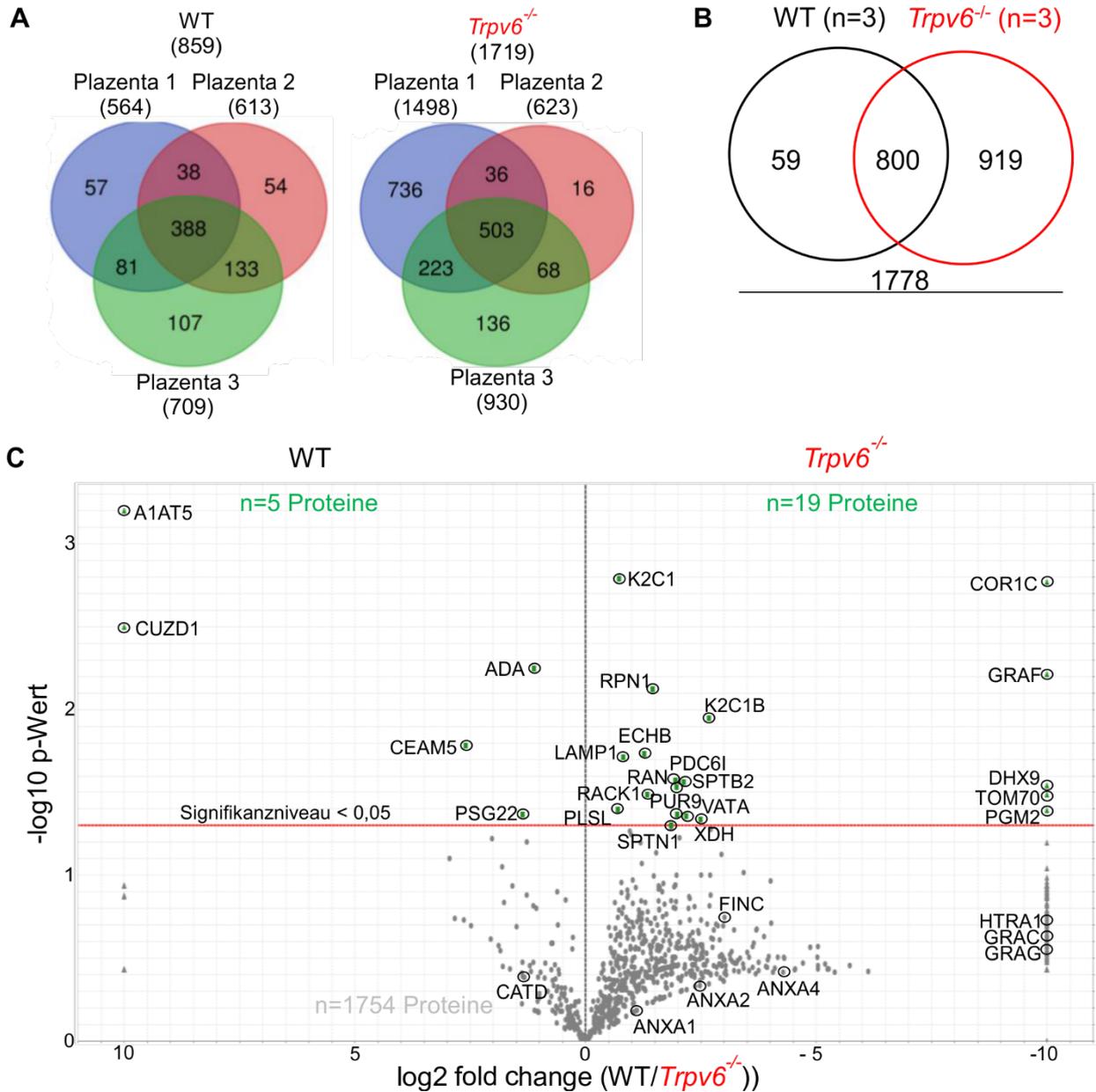


Abbildung 13: **Massenspektrometrische Proteomanalyse der murinen Plazenta am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in einzelnen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in je drei WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten. **C.** Vulcano-Blot aller in je drei Plazenten identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

#### 4.1.1.4 Die proteolytische Aktivität ist in TRPV6-defizienten Plazenten erhöht

Eine erhöhte Expression der Serinprotease Granzym F und eine reduzierte Menge des Proteaseinhibitors A1AT5 deuten darauf hin, dass die proteolytische Aktivität in TRPV6-defizienten Plazenten erhöht sein könnte. Daher wurde ein Fibronectin-Hydrolyse-Assay durchgeführt. RIPA-Lysate (3.2.6.1) von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten wurden mit Fibronectin als Substrat inkubiert und anschließend proteolytisch erzeugte Fragmente mittels Western-Blot analysiert (Abb. 14, A, B). Im Lysat von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten konnten signifikant mehr Fibronectin-Abbauprodukte (55 kDa) detektiert werden (Abb. 14, C). Dies bestätigt, dass die proteolytische Aktivität in TRPV6-defizienten Plazenten signifikant erhöht ist. Dies könnte die morphologischen Veränderungen in der Labyrinthzone (4.1.1.2) und den reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Transport in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten erklären (Fecher-Trost et al. 2019).

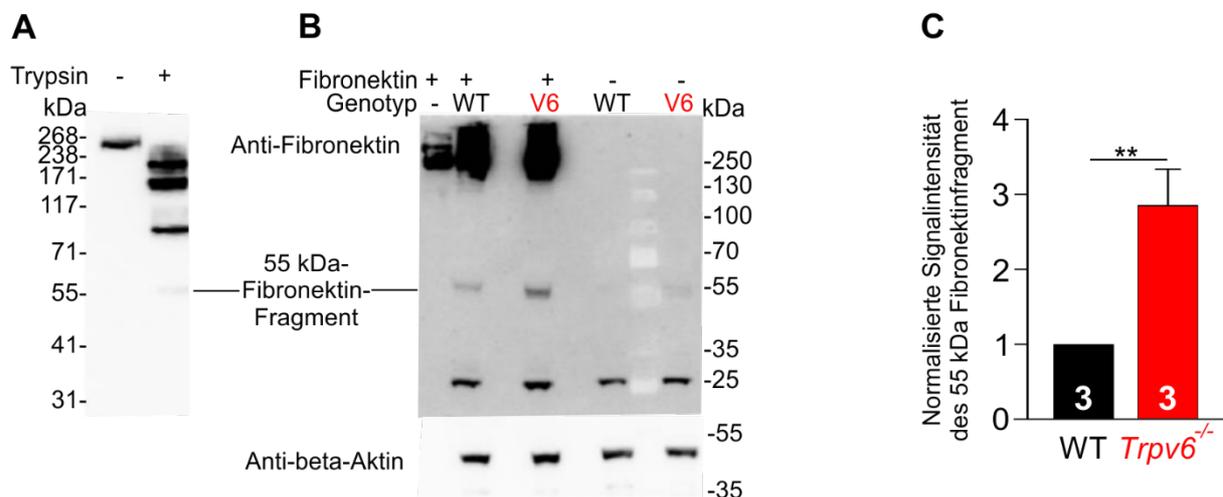


Abbildung 14: **Analyse der proteolytischen Aktivität in WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten (E13,5) (entnommen aus Winter et al. 2020).**

**A**, Western-Blot mit einem Anti-Fibronectin-Antikörper von Fibronectin vor (-) und nach (+) Hydrolyse mit Trypsin. **B**, Western-Blot mit einem Anti-Fibronectin-Antikörper (oben) in Abwesenheit (-) oder Gegenwart (+) von Fibronectin und RIPA-Lysaten aus WT- oder *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten. Nach Entfernung der Antikörper durch Strippen (3.2.6.5) wurde der Blot zur Kontrolle mit Anti- $\beta$ -Actin-Antikörpern inkubiert (unten). **C**, Densitometrische Auswertung der exemplarisch in B gezeigten Signale von 55 kDa-Fibronectinabbauprodukten, normalisiert auf die Kontrollbanden des  $\beta$ -Actins (n=3). Die Abbildung zeigt Mittelwerte + SD (\*\* p < 0,01).

#### 4.1.2 Untersuchung von primären Trophoblasten

Trophoblasten bilden den größten Teil der Labyrinthzone und steuern als Kontaktfläche zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf den Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus. Eine TRPV6-abhängige Expression von Proteasen in Trophoblasten könnte also die Struktur der Labyrinthzone und somit den Stofftransport von der Mutter zum Embryo beeinflussen.

#### 4.1.2.1 Charakterisierung von primären Trophoblasten aus Mausplazenta

Primäre Trophoblasten aus Mausplazenta wurden nach 3 Tagen in Kultur mithilfe von Antikörpern gegen die trophoblastenspezifischen Markerproteine Dysferlin, Cytokeratin 7 und GCM1 (3.2.5.1) immunzytochemisch analysiert (3.2.5.7; Abb. 15). Nahezu alle Zellen zeigten Fluoreszenzsignale aller drei Markerproteine und können somit als primäre Trophoblasten betrachtet werden.

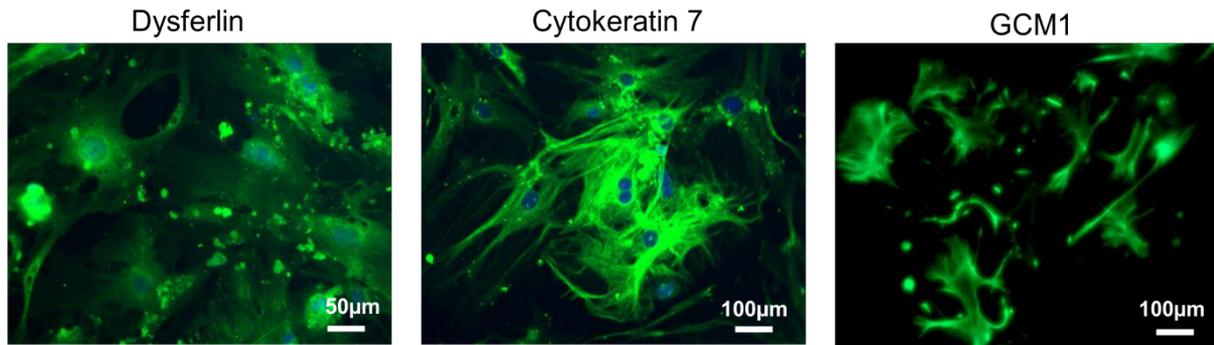


Abbildung 15: Immunzytochemischer Nachweis von trophoblasten-spezifischen Markerproteinen in isolierten WT-Trophoblasten.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am Tag 3 in Zellkultur nach immunzytochemischer Färbung der Markerproteine Dysferlin, Cytokeratin 7 und GCM1 und Zellkernfärbung mit DAPI (blau).

#### 4.1.2.2 Nachweis von TRPV6 in primären Trophoblasten

Zum Nachweis von TRPV6 in primären Trophoblasten wurden 6 - 30 Plazenten von WT-Tieren am Tag 13,5 der Schwangerschaft entnommen (3.2.2). Die primären Trophoblasten wurden isoliert (3.2.5.1) und lysiert (3.2.6.1). Wie unter 4.1.1.1 beschrieben, wurde TRPV6 immunpräzipitiert und mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse untersucht (Abb. 16, A, B). Im Unterschied zu nicht-transfizierten HEK-Zellen und Trophoblasten vor Immunpräzipitation (Input) konnten sowohl mTRPV6-überexprimierenden HEK-Zellen als auch Trophoblasten nach Immunpräzipitation Proteine einer Größe von ~ 80 kDa, die der rechnerischen Größe von TRPV6 entspricht (Abb. 16, A). Zusätzlich identifizierte Proteine einer Größe > 250 kDa könnten TRPV6-Oligomere darstellen. Dieses Ergebnis wurde durch die massenspektrometrische Analyse immunpräzipitierter TRPV6-Peptide bestätigt (Abb. 16, B). Die TRPV6-Aminosäuresequenzabdeckung dieser Peptide betrug 27 %. Sowohl Western-Blot als auch Massenspektrometrie zeigten somit die Expression von TRPV6 in Trophoblasten am Tag E13,5. Zur unabhängigen Bestätigung dieses Ergebnisses wurden Trophoblasten aus Plazenten der Mauslinie *Trpv6-IC/eRosa26-τGFP* untersucht, in welchen die Aktivität des TRPV6-Promotors durch Expression des grün-fluoreszierenden Reporterproteins GFP sichtbar wurde (Abb. 16, C). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Western-Blots und der massenspektrometrischen Analyse zeigten Trophoblasten dieser Mauslinie im Unterschied zum WT eine grüne Fluoreszenz

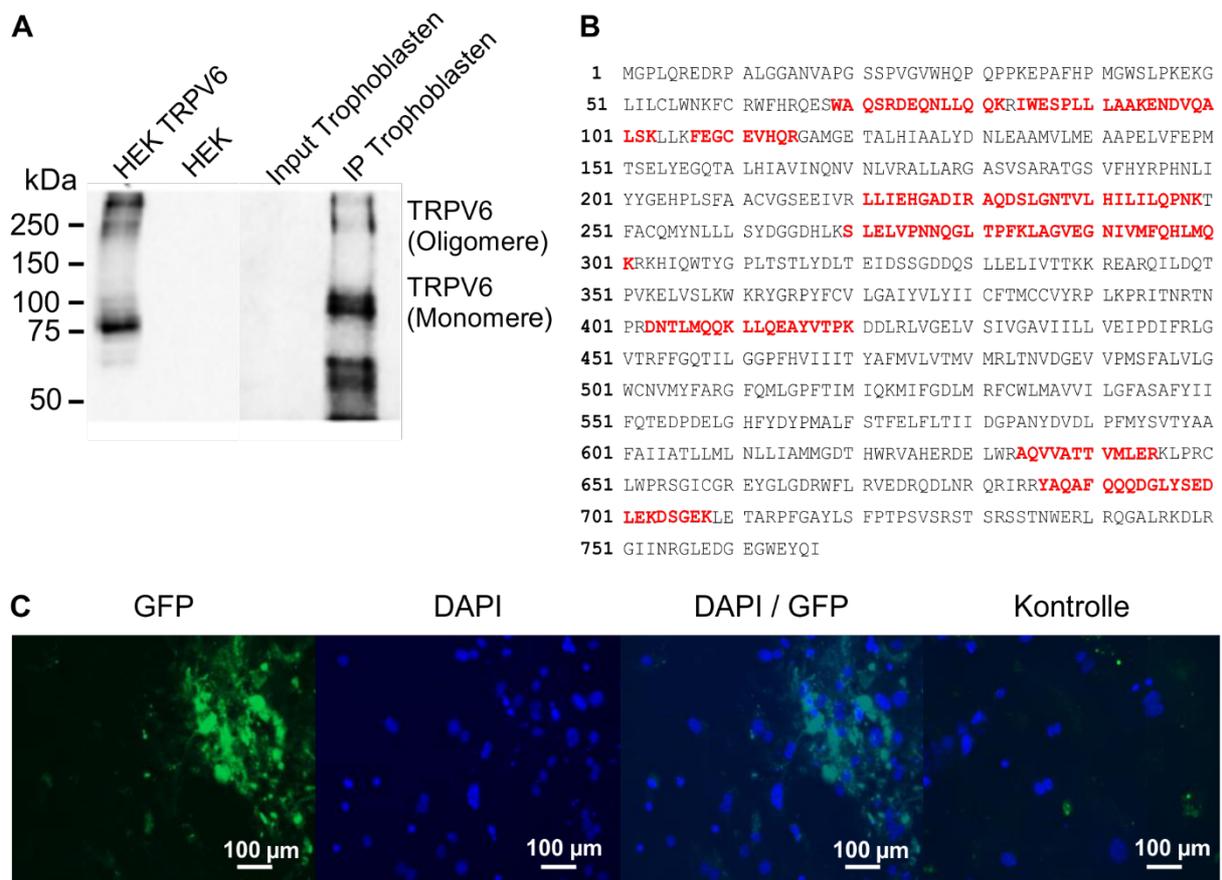


Abbildung 16: **Nachweis des TRPV6-Proteins in isolierten Trophoblasten (E13,5) von WT-Mäusen.** **A.** Western-Blot von TRPV6 aus TRPV6-transfizierten HEK-Zellen, nicht transfizierte HEK-Zellen, Trophoblasten vor (Input) und nach Immunpräzipitation (IP) mit Anti-TRPV6-Antikörper 429. **B.** Massenspektrometrische Analyse nach Immunpräzipitation. Identifizierte, tryptische Peptide sind in der TRPV6-Aminosäuresequenz rot hervorgehoben. **C.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der grünen Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins aus isolierten Trophoblasten von *Trpv6-IC/eRosa26-τGFP*-Tieren nach Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Als Kontrolle dienen DAPI-gefärbte Trophoblasten aus WT-Mäusen.

#### 4.1.2.3 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ auf Wachstum und Zellmorphologie von Trophoblasten der Maus

Der Einfluss der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf das Wachstum und die Zellmorphologie von Trophoblasten wurde durch Vergleich primärer Trophoblasten aus WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Zellen wurden in 1,5 mM oder 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  kultiviert, täglich mit Eosin und Azur gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert (**Abb. 17, A**). in Gegenwart von 1,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  war bereits am dritten Tag in Kultur deutlich zu erkennen, dass sich *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten schlechter vernetzen (**Abb. 17, A**) und es zeigte sich eine größere Zahl einzelner (isolierter) Zellen (**Abb. 17, B**). Die Morphologie der Zellen unterschied sich dagegen nicht. Sowohl ihre Zellfläche (**Abb. 17, C**) als auch die Zahl spindelartiger Zellen (**Abb. 17, D**) war gleich. In niedriger (0,1 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wuchsen *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten

signifikant besser (**Abb. 17, E**). Die Daten zeigen, dass die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration das Wachstum und die Zellmorphologie von WT- und TRPV6-defizienten Trophoblasten in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

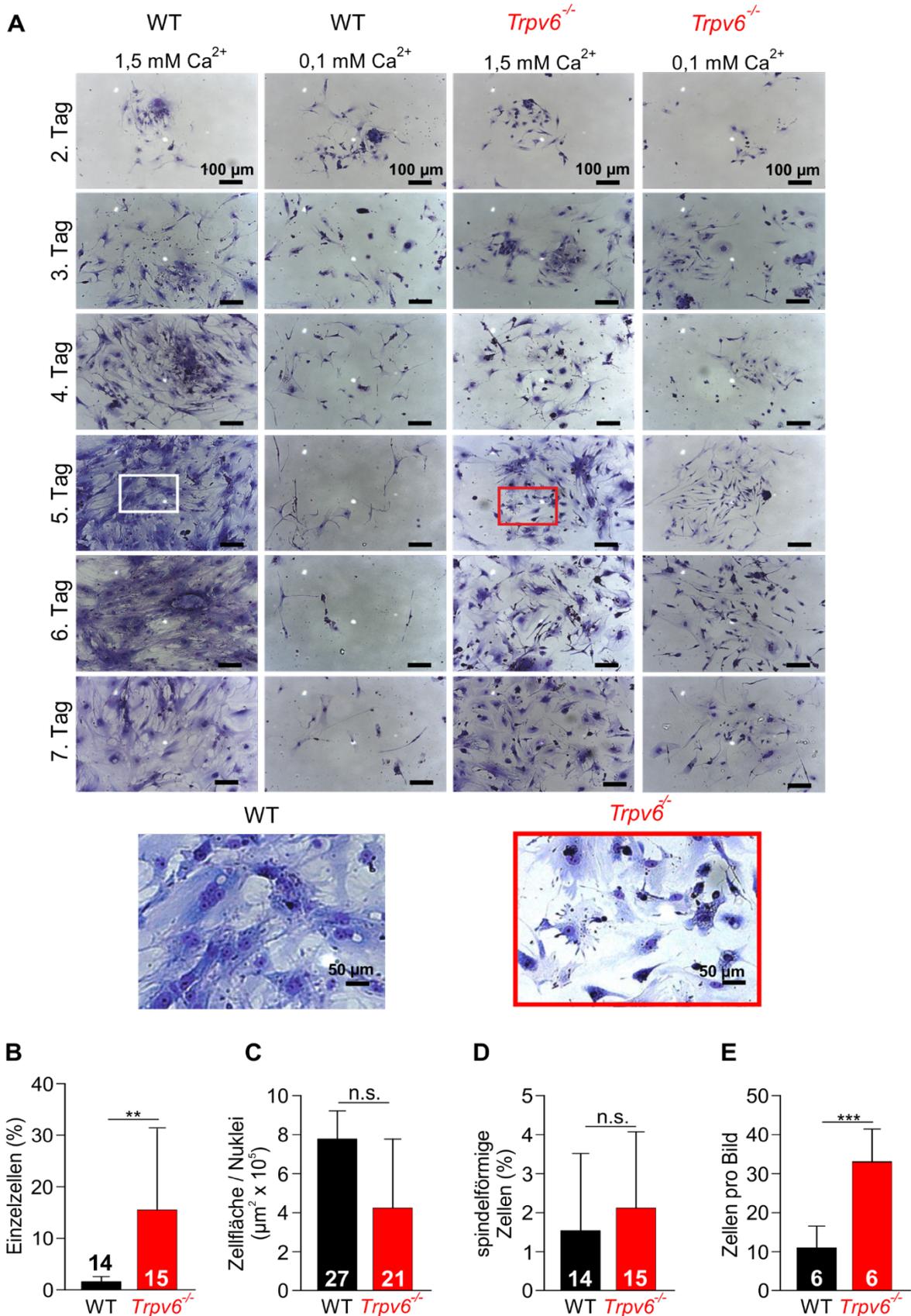


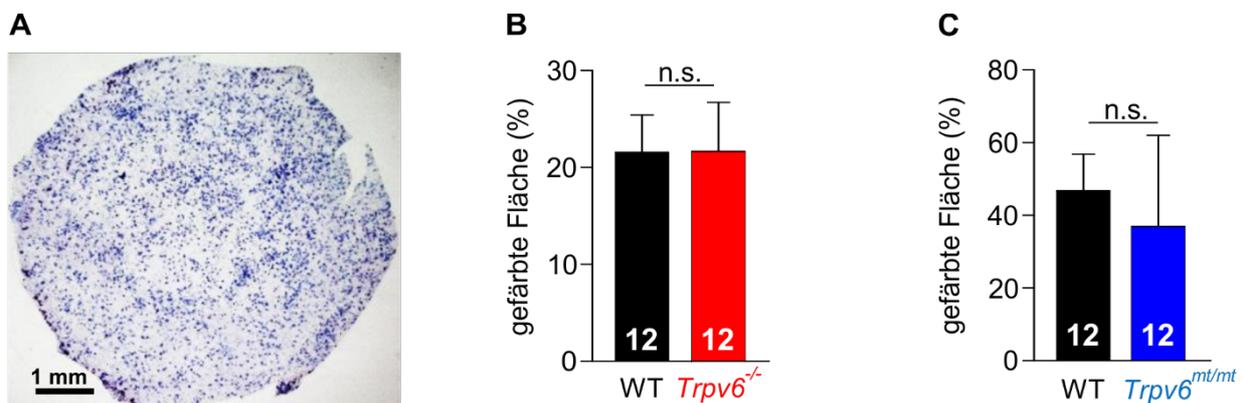
Abbildung 17: Bildunterschrift siehe nächste Seite.

**Abbildung 17: Analyse des Wachstums und der Zellmorphologie von isolierten primären Trophoblasten in Zellkultur aus Plazenten (E13,5) von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A.** Hämatoxylin/Azur-Färbung primärer Wildtyp- (WT) und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten an 7 Tagen nach Inkulturnahme in 1,5 mM oder 0,1mM Ca<sup>2+</sup>. **B.** Anzahl isolierter Trophoblasten (3.Tag, 1,5 mM Ca<sup>2+</sup>), **C.** Zellfläche normiert auf die Anzahl der Zellkerne (3. Tag, 1,5 mM Ca<sup>2+</sup>), **D.** die Anzahl der Zellen mit spindelförmiger Morphologie (3. Tag, 1,5 mM Ca<sup>2+</sup>) und **E.** der Zellzahl (7. Tag, 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>), Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben, Signifikanzniveau n.s. nicht signifikant dargestellt als Mittelwert + SD.

**4.1.2.4 TRPV6 beeinflusst das Migrationsverhalten primärer Trophoblasten nicht**

Verschiedene Trophoblastensubtypen (z.B. SpaTGC) sind während der Schwangerschaft am Remodelling der Spiralarterien beteiligt und besitzen die Fähigkeit zu migrieren und das umliegende uterine Gewebe zu infiltrieren. Der Einfluss von TRPV6 auf das Migrationsverhalten wurde in einem Transwell Migration Assay (3.2.5.4) mit isolierten WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten untersucht (Abb. 17). Während *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Zellen kein TRPV6-Protein bilden, entsteht in *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten ein als Ionenkanal funktionsloses TRPV6-Protein (Weissgerber et al. 2011, Weissgerber et al. 2012). Isolierte Trophoblasten wurden in definierter Zahl (3.2.5.1) auf der Membran einer Migrationskammer ausgesät, für 48 Stunden inkubiert und migrierte Zellen wurden nach Eosin/ Azur-Färbung (3.2.5.2) und lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 18, A). Die Migration von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten war nicht signifikant verändert (Abb. 18, B), ebenso wie das Migrationsverhalten von *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten (Abb. 18, C). Offensichtlich beeinflussen weder der TRPV6-abhängige Ca<sup>2+</sup>- Ioneneinstrom noch das als Ionenkanal funktionslose TRPV6-Protein das Migrationsverhalten von Trophoblasten.



**Abbildung 18: Migrationsverhalten von isolierten primären Trophoblasten aus Plazenta an Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Mäusen.**

**A.** Durchlichtbild einer ausgeschnittenen Membran aus einem Einsatz für den Transwell-Migration Assay nach Eosin/Azur Färbung. **B.** Quantitative Analyse der blau gefärbten Fläche relativ zur Fläche der Membran in Prozent als Maß für die Anzahl der migrierten Zellen im Vergleich von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten und **C.** im Vergleich von WT- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten von je 12 Membranen und je 6 Tieren. Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben mit Signifikanzniveau n.s. nicht signifikant, Mittelwert + SD.

#### 4.1.2.5 Die Vitalität primärer Trophoblasten ist unabhängig von TRPV6

Zur Untersuchung der Vitalität von WT- und *Trpv6*-defizienten Trophoblasten wurde 48h, 96h und 168h nach Inkulturnahme die Bildung von Formazan aus MTS durch vitale Zellen photometrisch bestimmt. Die Vitalität von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten (**Abb. 19, A**) als auch der *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten (**Abb. 19, B**) unterschied sich zu keinem der Zeitpunkte signifikant von der Vitalität der WT-Trophoblasten.

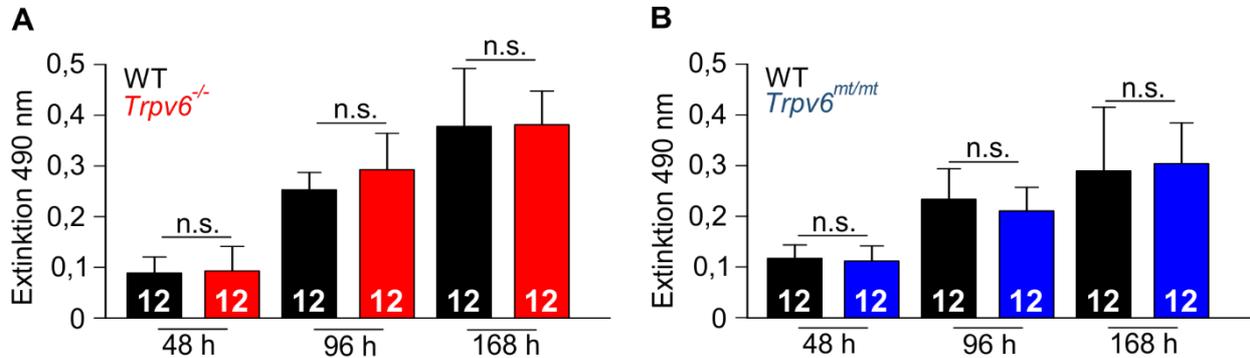


Abbildung 19: Vitalität primärer Trophoblasten aus Plazenten von WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>- Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft.

**A.** Zellvitalität über 7 Tage dargestellt als Extinktion von Formazan bei 490 nm von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>- Trophoblasten und **B.** WT- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Trophoblasten von je 12 Kavitäten und je 6 Tieren. Signifikanzniveau n.s. nicht signifikant.

#### 4.1.2.6 Apoptose und Nekrose werden in Trophoblasten nicht durch TRPV6 beeinflusst

Ein möglicher Einfluss von TRPV6 auf die Überlebensfähigkeit von Trophoblasten wurde mit Hilfe eines Apoptose/Nekrose-Assays untersucht (3.2.5.6). **Abbildung 20, A** zeigt beispielhaft eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer solchen Zellfärbung primärer Trophoblasten aus WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Anzahl lebender, apoptotischer und nekrotischer *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und WT-Trophoblasten identifiziert werden (**Abb. 20, B**). Offensichtlich hat TRPV6 keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose oder die Nekrose von Trophoblasten.

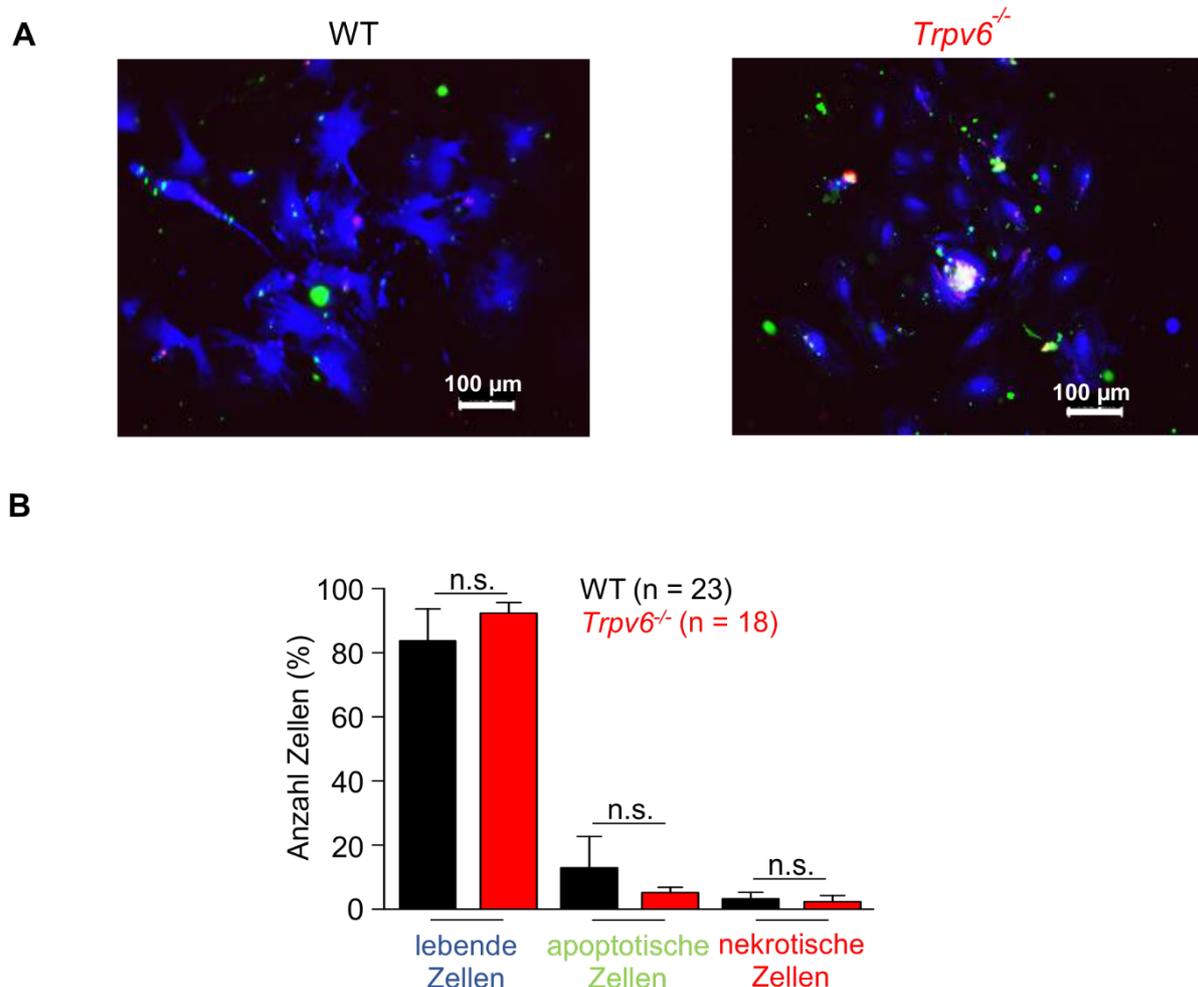


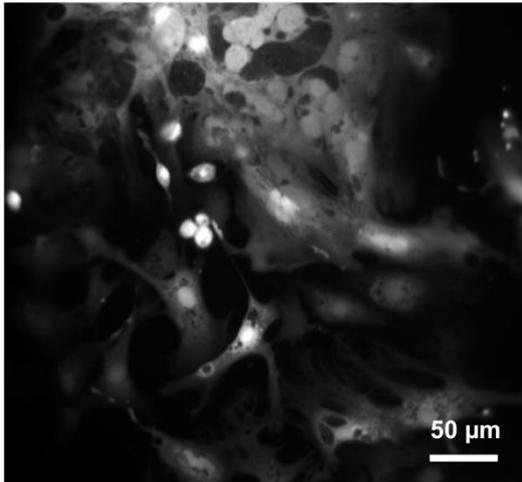
Abbildung 20: **Apoptose und Nekrose primärer Trophoblasten aus Plazenta am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden (blau), apoptotischen (grün) und nekrotischen (rot) Trophoblasten nach 72 h in Kultur. **B.** Häufigkeit (%) von wie in A gezeigten Zellen aus 22/18 Aufnahmen von je 3 WT und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren, n.s. nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.1.2.7 Die basale $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist in TRPV6-defizienten Trophoblasten reduziert

Um den Einfluss von TRPV6 auf die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Trophoblasten zu untersuchen, wurden WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten aus Plazenten isoliert (3.2.5.1) und nach zwei Tagen in Kultur mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht (Abb 21, A) (3.2.5.8). Die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant reduziert (Abb. 21, B). Dies zeigt, dass TRPV6 in die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Trophoblasten am Tag E13,5 der Schwangerschaft involviert ist.

A



B

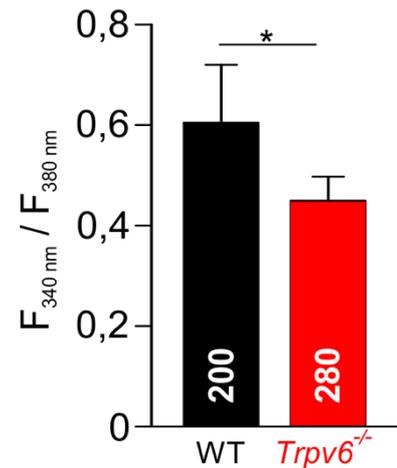


Abbildung 21: Basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration isolierter Trophoblasten (E13,5) von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren am Tag 13,5 der Schwangerschaft.

A. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fura-2 beladenen Trophoblasten ( $F_{360 \text{ nm}}$ ). B. Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 200 WT-Trophoblasten aus 6 Tieren und 280 *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten aus 8 Tieren mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging. Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben mit dem Signifikanzniveau \*  $p < 0,05$ , dargestellt als Mittelwert + SD.

#### 4.1.2.8 Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Trophoblasten

Zur Analyse des Einflusses von TRPV6 auf die Genexpression wurde das Proteom von WT- und TRPV6-defizienten Trophoblasten vergleichend massenspektrometrisch untersucht. Die Zellen wurden lysiert (3.2.6.1), die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.6.2), 100 µg Protein gelelektrophoretisch getrennt (3.2.6.4), 20 einzelne Gelabschnitte separiert aufgearbeitet (3.2.7.1), die Proteine mittels HPLC getrennt (94 min Gradient) und schließlich massenspektrometrisch analysiert (3.2.7.2). Das Ergebnis ist in **Abbildung 22** dargestellt. In fünf Proben aus WT-Trophoblasten wurden 1144, in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten 937 gemeinsam vorkommende Proteine identifiziert (**Abb. 22, A**). Insgesamt wurden 2824 unterschiedliche Proteine detektiert (**Abb. 22, B**). 746 Proteine kamen ausschließlich in WT- und 182 Proteine ausschließlich in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Zellen vor, 1896 Proteine wurden in Trophoblasten beider Genotypen nachgewiesen. Ebenso wie in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten (4.1.1.3) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten Serinproteasen signifikant angereichert (**Abb. 22, C**). Es handelte sich um die Serinproteasen GRAF, GRAC, GRAG und HTRA1. Außerdem zeigten sich Matrixproteine (FND3A, FINC) im WT stärker exprimiert, waren also in TRPV6-defizienten Zellen unterrepräsentiert.

Eine immunzytochemische Analyse nach drei Tagen in Kultur bestätigte das Fehlen von Fibronektin (FINC) in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten (**Abb. 23**). Im Unterschied zur Proteomanalyse der Plazenta zeigten sich die Antitrypsine A1AT4 und A1AT5 in Trophoblasten unverändert (**Abb. 22, C**). Das Magnesiumtransporterprotein 1 (MAGT1) war im WT deutlich häufiger nachweisbar als in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten. In Epithelzellen ist MAGT1 am Mg<sup>2+</sup>-Transport in die Zelle beteiligt (Goytain et al. 2005) und könnte somit auch in Trophoblasten für den Mg<sup>2+</sup>-Aufnahme wichtig sein.

Weitere mögliche Unterschiede im Proteom von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten wurden mithilfe des Computerprogramms Scaffold analysiert. Ziel der Untersuchung war es, unterschiedlich exprimierte Gene und ihre Genprodukte ontologisch definierten GO-Kategorien (Gene Ontology Domain) wie zelluläre Komponenten, biologische Prozesse und molekulare Funktionen zuzuordnen. In **Abbildung 24** sind Subkategorien solcher Genprodukte dargestellt, die häufige Abweichungen der beiden Genotypen zeigten. Es wurden 31 Proteine identifiziert, welche in der Kategorie Extrazelluläre Matrix (ECM) zwischen beiden Genotypen signifikant unterschiedlich reguliert waren. Davon waren in WT-Trophoblasten 23 Proteine häufiger und acht Proteine weniger häufig exprimiert. Dies bestätigt die Tendenz, dass TRPV6 für die Bildung der extrazellulären Matrix eine funktionelle Bedeutung hat. In der GO-Kategorie Adhäsion wurden 41 Proteine nachgewiesen, die sich zwischen den Trophoblasten beider Genotypen unterschieden. Darunter waren die Proteine Laminin (LAMA5), Nidogen-1 (NID-1) und Nidogen-2 (NID-2), welche die direkte Zell-Zell-Adhäsion maßgeblich beeinflussen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der mangelhaften Vernetzung

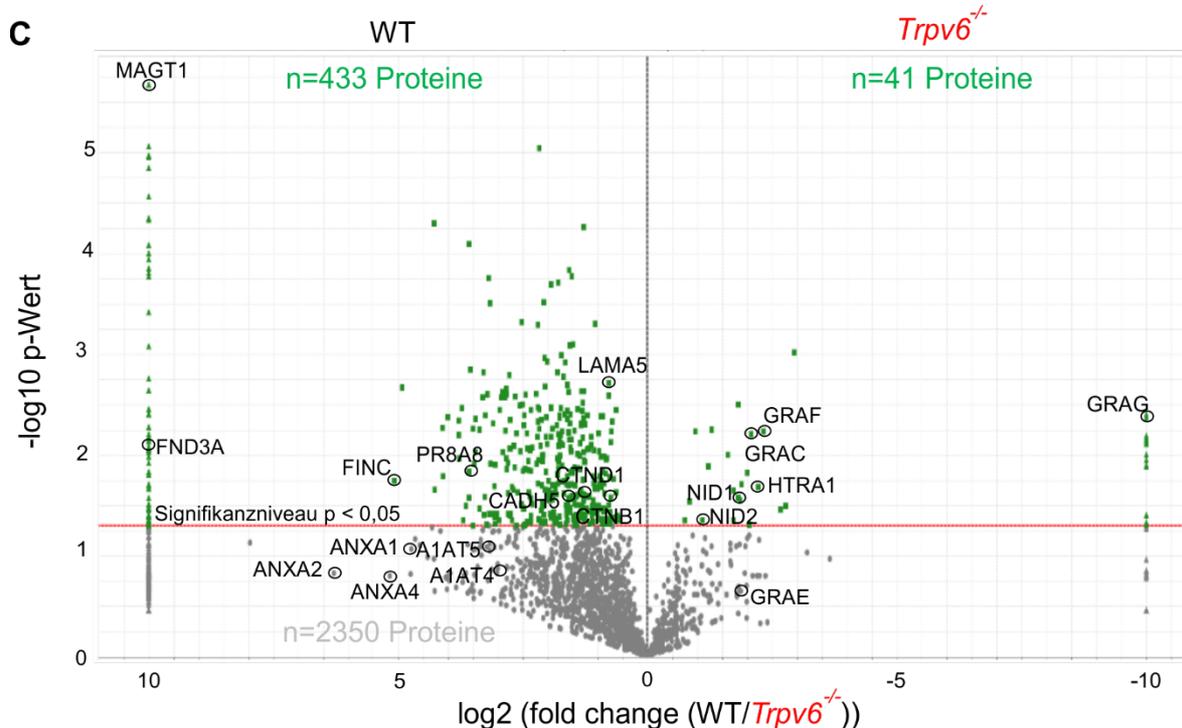
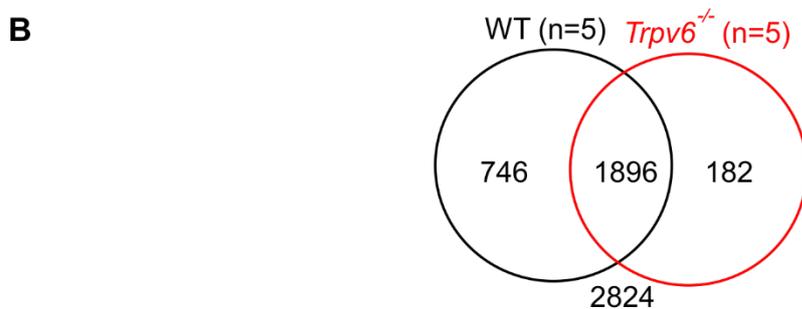
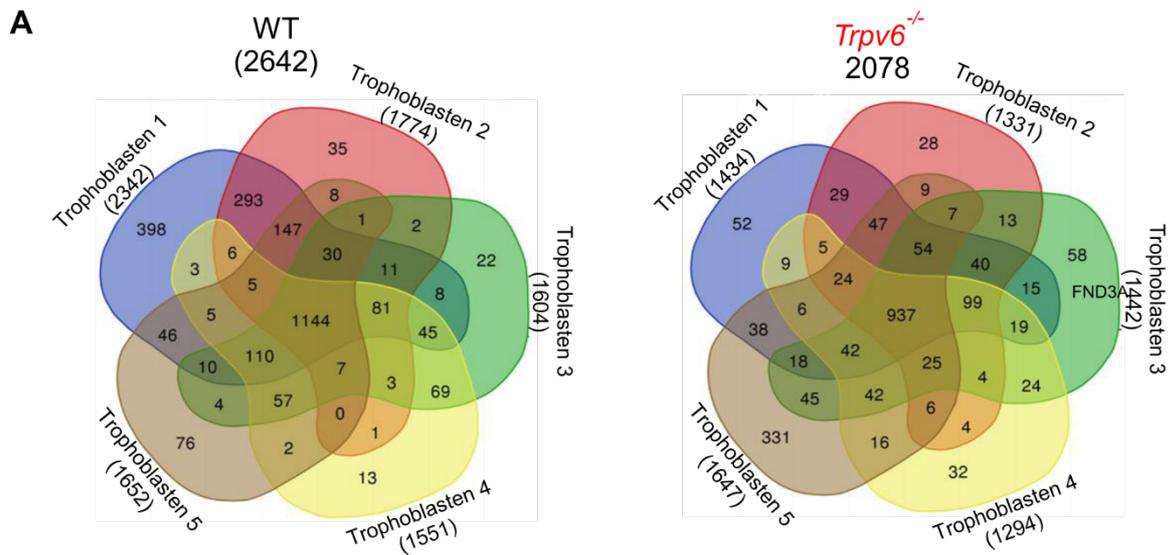


Abbildung 22: Massenspektrometrische Proteomanalyse von murinen Trophoblasten am Tag 13,5 der Schwangerschaft aus WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup> Mäusen.

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) einzelner Präparate. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in je fünf Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

TRPV6-defizienter Trophoblasten in Zellkultur (4.1.2.3). Sieben Tight Junction-assoziierte Proteine waren unterschiedlich stark exprimiert. Darunter waren das strukturbildende Tight-Junction Protein Cadherin 5 (CADH5) sowie die beiden cadherin-assoziierten Proteine Catenin D1 (CTND1) und Catenin B1 (CTNB1), welche in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant reduziert waren. CADH5 beeinflusst die Struktur des Tight-Junction-Proteinkomplexes und verändert damit potentiell die parazelluläre Permeabilität von Epithelien (Gavard 2014). Catenine verbinden Cadherine mit dem Zytoskelett, wodurch sie den Tight-Junction-Komplex stabilisieren, aber dessen Permeabilität nicht direkt beeinflussen (Salon et al. 2005). TRPV6 beeinflusst demnach möglicherweise die Struktur von Tight-Junctions in Trophoblasten über den Cadherin-Catenin-Komplex. 26 Ionen-transport-assoziierte Proteine waren in Abwesenheit von TRPV6 verändert, jedoch waren keine anderen Ca<sup>2+</sup>-permeablen Transportproteine darunter, die ein Fehlen von TRPV6 kompensieren könnten. Das von Trophoblasten gebildete Peptidhormon Prolaktin (PR8A8) war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Zellen vermindert. Somit könnte TRPV6 einen

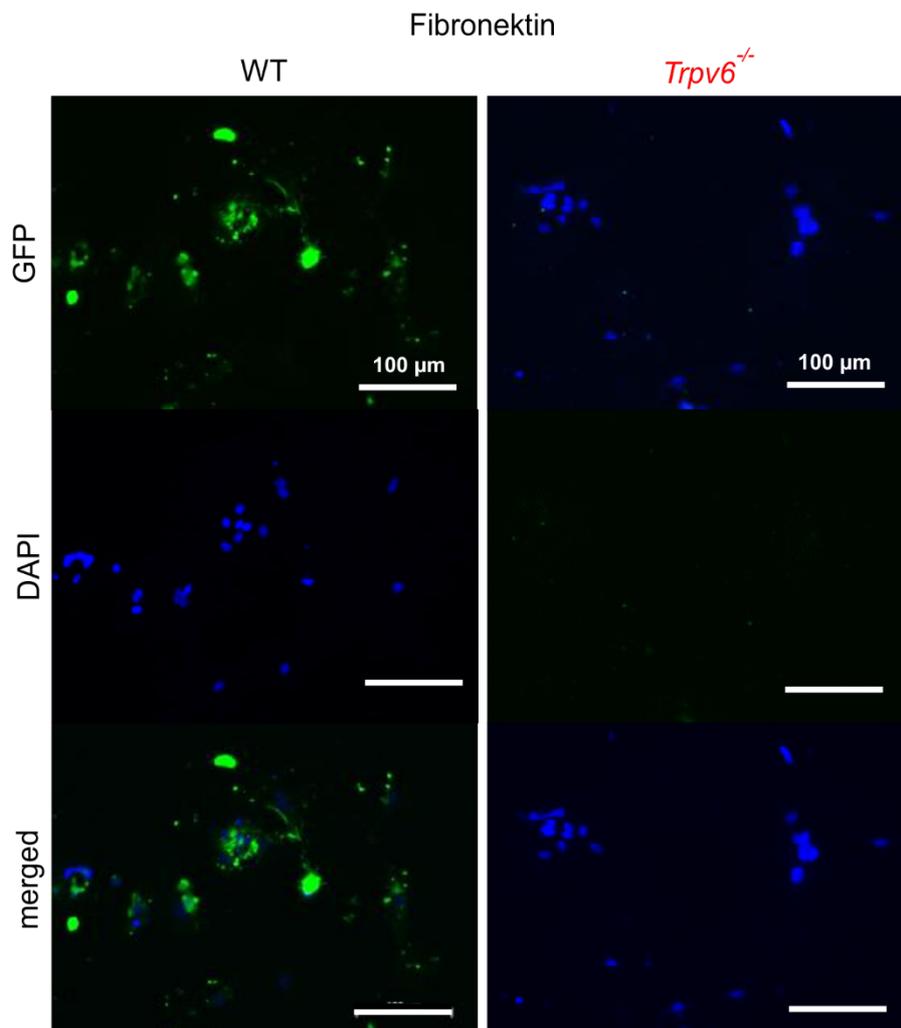


Abbildung 23: **Immunzytochemie zum Nachweis von Fibronectin in WT und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten von Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft.**

**A**, Immunzytochemie von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten in Zellkultur an Tag 3 nach Isolation. Inkubation mit einem Fibronectin spezifischen Antikörper (grün), Zellkernfärbung DAPI (blau).

Einfluss sowohl auf die Milchbildung als auch die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft haben.

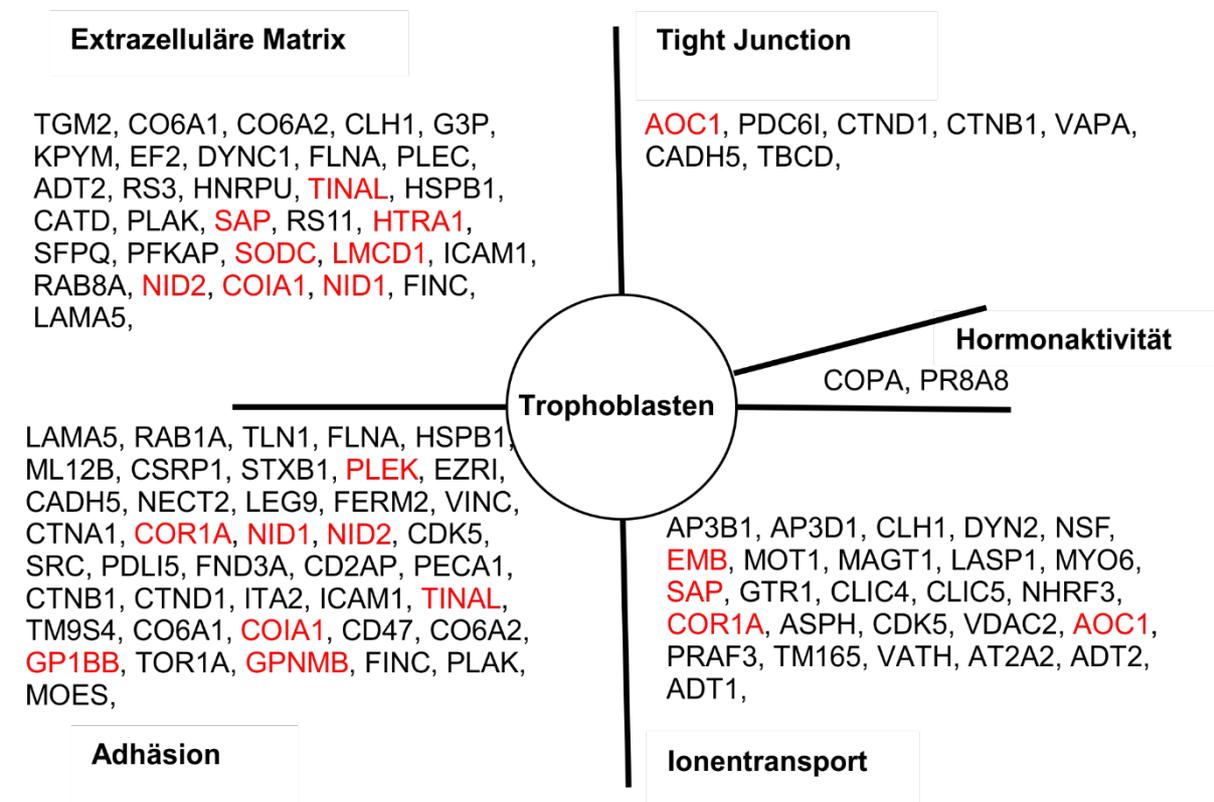


Abbildung 24: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion, Ionentransport und Hormonaktivität, die in primären Trophoblasten von WT- (n=5) und *Trpv6*<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden.

Proteine (SwissProt-Kennung) in schwarzer Schrift waren in WT-Trophoblasten und Proteine in roter Schrift in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant angereichert. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des empAI-Wertes und das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

## 4.2 Vorkommen und Funktion von TRPV6 in der Eihülle am Tag E13,5

### 4.2.1 Nachweis von TRPV6 in der murinen Eihülle

Eihüllen von WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>- Tieren wurden am Tag 13,5 der Schwangerschaft entnommen (3.2.2) und lysiert (3.2.6.1). TRPV6-Proteine wurden durch Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper AK429 angereichert (3.2.6.3) und mittels Western-Blot (3.2.6.5) und Massenspektrometrie (3.2.7) untersucht. Im Western-Blot (Abb. 25, A) konnten in mTRPV6-überexprimierenden HEK-Zellen Signale bei 70-90 kDa und größer 250 kDa detektiert werden. Diese Signale zeigten sich ebenfalls bei immunpräzipitierten Proteinen aus WT-Eihüllen. Die Masse der nachgewiesenen Proteine könnte dem TRPV6-Monomer (rechnerische molekulare Masse 87,3 kDa) entsprechen. Die Kontrolle (HEK-Zellen), Eihüllenlysate vor Immunpräzipitation (Input) und die Immunpräzipitation aus *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen zeigten dagegen keine Signale. Mithilfe der massenspektrometrischen Analyse von immunpräzipitierten Proteinen aus WT-Eihüllen konnten 12 verschiedene tryptische TRPV6-

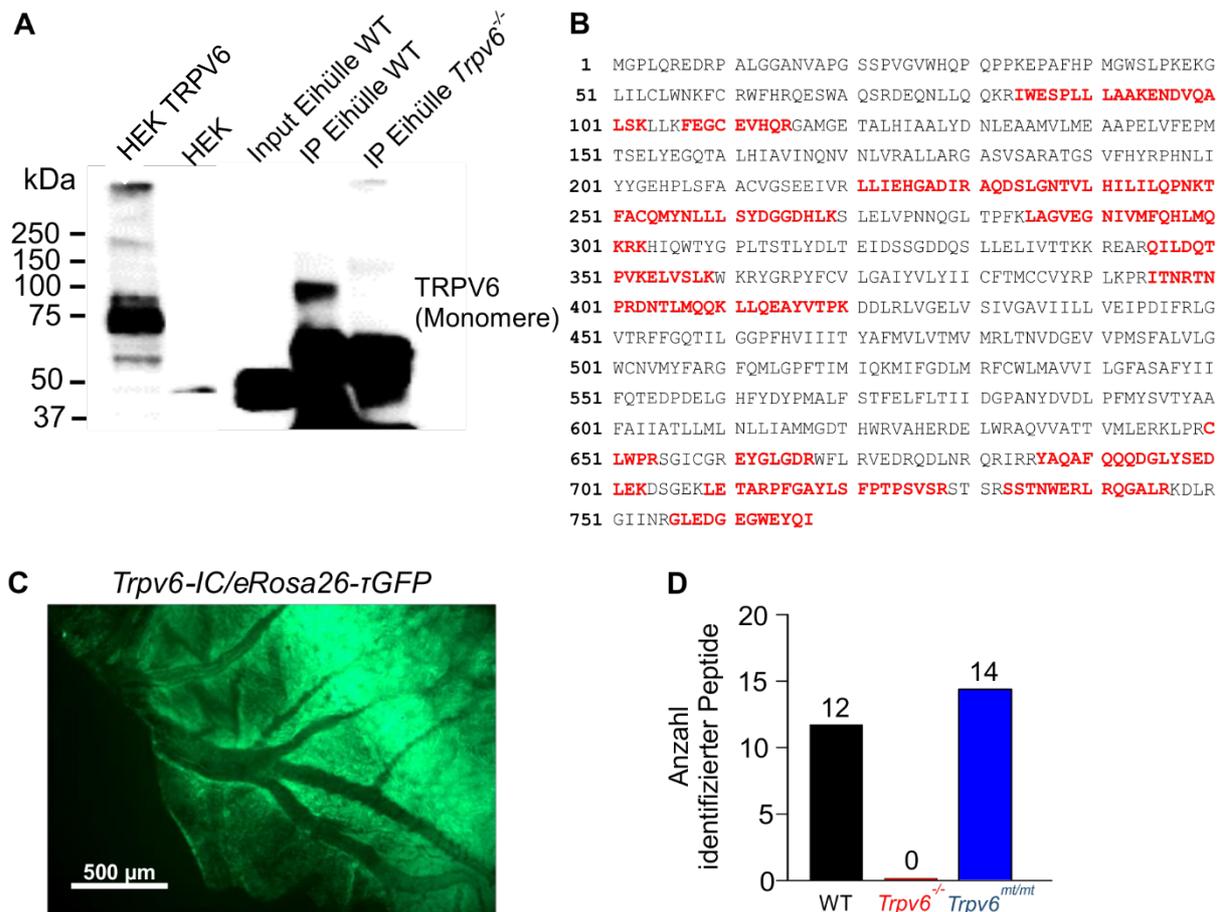


Abbildung 25: Nachweis des TRPV6-Proteins in Eihüllen aus WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>-, *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>- und *Trpv6-IC/eRosa-tGFP*-Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft.

**A.** Western-Blot von TRPV6 aus TRPV6-transfizierten HEK-Zellen, nicht transfizierten HEK-Zellen, Eihülle vor (Input) und nach Immunpräzipitation (IP) aus WT und nach Immunpräzipitation mit Anti-TRPV6-Antikörper 429 aus *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren. **B.** Massenspektrometrische Analyse nach Immunpräzipitation Eihüllenproteinen aus WT. Identifizierte, tryptische Peptide sind in der TRPV6-Aminosäuresequenz rot hervorgehoben. **C.** Anzahl massenspektrometrisch identifizierter TRPV6-spezifischer Peptide nach Immunpräzipitation aus Eihülle von WT-, *Trpv6*<sup>-/-</sup>- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Mäusen **D,** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Eihülle aus einer *Trpv6-IC/eRosa-tGFP* Reportermaus.

Peptide identifiziert werden (**Abb. 25, B**). Diese deckten 27% der TRPV6-Aminosäuresequenz ab. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Trpv6-IC/eRosa-τGFP*-Eihüllen zeigten deutliche grün-floureszierende Signale des Reporterproteins GFP. Dies bestätigte eine Expression von TRPV6 in Eihüllen. Eine massenspektrometrische Analyse von Proteinlysaten aus *Trpv6<sup>-/-</sup>* und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Eihüllen bestätigte, dass TRPV6 in Eihüllen von *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Tieren fehlte, diese Tiere also tatsächlich TRPV6-defizient sind (**Abb. 25, D**). Dagegen wurden in Eihüllen von *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tieren 14 TRPV6-Peptide identifiziert. Dies zeigt, dass die Mutation D581A keinen Einfluss auf die Gegenwart des TRPV6-Proteins in Eihüllen hat.

#### 4.2.2 TRPV6 beeinflusst die Morphologie der Eihülle nicht

Die murine Eihülle umhüllt den kompletten murinen Embryo und steht mit der Plazenta und dem Uterus in Verbindung. Der Stofftransport zwischen Mutter und Embryo erfolgt bei Mäusen sowohl über die Plazenta als auch über die Eihülle (Suzuki et al. 2008, Hemberger et al. 2020). Da die Labyrinthzonen von TRPV6-defizienten Plazenten am Tag E13,5 morphologische Unterschiede im Vergleich zu WT-Tieren aufwiesen (**4.1.1.2**), wurden Unterschiede auch in der Eihülle vermutet. Die Vaskularisierung der Eihülle am Tag 13,5 erschien hinsichtlich der Verzweigung der feinen Kapillaren und der Dicke und der Länge der Blutgefäße unverändert (**Abb. 26, A**). Der Umfang der gesamten Eihülle (**Abb. 26, B**) und die Dicke ihres intraplazentaren Teils (**Abb. 26, C**) wurden in Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Kryoschnitten von WT- und *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Embryos mit Eihülle und Plazenta analysiert. Der Umfang von *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen erwies sich als signifikant kleiner. Dagegen war die Dicke des intraplazentaren Teils der Eihülle nicht signifikant verändert. Die verringerte Größe von Eihüllen aus *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Tieren korrelierte mit der geringeren Größe von TRPV6-defizienten Embryonen (Fecher-Trost et al. 2019) und ist vermutlich eine direkte Folge ihrer Unterentwicklung und keine TRPV6-spezifische Störung der Eihülle.

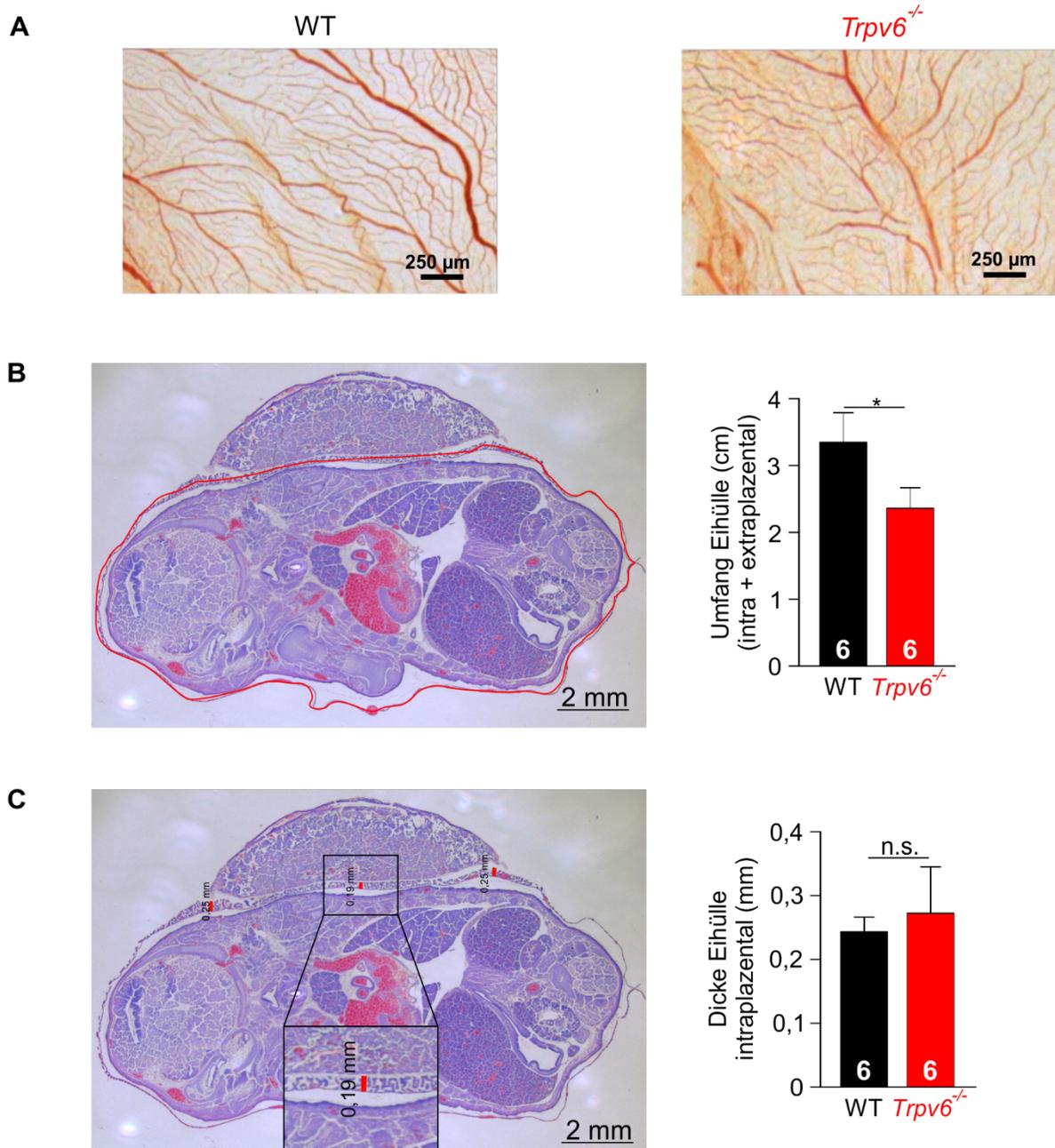


Abbildung 26: **Morphologische Analyse der murinen Eihülle von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Embryonen am Tag E13,5 der Schwangerschaft.**

**A.** Durchlichtaufnahmen zur Veranschaulichung der Vaskularisierung von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen. **B.** Quantitative Analyse des Umfangs der gesamten Eihülle (rote Linie) und **C.** der Dicke des intraplazentaren Teils der Eihülle (Mittel von je 3 Messpunkten, wie gezeigt). Untersucht wurden je 2 Kryoschnitte von je 3 WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Embryonen aus jeweils 2 Muttertieren. Signifikanzniveau \*  $p < 0,05$ ; n.s. nicht signifikant.

### 4.2.3 Vergleichende Proteomanalyse von WT- und TRPV6-defizienten Eihüllen

Der Einfluss von TRPV6 auf die Genexpression in der Eihülle wurde massenspektrometrisch in WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren untersucht. Das Gewebe wurde nach der Entnahme (3.2.2) lysiert (3.2.6.1). Eine Proteinbestimmung wurde durchgeführt (3.2.6.2) und 120 µg Protein wurde gelelektrophoretisch getrennt (3.2.6.4). Das Gel wurde in 16 Streifen geschnitten, aufgearbeitet (3.2.7.1) und die Proteine eines Streifens mittels HPLC- Gradienten über eine Zeit von 94 Minuten getrennt und massenspektrometrisch analysiert (3.2.7.2). In fünf Proben aus WT-Eihüllen wurden 562, in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten 775 gemeinsam vorkommende Proteine identifiziert (Abb. 27, A). Insgesamt wurden 1744 unterschiedliche Proteine detektiert (Abb. 27, B). 124 Proteine wurden ausschließlich in WT- und 359 Proteine in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen nachgewiesen, 1261 Proteine kamen in Eihüllen beider Genotypen vor.

Die semiquantitative Analyse der Proteomdaten (Abb. 27, C) zeigte, dass 174 Proteine signifikant stärker und 50 Proteine weniger abundant in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen waren. 1520 Proteine unterschieden sich in ihrer Menge nicht zwischen den beiden Genotypen. Die beiden E3-Ubiquitin-Proteinligasen NEDD4 und NHL1 waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen am stärksten angereichert. Sie sind am Abbau von fehlgefalteten Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System und der Degradation von Lysosomen beteiligt (Zeng et al. 2009, Garyali et al. 2009). Die beiden Proteine Carboxylesterase-1-C (EST1C) und Obscurin-like Protein 1 (OBSL1) waren in WT-Eihüllen im Vergleich am stärksten exprimiert. OBSL1 ist vermutlich an der Organisation von Mikrotubuli beteiligt. Im Unterschied zu Plazenta und Trophoblasten konnten in der Eihülle keine Granzyme nachgewiesen werden. Die Serinprotease HTRA1 wurde identifiziert, unterschied sich aber in ihrer Expression nicht zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen. Die Protease Cathepsin D (CATD) war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen signifikant stärker exprimiert. CATD ist ebenso wie Granzyme in der Lage, die extrazellulären Matrixproteine wie Fibronectin zu degradieren (Vidak et al. 2019). Konform dazu war Fibronectin in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen signifikant reduziert. Die Proteaseinhibitoren A1AT4 und A1AT5 waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen ebenfalls vermindert. Dies könnte ebenfalls zu einer verstärkten proteolytischen Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen beitragen. Das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Annexin-1 (ANXA1) war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen verstärkt exprimiert. Dieses Protein ist an der Translokation von TRPV6 an die Plasmamembran beteiligt (Raphaël et al. 2014). Andere Annexine, wie ANXA2 und ANXA4 waren nicht unterschiedlich exprimiert.

Zur weiteren Analyse der Proteomdaten wurden mithilfe des Computerprogramms Scaffold die GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix, Adhäsion, Tight Junctions und Ionen-transport analysiert (Abb. 28). Es wurden 15 Proteine identifiziert, welche in der GO-Kategorie Extrazelluläre Matrix zwischen den Genotypen der Eihüllen unterschiedlich stark exprimiert waren, davon waren vier Proteine in WT Eihüllen angereichert und elf Proteine davon waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup> Eihüllen abundanter. Neun Proteine waren signifikant unterschiedlich

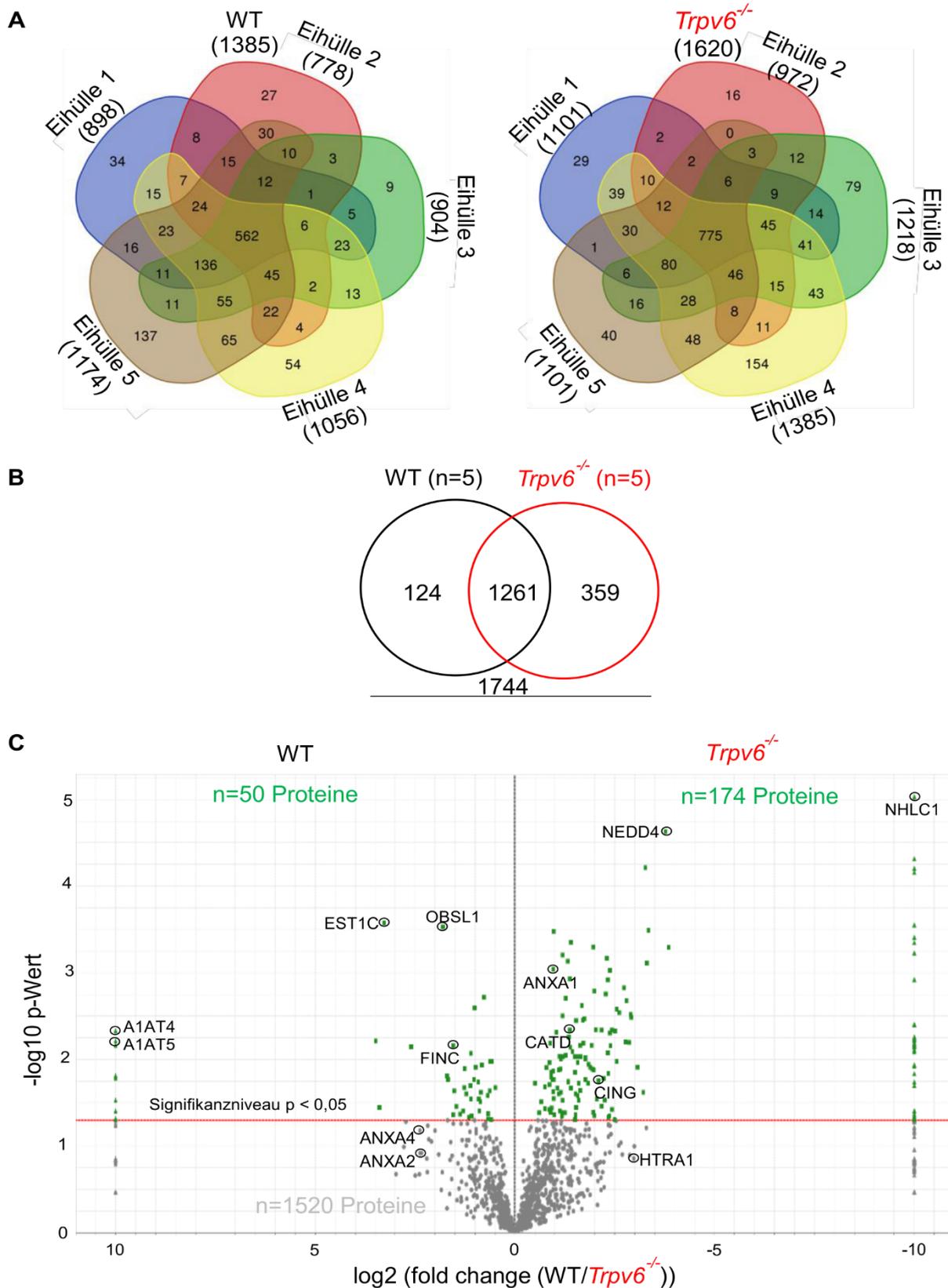


Abbildung 27: **Massenspektrometrische Proteomanalyse der murinen Eihülle am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in einzelnen Präparaten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in je fünf Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

stark exprimiert, welche sich in der GO-Kategorie Adhäsion befanden. Davon waren sechs Proteine signifikant weniger abundant in WT Eihüllen und drei Proteine waren in WT Eihüllen signifikant angereichert. Darunter befand sich das Calcium bindende Protein Annexin 1 (ANXA1). ANXA1 ist in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen stärker exprimiert als in WT-Eihüllen. ANXA1 ist in den Transport und die Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran beteiligt, somit könnte die erhöhte Expression eventuell durch einen kompensatorischen Mechanismus ausgelöst werden, um nicht vorhandene TRPV6-Proteine in die Membran zu transportieren. Andere Annexine, wie ANXA2 und ANXA4 waren nicht unterschiedlich exprimiert. Es waren zwei Proteine in WT-Eihüllen signifikant erhöht, welche zur GO-Kategorie Tight Junctions zugeordnet werden konnten. Das Tight Junction Protein Cingulin (CING) war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen signifikant abundanter. Cingulin spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der parazellulären Permeabilität. Von den Ionentransportproteinen waren zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen 20 Proteine signifikant in ihrer Menge verändert. Davon waren 17 Proteine signifikant in den WT-Proben abgereichert und drei Proteine kamen in den WT-Eihüllen vermehrt vor. Unter den Ionenkanal-Proteinen war kein Calcium-Kanal zu finden, welcher

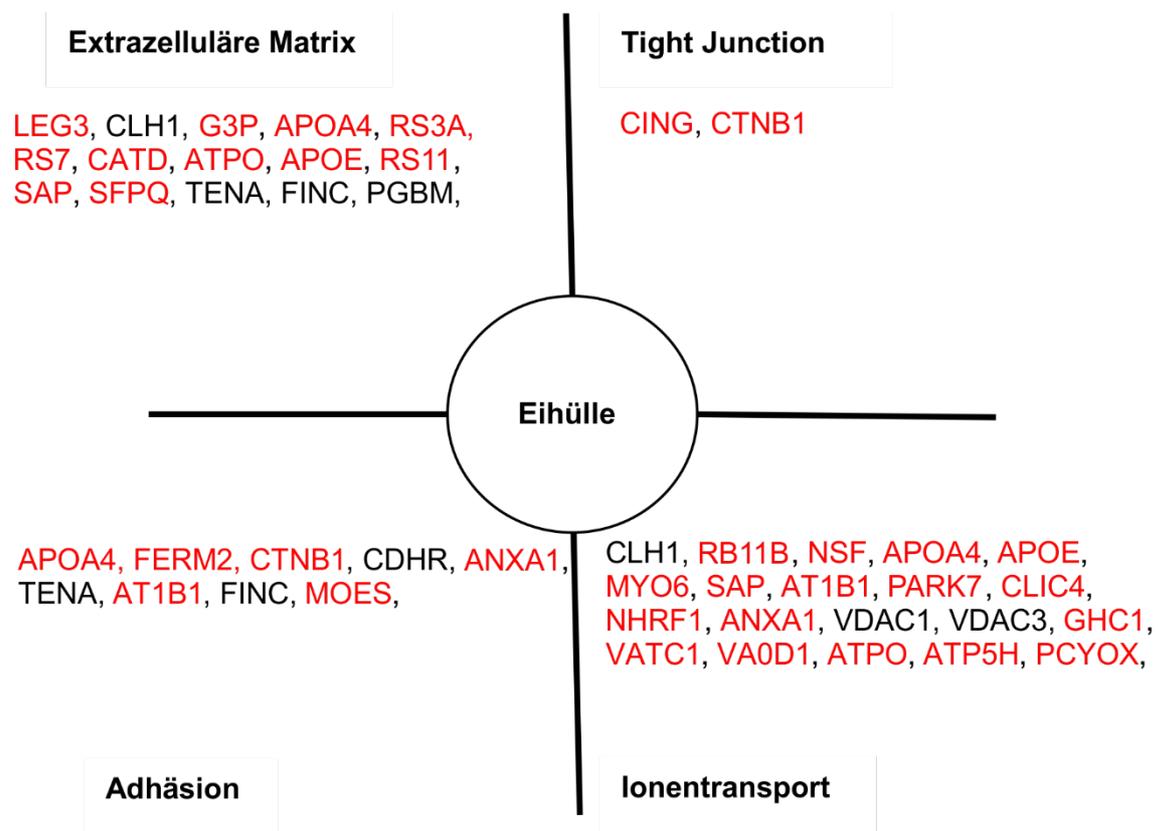


Abbildung 28: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion und Ionentransport, die in Eihüllen von WT- (n=5) und *Trpv6*<sup>-/-</sup> (n=5) Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden. Proteine (SwissProt-Kennung) in schwarzer Schrift waren in WT-Trophoblasten und Proteine in roter Schrift in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant angereichert. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des emPAI-Wertes und das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

zwischen den beiden Genotypen signifikant unterschiedlich reguliert war. Somit konnte eine kompensatorische Expression eines Kationenkanals ausgeschlossen werden.

#### 4.2.4 Der transepitheliale Widerstand (TER) ist in TRPV6-defizienten Eihüllen erhöht

Die Versorgung des murinen Embryos während der Schwangerschaft erfolgt zum größten Teil über die Plazenta, aber auch über die Eihülle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRPV6 bei der Versorgung des Embryos über die Plazenta eine wichtige Rolle spielt, jedoch ist nicht bekannt, ob Gleiches für die murine Eihülle gilt. Die Ergebnisse der Proteomanalyse zeigten signifikante Unterschiede in der Expression von Proteinen aus den Kategorien der extrazellulären Matrix und der Adhäsion zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen (4.2.3), z.B. ist die Expression des Proteins CING in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen erhöht, wodurch die Permeabilität von Ionen durch die Eihülle verändert sein könnte. Um Anhaltspunkte zu finden, ob TRPV6 in der Eihülle bei der Regulation der Permeabilität eine Rolle spielen könnte, wurde der transepitheliale Widerstand (3.2.2) von Eihüllen am Tag 13,5 der Schwangerschaft bestimmt (Abb. 29, A). *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen zeigten einen signifikant erhöhten transepithelialen Widerstand ( $254 \pm 53,11$  Ohm x cm<sup>2</sup>) im Vergleich zu WT-Eihüllen ( $116,7 \pm 20,21$  Ohm x cm<sup>2</sup>) (Abb. 29, B). Dies bedeutet, dass die Permeabilität von Ionen über die Eihülle in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren reduziert ist,

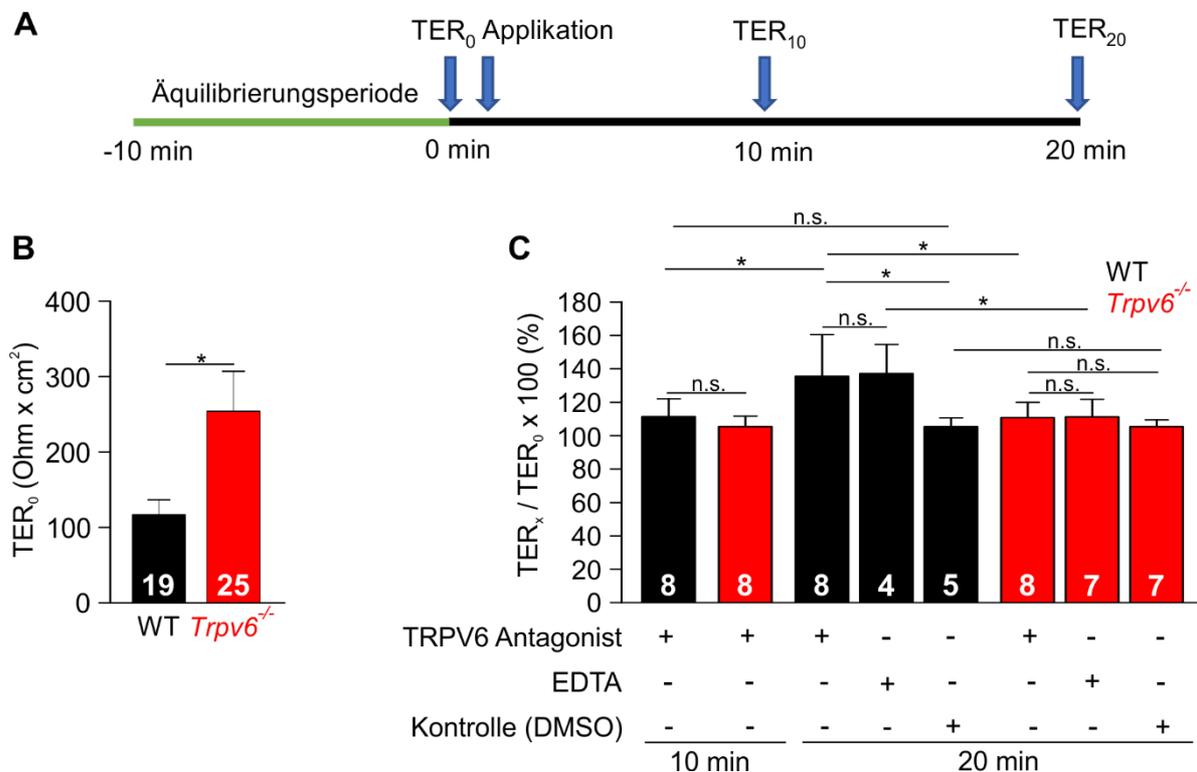


Abbildung 29: **Elektrophysiologische Messung des transepithelialen Widerstands der Eihüllen von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft mittels Ussing-Kammer Setup.** **A.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der elektrophysiologischen Experimente zur Charakterisierung der murinen Eihülle. **B.** Transepithelialer Widerstands (TER) in Ohm x cm<sup>2</sup> von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen, dargestellt als Mittelwert + SEM. **C.** Relativer Anstieg des TER (%) nach Applikation von TRPV6-Antagonist, DMSO oder EDTA-Lösung nach jeweils 10 oder 20 min Inkubationszeit mit dem Signifikanzniveau \* p < 0,05; n.s. nicht signifikant.

wodurch der Embryo möglicherweise unzureichend mit Nährstoffen versorgt wird. Im nächsten Schritt wurden die Eihüllen über 10 min bzw. 20 min mit einem TRPV6-Antagonisten inkubiert (**Abb. 29, C**). Nach 10 min kam es zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes, wobei dieser nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen war. Nach weiteren 10 min kam es bei WT-Eihüllen zu einem signifikanten Anstieg des TER. Dieser Anstieg wurde bei *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen ebenso wie in Kontrollmessungen ohne Antagonisten, nicht beobachtet (**Abb. 29, C**). Eine ähnliche Wirkung wie der TRPV6-Antagonist hatte die Abwesenheit von divalenten Kationen wie Ca<sup>2+</sup> auf den transepithelialen Widerstand. Bei WT-Eihüllen kam es zu einem signifikanten Anstieg des TER in Gegenwart des Ca<sup>2+</sup>-Chelators EDTA, der in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen ausblieb (**Abb. 29, C**). Diese Ergebnisse dokumentieren, dass TRPV6-Proteine einen direkten Einfluss auf die Ionenpermeabilität der Eihülle haben.

### 4.3 Vorkommen und Funktion von TRPV6 im Uterus am Tag E13,5

#### 4.3.1 Nachweis von TRPV6 im schwangeren Uterus

Zum Nachweis von TRPV6 im murinen Uterus wurden Uteri von WT-Tieren am Tag 13,5 der Schwangerschaft entnommen (3.2.2), lysiert (3.2.6.1) und es wurden Immunpräzipitate (3.2.6.3) mittels Western-Blot und Massenspektrometrie analysiert (**Abb. 30**). Im Western-Blot (**Abb. 30, A**) konnten Signale immunpräzipitierter Proteine bei einer Masse von 75 kDa und größer 150 kDa detektiert werden, welche auch in mTRPV6 überexprimierenden HEK-Zellen nachweisbar waren. Die Massen der nachgewiesenen Proteine könnten TRPV6-Monomeren und TRPV6-Oligomeren entsprechen. Bei der massenspektrometrischen Analyse (**Abb. 30,**

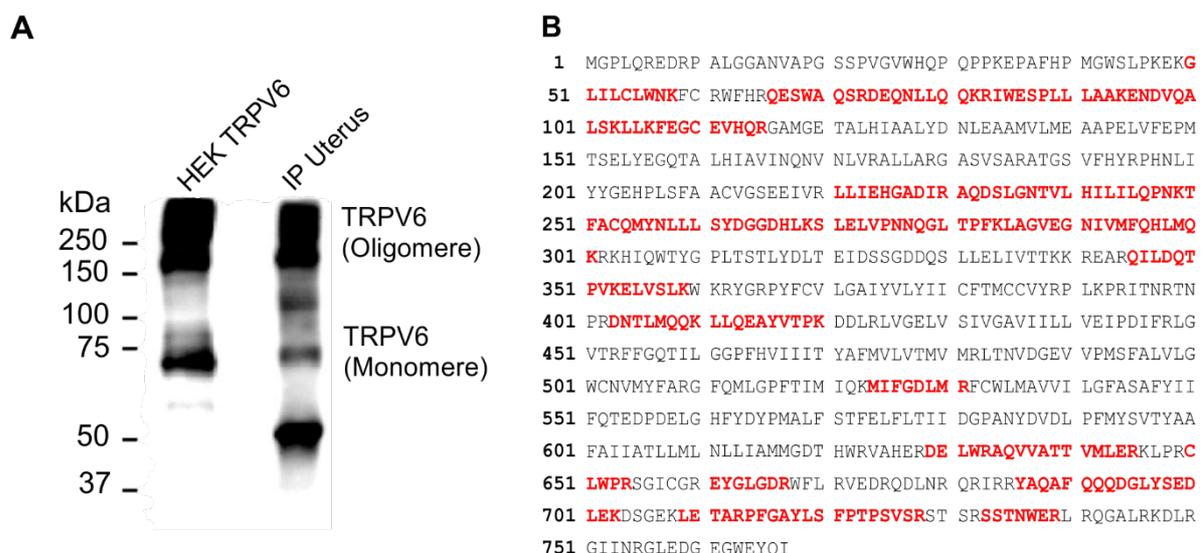


Abbildung 30: Nachweis von TRPV6 in schwangerem Uterus (E13,5) von WT-Mäusen mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.

**A.** Western-Blot für die Immunpräzipitation (IP) aus WT-Uteri mit TRPV6 transfizierten HEK-Zellen (HEK) und Immunpräzipitation aus RIPA-Lysat von WT-Uteri. **B.** Massenspektrometrischer Nachweis von TRPV6 nach Immunpräzipitation von Proteinen aus schwangerem WT-Uterus. Identifizierte Peptide sind in der Proteinsequenz von TRPV6 rot hervorgehoben.

**B)** konnten ohne IP keine tryptischen TRPV6-Peptide nachgewiesen werden. Nach IP wurden verschiedene TRPV6-Peptide detektiert, welche 33 % der TRPV6-Aminosäuresequenz abdeckten. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte somit die Expression von TRPV6 im murinen Uterus am Tag 13,5 der Schwangerschaft.

#### **4.3.2 Vergleichende Proteomanalyse von schwangeren WT- und TRPV6-defizienten Uteri**

Die Proteome von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri (E13,5) wurden vergleichend analysiert, um den Einfluss von TRPV6 auf die Expression anderer Gene zu untersuchen. Das Gewebe wurde nach der Entnahme (3.2.2) lysiert (3.2.6.1), eine Proteinbestimmung durchgeführt (3.2.6.2) und 120 µg Protein gelelektrophoretisch getrennt (3.2.6.4). Das Trenngel wurde in 4 Streifen geschnitten, aufgearbeitet (3.2.7.1) und die Proteine eines jeden Streifens wurden mittels HPLC- Gradienten über eine Zeit von 94 Minuten getrennt und massenspektrometrisch analysiert (3.2.7.2). In WT-Uteri wurden 1182 Proteine identifiziert, von diesen waren 654 in allen drei Proben nachweisbar. In *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri wurden 1314 Proteine analysiert, von denen 812 in allen drei Proben zu finden waren (**Abb. 31, A**). In WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri wurden zusammen 1445 Proteine identifiziert (**Abb. 31, B**). Davon waren 1051 Proteine in Proben beider Genotypen präsent. 131 Proteine konnten nur in WT-Uteri und 263 Proteine nur in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri detektiert werden.

Die Analyse der Proteomdaten zeigte, dass sich 1319 Proteine in ihrer Expression nicht signifikant zwischen beiden Genotypen unterschieden (**Abb. 31, C**). 108 Proteine zeigten sich in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uterus signifikant angereichert und 18 Proteine waren in WT-Uterus häufiger. Die Serinproteasen GRAC, GRAE und GRAF waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uterus verstärkt exprimiert. GRAD und GRAG konnten zwar identifiziert werden, unterschieden sich in ihrer Menge aber nicht zwischen beiden Genotypen. Die Serinprotease HTRA1 wurde nicht detektiert. Der Serinproteaseinhibitor A1AT5 war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri signifikant reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die proteolytische Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri analog zur proteolytischen Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten erhöht sein könnte. Jedoch war die Menge an Fibronectin (FINC) zwischen den beiden Genotypen nicht unterschiedlich. Ähnlich wie bei der Plazenta könnte der Grund sein, dass der Uterus aus einer Vielzahl verschiedenster Zellen besteht und Unterschiede, welche in nur einem Zelltyp vorherrschen, nicht auflösbar waren. Die Proteine Carcioembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (CEAM5) und A-kinase anchor protein 12 (AKA12) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri deutlich weniger exprimiert. CEAM5 spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion und der Tumorprogression, AKA12 ist an der Regulation der Proteinkinasen A und C beteiligt. (Oikawa et al. 1989, Ordonez et al. 2000, Taheri et al. 2000). Der Serinproteaseinhibitor A3K (SPA3K) und die Hämoglobinuntereinheit beta-2 (HBB2) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri besonders häufig nachweisbar. SPA3K inhibiert trypsinähnliche

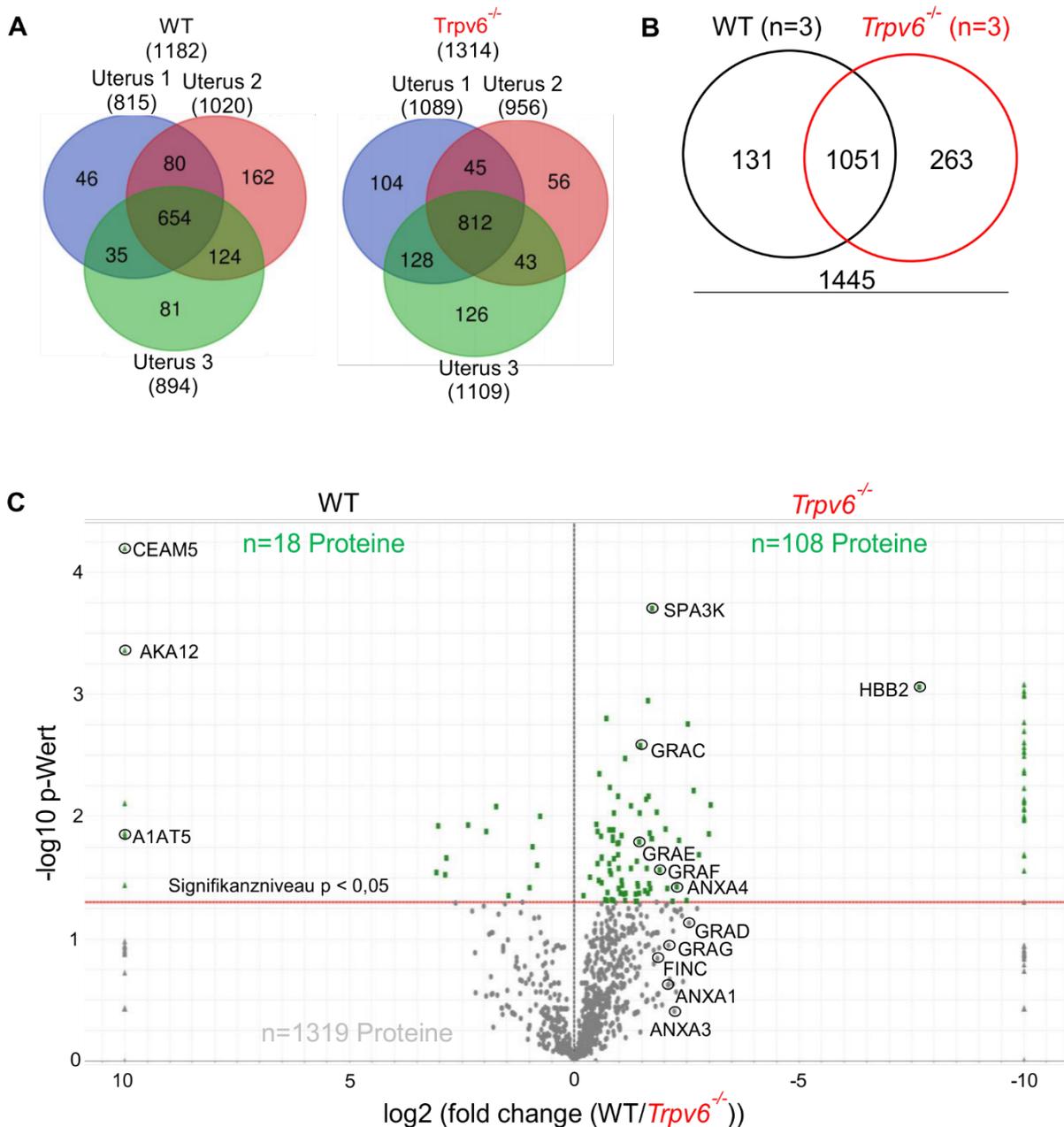


Abbildung 31: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen schwangeren Uterus am Tag 13,5 der Schwangerschaft von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in einzelnen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in je drei WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri. **C.** Vulcano-Blot aller in je drei Uteri identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

Proteasen (Takahara et al. 1982, Takahara et al. 1983) und HBB2 ist am Sauerstofftransport beteiligt. Die GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junctions, Adhäsion und Ionentransport wurden mithilfe der Software Scaffold gesondert analysiert (**Abb. 32**). 16 Proteine der extrazellulären Matrix waren verändert, davon waren 15 Proteine häufiger in WT-Uteri und ein Protein war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri häufiger. In der Kategorie Adhäsion waren zwölf Proteine zwischen beiden Genotypen verändert. Neun Proteine waren in WT-Proben signifikant erhöht und drei Proteine waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri häufiger. In den

Kategorien ECM und Adhäsion waren die typischen Vertreter dieser Gruppe wie Fibronektin oder Laminin nicht unterschiedlich exprimiert, lediglich Nidogen-1 war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri reduziert. Das Protein ANXA1 (Adhäsion) war analog zum Proteom der *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen (4.2.3) in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri signifikant erhöht. Andere Annexine wie beispielsweise ANXA1 und ANXA3 waren zwischen Uteri beider Genotypen unverändert. In der Kategorie Tight Junctions waren drei Proteine verändert, zwei Proteine waren in WT-Uteri und ein Protein war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri häufiger. Tight Junction bildende Proteine wie beispielsweise Claudine oder ZO-1 waren jedoch nicht verändert. Somit ist davon auszugehen, dass TRPV6 die Häufigkeit anderer Proteine in Tight Junctions von Uteri am Tag 13,5 der Schwangerschaft nicht beeinflusst. In der Kategorie Ionen-transport waren zehn Proteine verändert. Unter diesen Proteinen wurde kein Kationenkanal identifiziert.

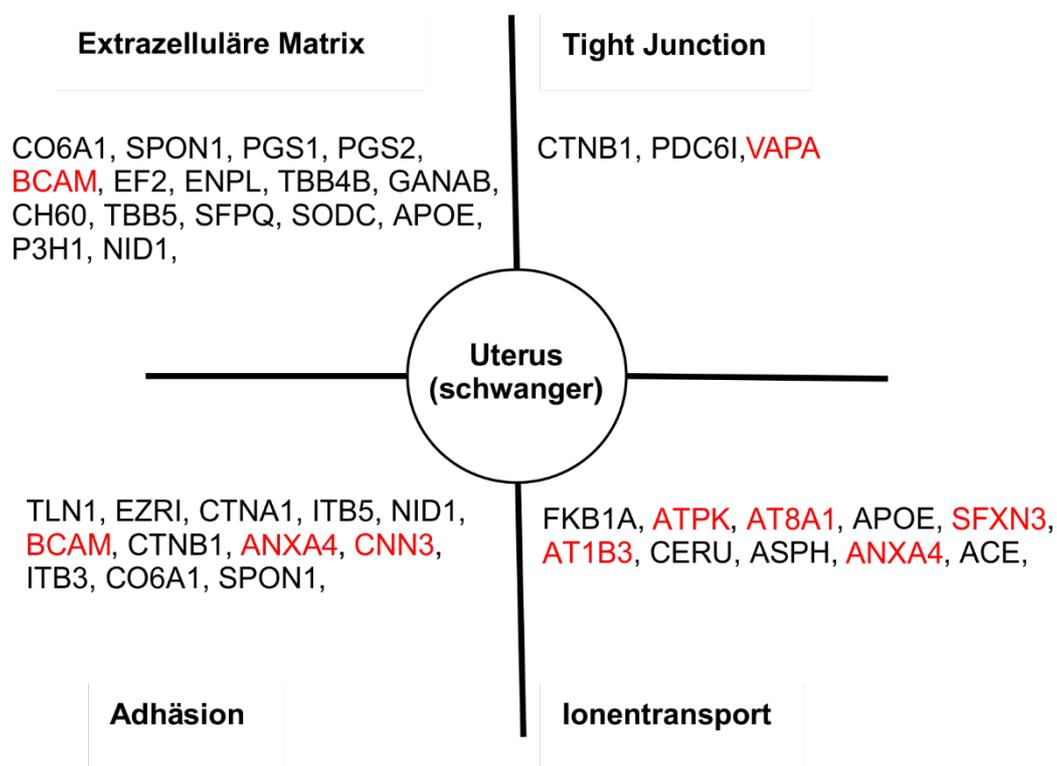


Abbildung 32: Proteine aus den GO-Kategorien (Gene Ontology Domain): Extrazelluläre Matrix (ECM), Tight Junction, Adhäsion, Ionen-transport und Hormonaktivität, die in Uteri von WT- (n=3) und *Trpv6*<sup>-/-</sup> (n=3) Mäusen am Tag 13,5 der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert werden.

Proteine (SwissProt-Kennung) in schwarzer Schrift waren in WT-Trophoblasten und Proteine in roter Schrift in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant angereichert. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des emPAI-Wertes und das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Plazenta, Trophoblasten, Eihülle und schwangerem Uterus

Ein Vergleich der Proteomanalysen von Plazenta, Trophoblasten, Eihülle und schwangerem Uterus (**Tabelle 7**) lässt erkennen, dass die Expression von Proteasen in allen untersuchten *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Geweben signifikant erhöht war. Die Serinproteaseinhibitoren (Antitrypsine) sind mit Ausnahme der Trophoblasten in allen untersuchten *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Geweben weniger stark exprimiert. Zusammengenommen führt dies, wie unter **3.2.6.6** gezeigt, zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Geweben. Konform dazu ist das ECM-Protein Fibronectin (FINC) in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen degradiert. In Plazenta und Uterus konnte diesbezüglich kein Unterschied detektiert werden, was durch eine mangelnde Auflösung der Methode in dem komplexen Gewebe erklärt werden könnte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Proteasen und die damit einhergehende Degradation von Fibronectin TRPV6-abhängig ist. Interessanterweise sind Ca<sup>2+</sup>-bindenden Annexine, welche an der Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran beteiligt sind (Raphaël et al. 2014), in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri erhöht.

**Tabelle 7: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Plazenta, Trophoblasten, Eihülle und schwangerem Uterus von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren bezüglich der Expression Proteasen, Antitrypsine, Annexin und Fibronectin.**

Proteine welche schwarz gekennzeichnet sind waren in WT-Geweben abundanter, rot gekennzeichnete Proteine waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Geweben angereichert. Zweistichproben-t-Test mit dem Signifikanzniveau  $p < 0,5$ .

= : Protein unterscheidet sich zwischen den beiden Genotypen nicht.

Gewebe	Proteasen	Proteaseinhibitoren	Fibronectin	Annexine
Plazenta	GRAF	A1AT5	=	=
Trophoblasten	GRAC, GRAF, GRAG, HTRA1, CATD	=	FINC	=
Eihülle	CATD	A1AT4, A1AT5	FINC	ANXA1
Uterus (schwanger)	GRAC, GRAE, GRAF	A1AT5	=	ANXA4

## 4.5 Einfluss der TRPV6-Expression auf die uterine Proteinexpression während des Estruszyklus der Maus

### 4.5.1 TRPV6 wird im nicht schwangeren Uterus zyklusabhängig exprimiert

Die Uteri von nicht schwangeren Mäusen wurden im Hinblick auf eine Expression von TRPV6 in Abhängigkeit vom Zyklusstadium untersucht. Uteri von WT, *Trpv6<sup>mt/mt</sup>* und *Trpv6<sup>-/-</sup>* Tieren zeigten keine offensichtliche Veränderung von Form oder Größe (**Abb. 33, A**). Je Genotyp und Zyklusstadium wurden fünf Uteri entnommen und nach Immunpräzipitation (**3.2.6.3**) mittels Western-Blot und Massenspektrometrie untersucht. Die Positivkontrolle (mTRPV6 überexprimierende HEK-Zellen) zeigte im Western-Blot starke Signale bei  $\approx 75$  kDa und größer 250 kDa (**Abb. 33, B**). Die detektierten Massen könnten TRPV6-Monomeren und TRPV6-Oligomeren entsprechen. In der Negativkontrolle (HEK-Zellen) und Uteri-Lysaten aus WT, *Trpv6<sup>mt/mt</sup>* und *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Tieren (Input Diestrus, Input Proestrus, Input Estrus, Input Metestrus) fehlten diese Signale. Im Diestrus wurden nur sehr schwache Signale detektiert. In den anderen Zyklusstadien Proestrus, Estrus und Metestrus hingegen konnten starke Signale bei 75 kDa und größer 250 kDa nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische Analyse (**Abb. 33, C**) der immunpräzipitierten Proteine zeigte keine TRPV6-spezifischen Peptide im Diestrus, im Proestrus fanden sich 13 Peptide, im Estrus 15 Peptide und im Metestrus 4 Peptide. Somit zeigen beide Untersuchungsmethoden übereinstimmend eine zyklusabhängige Expression von TRPV6, wobei TRPV6 im Diestrus nicht und im Estrus am stärksten exprimiert wird. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Uteri aus *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tieren (**Abb. 33, B**) beobachtet. Dies zeigt, dass die Punktmutation in der Pore nur zu einer funktionellen Inaktivierung des Kanals führt und keinen Einfluss auf seine Expression hat. In immunpräzipitierten Proteinen aus *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Uteri konnten zu keinem Zeitpunkt TRPV6-Proteine detektiert werden (**Abb. 33, B, C**). Dies bedeutet, dass TRPV6 in diesem Genotyp nicht oder nicht vollständig gebildet wird.

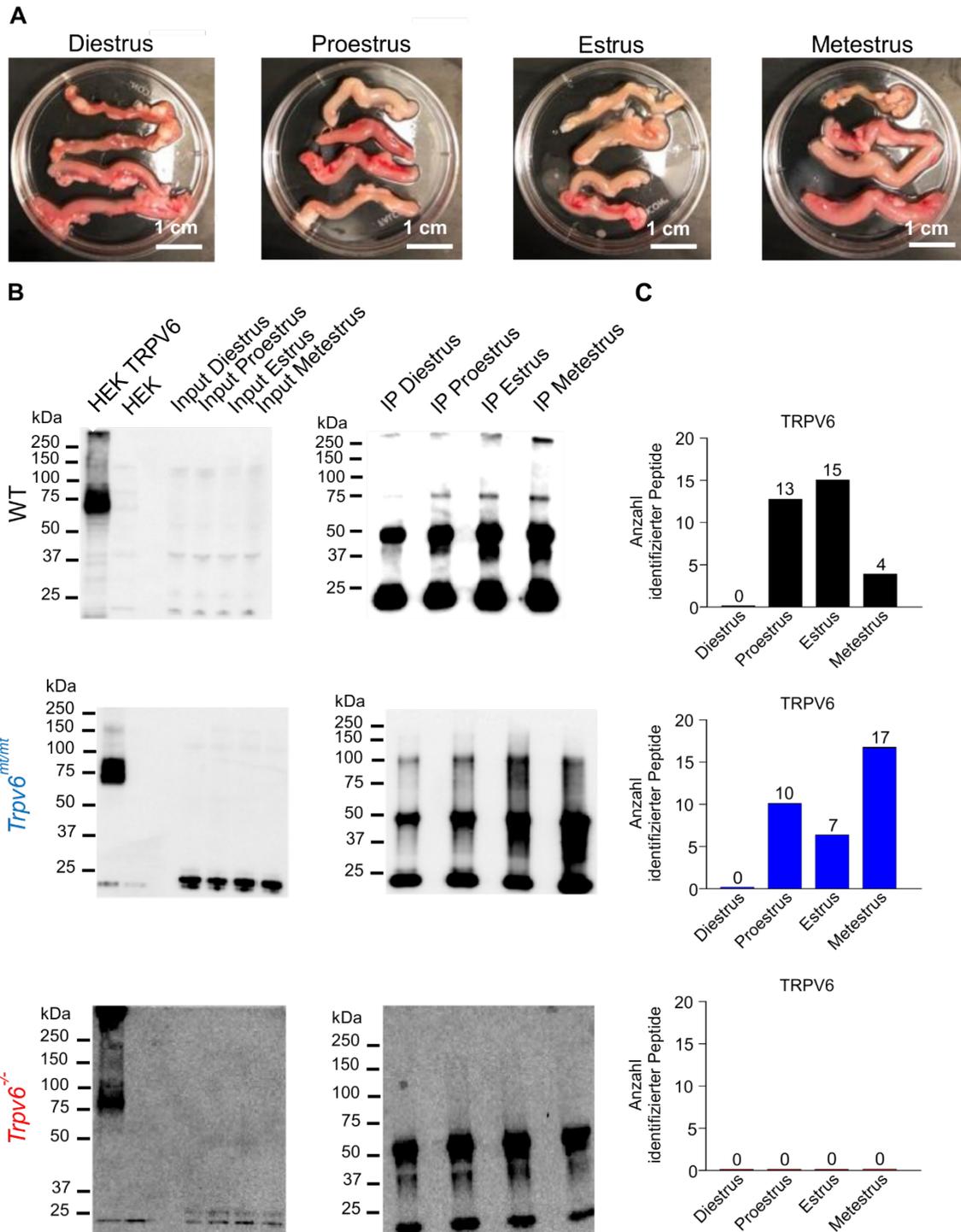


Abbildung 33: Analyse von TRPV6 in Uteri von WT-, *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*- und *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Mäusen während der Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse.

**A.** Bilder der isolierten Uteri von WT-Mäusen in den Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus. **B.** Western-Blot Analyse von Proteinlysaten aus TRPV6-transfizierten HEK-Zellen (Positivkontrolle), nicht-transfizierten HEK-Zellen (Negativkontrolle), Uteri Diestrus (Input), Uteri Proestrus (Input), Estrus (Input) und Metestrus (Input) und Western-Blot Analyse von TRPV6-Immünpräzipitaten (IP) aus Uteri aller vier Zyklusstadien. **C.** Massenspektrometrische Analyse von TRPV6 nach Immünpräzipitation aus WT, *Trpv6<sup>-/-</sup>*, *Trpv6<sup>mt/mt</sup>* Uteri der Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus.

#### 4.5.2 Vergleichende zyklusabhängige Proteomanalyse des nicht schwangeren Uterus aus WT- und TRPV6<sup>mt/mt</sup>-Tieren

Um die Frage zu klären, inwiefern die Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit des TRPV6-Proteins die Expression anderer Proteine während des murinen Estruszyklus beeinflusst, wurden die folgenden Experimente mit Geweben aus *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tieren durchgeführt. Die TRPV6-Porenmutante (*Trpv6<sup>mt/mt</sup>*) unterscheidet sich vom WT nur dadurch, dass der TRPV6-Ionenkanal aufgrund einer Punktmutation (D581A) nicht mehr für Ca<sup>2+</sup>-Ionen leitfähig ist.

Es wurde eine vergleichende Proteomanalyse der vier Zyklusstadien (Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus) zwischen WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe entnommen (3.2.2), lysiert (3.2.6.1) und die Proteinkonzentration (3.2.6.2) bestimmt. 120 µg Protein wurden gelektrophoretisch getrennt (3.2.6.4), das Gel in 8 Streifen geschnitten und aufgearbeitet (3.2.7.1). Die Proteine wurden je Streifen mithilfe eines 94 min HPLC-Gradienten getrennt und massenspektrometrisch analysiert (3.2.7.2). Die Proben der 5 gepoolten Uteri wurden je Genotyp und Zyklusstadium dreimal gemessen (technische Replikate). In der qualitativen Proteomanalyse (Abb. 34, A) konnten in WT-Uteri 1748 Proteine über alle vier Zyklusstadien hinweg identifiziert werden, davon waren 974 Proteine in jedem der vier Zyklusstadien nachweisbar. Im Diestrus wurden 1316, im Proestrus 1352, im Estrus 1289 und im Metestrus 1431 Proteine identifiziert. In *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri konnten 2158 Proteine in allen vier Zyklusstadien identifiziert werden, 1411 dieser Proteine waren in jedem Zyklusstadium nachweisbar. Im Diestrus wurden 1723, im Proestrus 1736, im Estrus 1800 und im Metestrus 1765 Proteine identifiziert. Das Protein Mucin wird zyklusabhängig exprimiert, wobei seine Expression im Estrus am höchsten und im Diestrus am niedrigsten ist (Pluta et al. 2012, Vania et al. 1993). Dieser typische Expressionsverlauf von Mucin während des Estruszyklus konnte sowohl in WT- als auch in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tieren gezeigt werden (Abb. 34, B). Dies bestätigt zum einen, dass die Bestimmung der Zyklusstadien anhand der Zellmorphologie mit der Expression des Zyklusmarkers Mucin korreliert und sowohl WT- als auch *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tiere in etwa gleich viel Mucin während der einzelnen Zyklusstadien exprimieren.

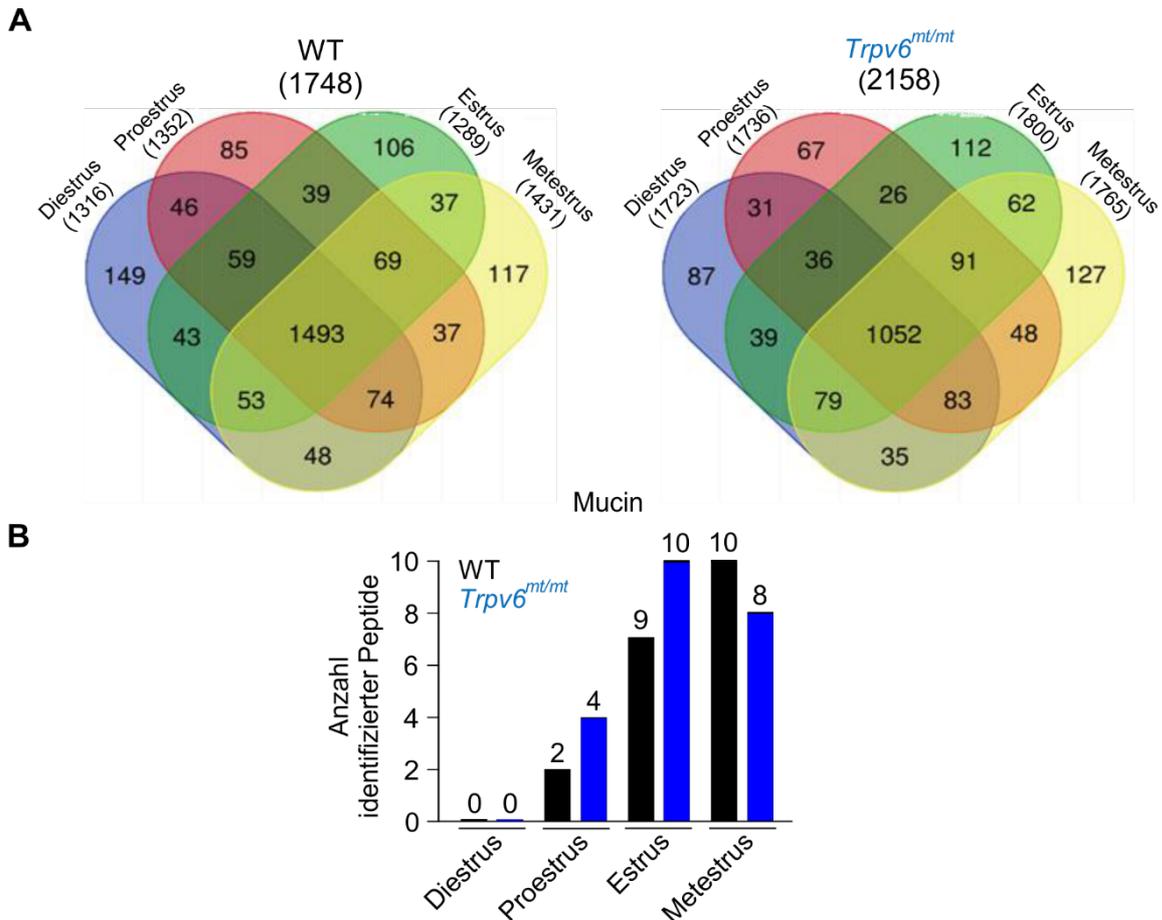


Abbildung 34: **Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus zu den verschiedenen Estruszyklusstadien (Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus) von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*- Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in Präparaten von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri zu der vier Zyklusstadien. **B.** Massenspektrometrische Analyse des Estruszyklusmarkers Mucin, dargestellt als Anzahl der identifizierten Peptide. Von jeder Probe (5 Uteri) wurden 3 technische Replikate gemessen.

#### 4.5.2.1 Diestrus

In WT-Uteri wurden während des Diestrus insgesamt 1290 Proteine identifiziert, von diesen konnten 407 in jeder der drei Messungen nachgewiesen werden. In den *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri wurden 1801 Proteine identifiziert, davon waren 862 in allen Messungen nachweisbar (**Abb. 35, A**). In WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri wurden insgesamt 2725 Proteine identifiziert (**Abb. 35, B**), von diesen Proteinen wurden 110 ausschließlich in WT-Proben und 633 ausschließlich in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Proben detektiert. 1982 Proteine waren in den Uteri beider Genotypen nachweisbar. In der semiquantitativen Proteomanalyse (**Abb. 35, B**) wurden 64 Proteine identifiziert, die in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri signifikant hochreguliert waren. In WT-Uteri waren 29 signifikant angereichert, 1982 Proteine waren zwischen beiden Genotypen nicht unterschiedlich stark exprimiert. In *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Proben waren die beiden Proteine 3-Mercaptopyruvat-Sulfotransferase (THTM) und WD repeat-containing Protein 82 (WDR82) am stärksten verändert. THTM ist an der Bildung

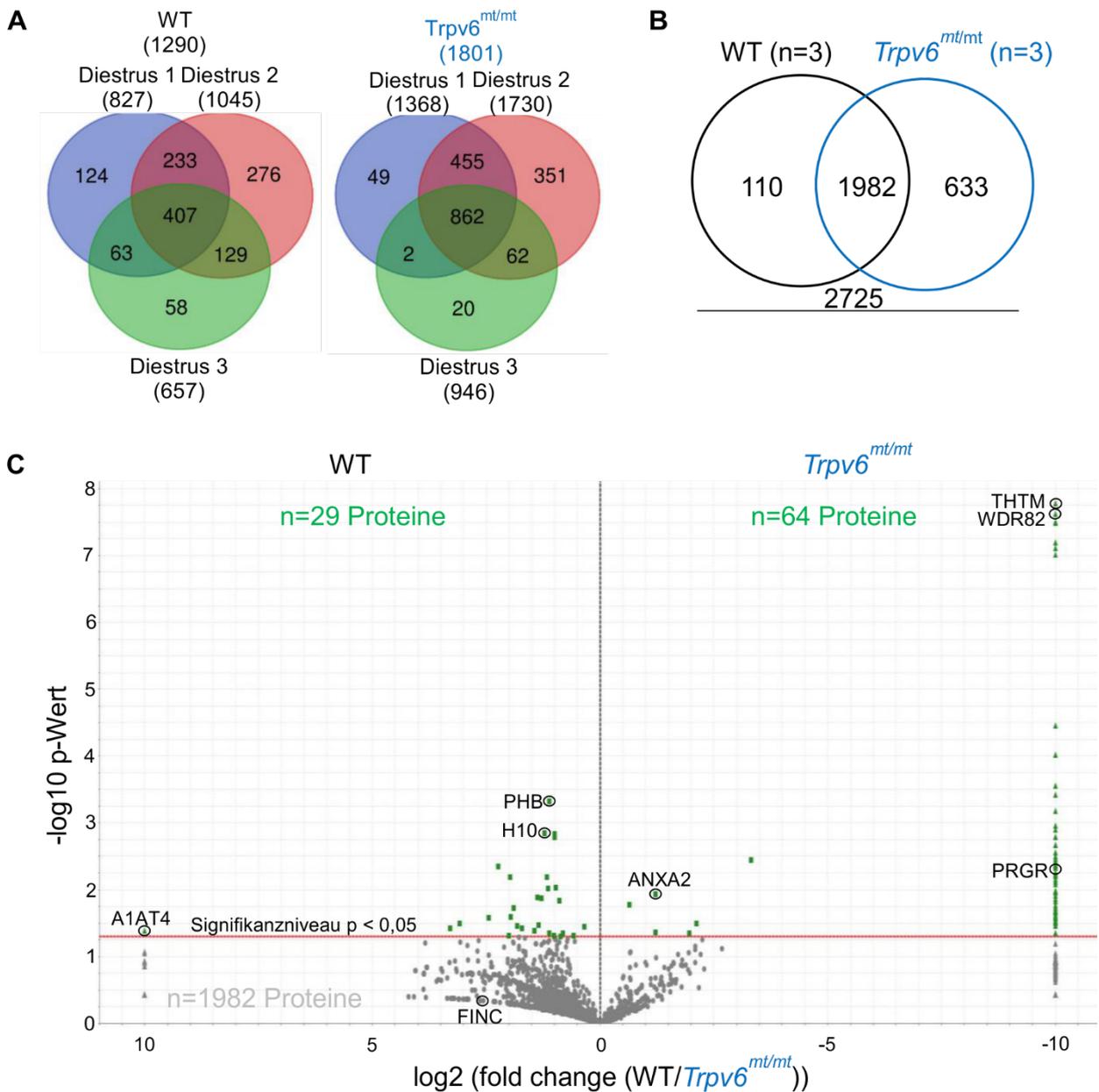


Abbildung 35: **Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Diestrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Präparaten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in den Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

von Hydrogensulfid beteiligt, detoxifiziert Cyanide und wird für die Biosynthese von Thiosulfaten benötigt (Nagahara et al. 1996, Nagahara et al. 1998, Nagahara et al. 2005). Das WDR82 ist an der Methylierung von Histonen beteiligt (Lee et al. 2008) Die Proteine Prohibitin (PHB) und Alpha-1-Antitrypsin 1-4 (A1AT4) sind in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri am stärksten herunterreguliert. PHB ist ein Transkriptionsregulator von p53 und als Chaperon wirksam (Fusaro et al. 2003, Zhang et al. 2020). A1AT4 ist ein Serinproteaseinhibitor, welcher auch in anderen *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Geweben signifikant erhöht war (4.4). Dies deutet darauf hin, dass auch im

*Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uterus (Diestrus) die proteolytische Aktivität erhöht sein könnte, jedoch wurden die Serinproteasen HTRA1 und Granzyme nicht detektiert. Andere Proteasen unterschieden sich zwischen WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri im Diestrus nicht. Die Menge an ECM-Proteinen wie z.B. Fibronectin (FN1) unterschied sich ebenfalls zwischen beiden Genotypen nicht. Annexin 2 (ANXA2) war analog zu *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Gewebe (4.4) in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri verstärkt exprimiert. Der Progesteronrezeptor (PRGR) wurde nur in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri identifiziert, dies deutet darauf hin, dass der TRPV6-Ionenstrom in die hormonelle Regulation während des Estruszyklus involviert sein könnte.

#### 4.5.2.2 Proestrus

Während des Proestrus wurden in WT-Uteri 1317 und in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri 1724 Proteine identifiziert, von diesen waren 399 bzw. 685 in allen drei Messungen nachweisbar (**Abb. 36, A**). Insgesamt wurden 2033 verschiedene Proteine identifiziert (**Abb. 36, B**). 131 Proteine kamen ausschließlich in WT- und 599 Proteine ausschließlich in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri vor. 1303 Proteine wurden in Uteri beider Genotypen nachgewiesen.

Die semiquantitative Analyse der Proteomdaten (**Abb. 36, C**) zeigte, dass 47 Proteine in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri hochreguliert sind. 1963 Proteine unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Expression zwischen den beiden Genotypen und 23 Proteine waren in WT-Proben abundanter. Die beiden Proteine Neprilysin (NEP) und Ribonucleoprotein A/B (ROAA) waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri am stärksten herunterreguliert. NEP spaltet Opioid-Peptide (Gly-Phe-Bindung) (Wisner et al. 2006) und ROAA wirkt als Transkriptionsrepressor. Die Superoxiddismutase (SODM) und Cathepsin Z (CATZ) sind in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri am stärksten hochreguliert. Durch SODM werden reaktive Sauerstoffspezies unschädlich gemacht, indem diese zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Bei CATZ handelt es sich um eine Protease (Naegler et al. 1999), Cathepsine können in das Remodelling der ECM involviert sein. Die erhöhte Expression von CATZ in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri (Proestrus) deuten auf eine erhöhte proteolytische Aktivität hin, jedoch ist der Proteaseinhibitor A1AT4 unverändert und Fibronectin unterscheidet sich ebenfalls nicht zwischen beiden Genotypen. Die Serinproteasen HTRA1 und Granzyme wurden nicht identifiziert. Die Proteine ANXA1 und 4 waren analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri hochreguliert. Das Progesteronrezeptorcompartment-1 (PGRC1) war nur in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri nachweisbar, dies deutet ebenfalls darauf hin, dass der TRPV6-Ionenstrom die hormonelle Steuerung während des Estruszyklus beeinflussen könnte.

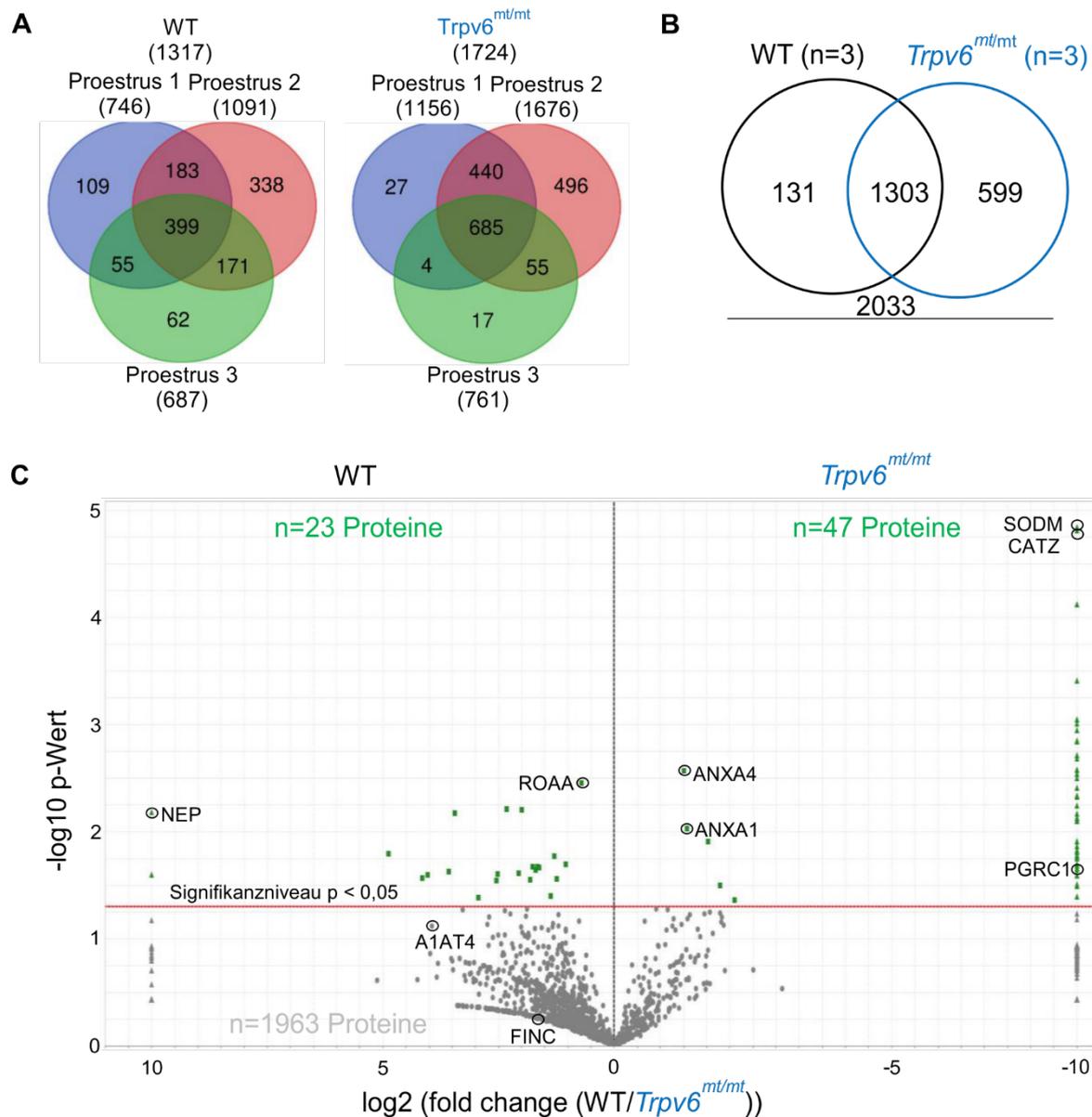


Abbildung 36: **Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Proestrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Präparaten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in den Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

#### 4.5.2.3 Estrus

In der massenspektrometrischen Analyse von Uteri während des Estrus wurden in WT-Proben 1353 und in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Proben 1737 Proteine detektiert, davon waren 404 bzw. 773 Proteine in allen drei Messungen nachweisbar (**Abb. 37, A**). Insgesamt wurden 2060 unterschiedliche Proteine nachgewiesen (**Abb. 37, B**). 1336 Proteine wurden in Uteri beider Genotypen nachgewiesen. 161 Proteine waren nur in WT- und 563 Proteine nur in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri detektierbar.

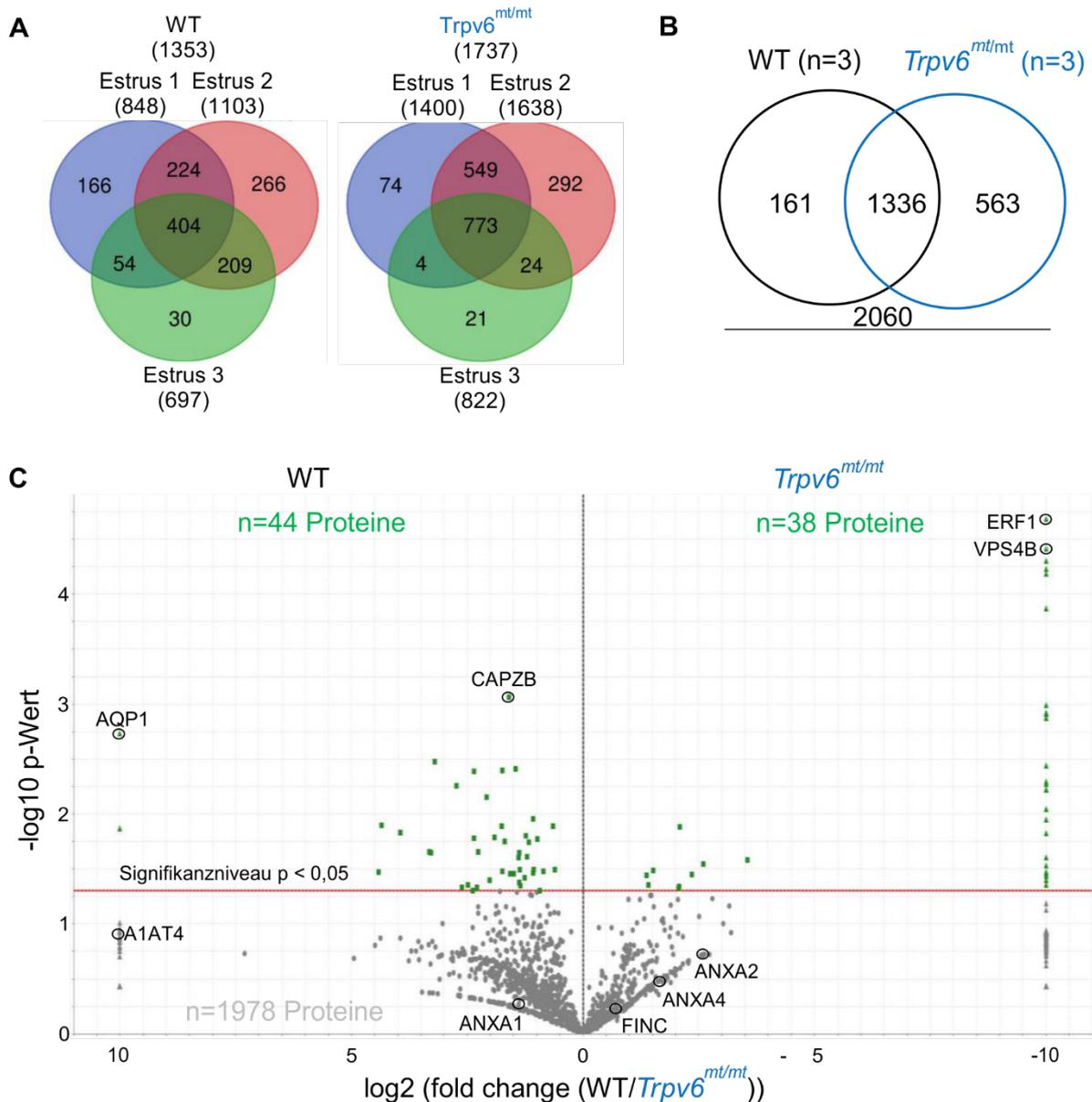


Abbildung 37: **Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Estrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Mäusen.**

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Präparaten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in den Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

Laut semiquantitativer Analyse (**Abb. 37, C**) waren 1978 Proteine in ihrer Expression nicht zwischen WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri im Estrus verändert. 38 Proteine waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri signifikant hochreguliert und 44 Proteine waren in WT-Uteri signifikant abundanter. Die beiden Proteine Aquaporin-1 (AQP1) und F-actincapping protein subunit beta (CAPZB) waren in WT-Uteri am abundantesten. AQP1 bildet H<sub>2</sub>O-spezifische Kanäle und ist an der Regulation des Zellvolumens von Epithelzellen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle beim

Flüssigkeitshaushalt (Yang et al. 2002). CAPZB dagegen ist in die Organisation des Zytoskeletts involviert (Bai et al. 2011). Die Proteine Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (ERF1) und Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B) sind in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri (Estrus) am stärksten angereichert. ERF1 spielt eine wichtige Rolle bei der Termination der Peptidsynthese (Translation) (Frolova et al. 1994) und VPS4B ist an der intrazellulären Verteilung von Proteinen beteiligt (Scheuring et al. 2001). Die Expression von Proteasen und Proteaseinhibitoren unterschied sich zwischen den beiden Genotypen nicht, somit gibt es im Estrus keinen Hinweis auf eine erhöhte proteolytische Aktivität in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri. Die Menge an Fibronektin und Annexinen unterschied sich im Estrus ebenfalls nicht zwischen WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri.

#### 4.5.2.4 Metestrus

1432 Proteine wurden in WT- und 1755 Proteine in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri während des Metestrus nachgewiesen, davon wurden 666 und 726 Proteine in allen drei Messungen nachgewiesen (**Abb. 38, A**). Insgesamt wurden 2102 Proteine detektiert (**Abb 38, B**). Davon wurden 1403 in Proben beider Genotypen identifiziert. 174 Proteine waren ausschließlich in WT- und 525 Proteine ausschließlich in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri zu finden.

In der semiquantitativen Analyse (**Abb. 38, C**) unterschieden sich 1403 Proteine nicht signifikant in ihrer Expression zwischen den beiden Genotypen. 27 Proteine waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri signifikant hoch und 74 Proteine signifikant herunterreguliert. Die Proteine Esterhydrolase (CK054) (Manjasetty et al. 2006) und Carbonylreduktase (CBR3) (Miura et al. 2008) waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri am stärksten hochreguliert. In WT-Uteri waren die beiden Proteine Serinproteaseinhibitor A1AT4 und Glucose-6-phosphatisomerase (G6PI), die in die Glykolyse und Glukoneogenese involviert ist (Bueker et al. 1981, Pretsch et al. 1990, Merkle et al. 1993) am abundantesten. Diese Ergebnisse zeigen, dass TRPV6 in die Regulation verschiedener enzymatischer Prozesse während des Metestrus involviert sein könnte. Granzyme und HTRA1 konnten nicht nachgewiesen werden. Andere Proteasen und Fibronektin unterschieden sich nicht zwischen den beiden Genotypen, ebenso waren Annexine (ANXA1, ANXA2, ANXA4) nicht verändert.

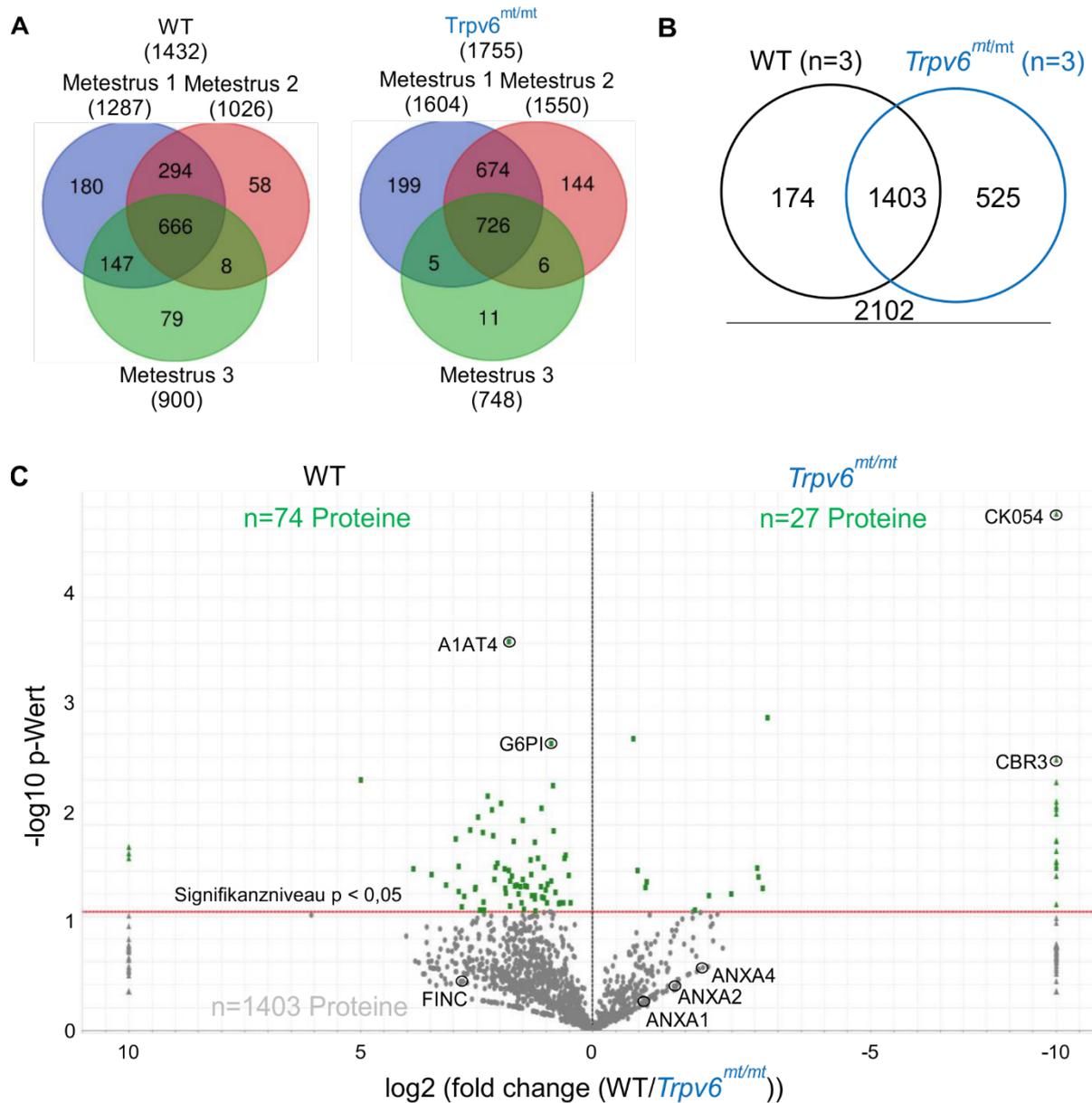


Abbildung 38: Massenspektrometrische Proteomanalyse des murinen Uterus im Zyklusstadium Metestrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Mäusen.

**A.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine (Anzahl in Klammern) in WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Präparaten. **B.** Venn-Diagramm identifizierter Proteine in den Präparaten. **C.** Vulcano-Blot aller identifizierten Proteine. Proteine unveränderter Menge unterhalb des Signifikanzniveaus (rote Linie) sind grau, andere grün gekennzeichnet. Die Namen einzelner Proteine sind als SwissProt-Kennung angegeben.

#### 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Proteomanalysen von Uteri aus allen vier Zyklusstadien

Die Serinproteasen HTRA1 und Granzyme konnten im Uterus in keinem der vier Zyklusstadien identifiziert werden. Jedoch war die Protease CATZ im Proestrus in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri erhöht und der Serinproteaseinhibitor A1AT4 war in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri während Diestrus und Metestrus reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die proteolytische Aktivität in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri während des Estruszyklus erhöht sein könnte. Die Expression der typischen extrazellulären Matrixproteine wie z.B. Fibronectin war in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri unverändert. Annexine waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri während dem Diestrus (ANXA2) und Proestrus (ANXA1, ANXA4) erhöht. Es konnten keine charakteristischen Unterschiede identifiziert werden, welche in jedem der vier Zyklusstadien vorhanden waren ebenso konnte kein Unterschied zwischen Zyklusstadien in denen TRPV6 exprimiert wird (Proestrus, Estrus, Metestrus) und dem Diestrus, in dem TRPV6 kaum exprimiert wird, identifiziert werden (4.5.1). Die Ergebnisse zeigen, dass in WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Tieren alle vier Zyklusstadien vorhanden sind, aber die Expression der Proteine A1AT4, CATZ und verschiedene Annexine von der Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit des TRPV6-Ionenkanals beeinflusst wird, wodurch die proteolytische Aktivität in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri während des Estruszyklus erhöht ist.

Tabelle 8: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Proteomanalyse von Uteri der vier Zyklusstadien Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus von WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Gewebe bezüglich der Expression von Proteasen, Antitrypsinen, Annexinen und Fibronectin.

Proteine welche schwarz gekennzeichnet sind waren in WT-Gewebe abundanter, blau gekennzeichnete Proteine waren in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Gewebe angereichert. Zweistichproben-t-Test mit dem Signifikanzniveau  $p < 0,5$ .

= : Proteinmenge unterscheidet sich zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant

Gewebe	Proteasen	Proteaseinhibitoren	Fibronectin	Annexine
Uterus (Diestrus)	=	A1AT4	=	ANXA2
Uterus (Proestrus)	CATZ	=	=	ANXA1, ANXA4
Uterus (Estrus)	=	=	=	=
Uterus (Metestrus)	=	A1AT4	=	=

## 5 Diskussion

### 5.1 TRPV6 in der murinen Plazenta und Trophoblasten

#### 5.1.1 Einfluss des TRPV6 Proteins auf Morphologie, Calciumgehalt und Wachstum von Trophoblasten

Während der Schwangerschaft erfolgt der Nährstoff- und Mineralientransport von der Mutter hin zum Fötus über die Plazenta. Ab dem letzten Drittel der Schwangerschaft steigt der Calciumbedarf des Embryos aufgrund seiner Knochenmineralisierung stark an. Die Expression von *Trpv6* nimmt parallel dazu bis zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich zu (Lee et al. 1992). TRPV6-defiziente Embryonen aus TRPV6-defizienten Müttern zeigen ein verzögertes Wachstum und eine mangelhafte Knochencalzifizierung. Beim Menschen führen Mutationen im *TRPV6*-Gen zu einem ähnlichen Phänotyp, auch hier ist die Mineralisierung der Knochen unzureichend (Suzuki et al. 2018, Mason et al. 2020, Suzuki et al. 2020). Die skelettalen Fehlbildungen sind Folge einer verminderten plazentaren Calciumversorgung des Fötus. Aufgrund der plazentaren Expression und der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität des TRPV6-Ionenkanals wird vermutet, dass dieser am transepithelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die fetomaternalen Blutbarriere beteiligt ist.

In der Literatur wurde die Expression des TRPV6-Proteins in fetalen und maternalen Teilen der Plazenta bereits beschrieben (Fecher-Trost et al. 2013, Fecher-Trost et al. 2019). Die Expression von TRPV6 in Plazenta (**4.1.1.1**) und Trophoblasten (**4.1.2.2**) am Tag E13,5 der Schwangerschaft konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels Westernblot und massenspektrometrischer Analyse bestätigt werden. TRPV6 war jedoch erst nach Anreicherung mittels Immunpräzipitation nachweisbar. Diese geringe Expression von TRPV6 könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass bislang kein TRPV6-Strom in nativen Geweben mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden nachgewiesen werden konnte (Nett et al. 2021). Eine erhöhte Expression von TRPV6 führt möglicherweise zu zytotoxischen Effekten, sowie dies bereits in TRPV6-überexprimierenden HEK293-Zellen gezeigt werden konnte (Cao et al. 2013, Peng et al. 2017, Singh et al. 2018, Stewart 2020). Trophoblasten aus Plazenten von *Trpv6-IC/eRosa- $\tau$ GFP* Mäusen zeigten zum größten Teil *Trpv6*-positive Signale (**4.1.2.2**). Dies bedeutet, dass die Mehrheit der Trophoblasten *Trpv6* exprimiert, es aber auch Trophoblastensubtypen gibt, welche *Trpv6* nicht exprimieren. Möglicherweise steuert TRPV6 spezifische Funktionen einzelner Trophoblasten.

Die morphometrische Analyse von TRPV6-defizienten Plazenten zeigte strukturelle Veränderungen von Labyrinthzone und Chorionplatte (**4.1.1.2**). Die Oberfläche der Labyrinthzone, welche von Synzytiotrophoblasten gebildet wird, war in TRPV6-defizienten Mäusen signifikant kleiner. Über sie läuft der Stofftransport von der Mutter zum Fötus. Es wäre also möglich, dass diese verringerte Oberfläche zu einem reduzierten Stoffaustausch führt, womit die Unterversorgung von Embryonen aus TRPV6-defizienten Müttern erklärt werden könnte.

TRPV6-defiziente Trophoblasten nehmen in Kultur weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf, nachdem sie zuvor in  $\text{Ca}^{2+}$  freiem Medium inkubiert wurden (Fecher-Trost et al. 2019). Mithilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging mittels Fura-2 konnte in dieser Arbeit eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme von TRPV6-defizienten Trophoblasten bestätigt werden, so zeigten diese nach 48 h in Kultur eine reduzierte basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (4.1.2.6). Diese reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme könnte zu einem verringerten transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die fetomaternalen Blutbarriere führen und die unzureichende Knochencalzifizierung in Embryonen von TRPV6-defizienten Mäusen und Menschen erklären.

Die Untersuchung des Wachstums primärer Trophoblasten über 7 Tage zeigte hinsichtlich der Zellmorphologie keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Tieren. Jedoch vernetzen sich TRPV6-defiziente Trophoblasten ab Tag 3 in Kultur sichtbar schlechter und es sind mehr isolierte Zellen vorhanden, welche sich trotz räumlicher Nähe zu anderen Zellen nicht vernetzen (4.1.2.3). Die gestörte Vernetzung könnte die Ursache für die morphologische Veränderung (reduzierte Oberfläche) in der Labyrinthzone von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten sein. Bei der Kultivierung der Trophoblasten unter reduzierten Calciumbedingungen wuchsen die TRPV6-defizienten Trophoblasten deutlich besser (4.1.2.3). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass diese aufgrund ihrer per se reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bereits an reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen angepasst sind.

Einige Trophoblasten Subtypen wie spiralarterienassoziierte Trophoblastenriesenzellen (SpATGC) sind in der Lage zu migrieren. In dem Migrationstest konnten keine Unterschiede zwischen WT- und TRPV6-defizienten Trophoblasten detektiert werden, was zeigt, dass die Migration von Trophoblasten unabhängig von TRPV6 ist.

Die Fläche der Chorionplatte ist in TRPV6-defizienten Plazenten am Tag E13,5 reduziert (4.1.1.2). Da ihre Größe mit der Ausbreitung der plazentaren Blutgefäße korreliert (Gordon et al. 2007), deutet eine vergrößerte Chorionplatte auf eine verstärkte Vaskularisierung in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten hin. Dies könnte eine kompensatorisch, aber funktionell unzureichende Reaktion auf die reduzierte Transportoberfläche der Labyrinthzone darstellen. Inwiefern die Vaskularisierung tatsächlich verändert ist, soll zukünftig durch Immunfärbung von Gefäßendothelmarkern wie dem *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM) untersucht werden.

### 5.1.2 TRPV6 steuert die proteolytische Aktivität von Trophoblasten

Um die molekularen Mechanismen, auf denen die morphologischen Veränderungen der TRPV6-defizienten Plazenten beruhen, genauer zu untersuchen, wurde eine vergleichende massenspektrometrische Proteomanalyse von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten (E13,5) durchgeführt. Es wurden 1778 Proteine identifiziert, von denen sich 24 signifikant in ihrer Menge unterschieden (4.1.1.3). Das Oberflächenglykoprotein CEAM5 (carcioembryonic

antigen-related adhesion molecule 5) war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten angereichert. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion (Oikawa et al. 1989) und könnte somit ein Grund für die veränderte Struktur der Labyrinthzone in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten sein. Die Serinprotease Granzym F war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten signifikant stärker und der Serinproteaseinhibitor A1AT5 weniger stark exprimiert. Dies deutet auf eine erhöhte proteolytische Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten hin, welche in einem Fibronectin-Hydrolyse-Assay bestätigt werden konnte (**4.1.1.4**). Das zeigt, dass TRPV6 in die Regulation der proteolytischen Aktivität in plazentarem Gewebe involviert ist.

Um einen tieferen Einblick in das Proteom der Labyrinthzone zu bekommen, wurden WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten vergleichend massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden 2824 Proteine detektiert, von denen 474 unterschiedlich stark exprimiert waren (**4.1.2.8**). In den Trophoblasten wurden aufgrund einer aufwendigeren Probenvorbereitung vergleichsweise mehr Proteine identifiziert als in den Plazentaprobe. Die Anzahl der analysierten Proteine ist als sehr gut zu bewerten, so wurden gerade einmal 1557 Proteinidentifikationen mittels Massenspektrometrie für die humanen Trophoblastenmodellzelle (BEWO) beschrieben (Szklańska et al. 2017). Die Serinproteasen Granzym C, F, G und HTRA1 (*High-temperature requirement A serine protease 1*) waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten vermehrt und das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin (FN1) vermindert (**4.1.2.8**). Es wurden fünf verschiedene Granzymisoformen (A, B, H, K und M) im Menschen und elf in der Maus beschrieben (Grossman et al. 2003). Die am besten untersuchten Isoformen sind Granzym A und B, diese werden hauptsächlich von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen zusammen mit dem porenbildenden Protein Perforin exprimiert und sekretiert. Die Granzyme gelangen durch die Perforinporen in die Zielzelle und lösen dort die Apoptose aus (Afonina et al. 2010).

Die beiden Granzyme A und B wurden im Trophoblastenproteom nicht identifiziert und die genannten Granzymisoformen zeigten keinen Einfluss auf die Anzahl von apoptotischen und nekrotischen Trophoblasten in Kultur (**4.1.2.6**). Eine spezifische Funktion der Granzyme C, F und G während der Schwangerschaft ist bislang nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass Trophoblastensubtypen Proteasen wie Matrix-Metalloproteasen und Cathepsine exprimieren und sekretieren, wodurch unter anderem die Implantation und der Umbau der extrazellulären Matrix reguliert werden (Hu and Cross 2010). Auch eine Expression von Granzymen konnte bereits gezeigt werden (Masuzaki et al. 1997). Nach Behandlung mit Leptin, einem Proteohormon, welches hauptsächlich in Adipozyten, in geringen Mengen aber auch in der Plazenta gebildet wird und in die Regulation des Lipidstoffwechsels involviert ist (Masuzaki et al. 1997), steigt die Expression der Granzyme D, E, F und G in Trophoblastenriesenzellen (Schulz et al. 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Granzym D, E, F und G am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sein könnten.

Neben den Granzymen war auch die Serinprotease HTRA1 in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten angereichert. Diese ist selbst am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt und kann indirekt über Fragmente von extrazellulären Matrixproteinen die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen regulieren (Li et al. 2018). Schwangere *Htra1*-defiziente Mäuse zeigen unterentwickelte Embryonen, kleinere Plazenten, eine reduzierte Dicke der Verbindungszone, eine veränderte Vaskularisierung der Labyrinthzone und eine Reduktion der Anzahl von Spongio- und Glykogentrophoblasten (Hasan et al. 2015). In diesen Mäusen ist zwar die Proteaseaktivität im Unterschied zu TRPV6-defizienten Tieren verringert, jedoch zeigt dies, dass eine veränderte proteolytische Aktivität zu einer veränderten Morphologie der Plazenta und damit zur Unterentwicklung des Embryos führen kann. Beim Menschen konnte im Blutserum von Patientinnen mit Präeklampsie eine erhöhte Konzentration von HTRA1 nachgewiesen werden. Auch wenn der Mechanismus bisher nicht verstanden ist, scheint die Aktivität der HTRA1-Protease für eine normale Funktion der Plazenta wichtig zu sein (Inagaki et al. 2012, Marzioni et al. 2012, Zong et al. 2013). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss der Serinproteasenaktivität auf die Funktion der Plazenta ist der spezifische Kunitz-Typ Serinproteaseinhibitor SPINT1 (Kawaguchi et al. 1997, Shimomura et al. 1997). Schwangere SPINT1-defiziente Mäuse, die aufgrund des fehlenden Proteaseinhibitors eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweisen, zeigen eine gestörte Vaskularisierung der Plazenta, eine kleinere Labyrinthzone und die Embryonen sterben in der Mitte der Schwangerschaft (Tanaka et al. 2005, Fan et al. 2007, Szabo et al. 2007).

Zu den gemeinsamen Substraten von Granzymen und HTRA1 gehören unter anderem das Protein Fibronectin (Buzza et al. 2005), welches im Proteom von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten gegenläufig zu den Proteasen reduziert ist (**4.1.2.8**). Die Minderung von Fibronectin konnte nach Immunfärbung von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten am Tag 3 in Kultur bestätigt werden (**4.1.2.8**). Bei Fibronectin handelt es sich um Adapterprotein, das Integrine der Plasmamembran mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagene und Proteoglykane verankert (Sasaki and Hidaka 1982, Ruoslahti 1988, Schultz and Armant 1995). Bindet Fibronectin an den Integrinrezeptor des Trophoektoderms der murinen Blastozyste, so kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Trophoblastenvorläuferzellen und zu einer verstärkten Adhäsion der Blastozyste (Wang and Armant 2002). Somit wäre denkbar, dass die erhöhte Expression von Serinproteasen in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten Fibronectin degradieren, wodurch die Struktur der extrazellulären Matrix verändert und die Zell-Zell-Adhäsion gestört wird. Dies wiederum könnte zu einer reduzierten Oberfläche der fetomaternalen Blutbarriere in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten führen. Die erhöhte proteolytische Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten gegenüber Fibronectin konnte mithilfe des Fibronectin-Hydrolyse-Assays bestätigt werden. Die Proteomanalyse legt nahe, dass diese erhöhte Aktivität auf die verstärkte Expression von Serinproteasen in Trophoblasten zurückzuführen ist.

Analog zu Fibronectin, war auch das fibronectinähnliche Protein *Fibronectin type-3 domain containing protein 3 A* (FND3A, *Fndc3a*) in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant reduziert. Es ist ebenfalls Bestandteil der extrazellulären Matrix. FND3A-defiziente Zebrafische zeigen eine veränderte extrazelluläre Matrix, welche zu einer fehlerhaften Entwicklung bzw. Regenerataion der Flossen führt (Liedtke et al. 2019). Bei Mäusen führt ein nicht funktionelles *Fndc3a*-Gen aufgrund einer gestörten Zell-Zell-Adhäsion von Spermatischen und Sertolizellen, zur Sterilität (Obholz et al. 2006). Die reduzierte Menge von FND3A in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten könnte also zu einer gestörten Zell-Zell-Adhäsion beitragen.

Ein anderer Grund für den proteolytischen Abbau von Fibronectin in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten könnte die reduzierte basale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sein. Möglicherweise werden Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transkriptionsfaktoren in Abwesenheit von TRPV6 unter verminderter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verstärkt aktiviert (Savignac et al. 2007, Meško et al. 2020), welche die Expression von Proteasen steuern. Die Sekretion und die Aktivität von Granzymen sind ebenfalls Ca<sup>2+</sup>-abhängig (Velotti et al. 1992). Schließlich kann die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen Proteine gegen proteolytische Degradation schützen, z.B. wird die Autolyse durch Trypsin-like Serinproteasen durch Ca<sup>2+</sup> inhibiert (Papaleo et al. 2005). Da Fibronectin in der Lage ist Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu binden (Amphlett and Hrinca 1983), welche die Proteinfaltung stabilisieren können (Milles et al. 2018), könnte eine Reduktion der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu einer Destabilisierung des Proteins und damit zu einem vermehrten Abbau führen. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass Fibronectin im Fibronectin-Hydrolyse-Assay bei annähernd gleicher Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Proben beider Genotypen nach Zugabe des Puffers in Lysaten von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten trotzdem stärker degradiert wird (**4.1.1.4**).

Das extrazelluläre Matrix Adapterproteine Laminin 5 (LAMA5) ist ebenfalls in TRPV6-defizienten Trophoblasten reduziert (**4.1.2.8**). Da Laminin auch ein potentiell Substrat von Granzymen ist (Buzza et al. 2005), wird dieses vermutlich ebenso wie Fibronectin in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten degradiert. Laminin selbst hat keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion, beeinflusst jedoch die Vaskularisierung der Plazenta. LAMA5-defiziente Mäuse zeigen eine verringerte Vaskularisierung der Plazenta (Miner et al. 1998). Obwohl die Chorionplatte und damit die Vaskularisierung der Palzenta in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Plazenten vergrößert ist, könnte die veränderte Expression von LAMA5 die Ausbildung dieser Strukturen beeinflussen.

Im Gegensatz zu Fibronectin und Laminin sind die Adapterproteine der extrazellulären Matrix Nidogen-1 und Nidogen-2 in TRPV6-defizienten Trophoblasten angereichert (**4.1.2.8**). Nidogen-1 und -2 sind analog zu Fibronectin an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, auch sie können beispielsweise die Adhäsion der murinen Blastozyste an Oberflächen verstärken (Wang and Armant 2002). Ihre verstärkte Expression in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten könnte somit eine Kompensation des Fibronectinmangels darstellen.

Cathepsin D (CATD) war als einzige weitere Protease in Trophoblasten unterschiedlich stark exprimiert (**Tabelle 7**). Sie war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten signifikant angereichert. Cathepsin D wird von Trophoblastenriesenzellen exprimiert und sekretiert und spielt bei der Invasion der Blastozyste eine Rolle (Simmons et al. 2007). Darüberhinaus ist CATD in der Lage Prolaktine zu spalten und dadurch in ihre aktive Form zu überführen. Sie ist somit an der hormonellen Regulation der Schwangerschaft beteiligt (Clapp et al. 2006, Clapp et al. 2006, Piwnica et al. 2006, Hilfiker-Kleiner et al. 2007). Die signifikant geringere Menge des Prolaktins PR8A8 in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten könnte somit in der verminderten CATD Expression begründet sein, da die Proform möglicherweise nicht vollständig in die aktive Form PR8A8 überführt wird. In der Maus sind 23 verschiedene Prolaktinisoformen bekannt, beim Menschen gibt es nur eine einzige (Simmons et al. 2008). Prolaktine werden während der Schwangerschaft gebildet und bereiten unter anderem den Körper der Mutter auf die Versorgung des Kindes vor indem sie die Milchbildung (Laktation) stimulieren (Soares 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass TRPV6 somit auch indirekt in die hormonelle Regulation während der Schwangerschaft involviert sein könnte.

Eine weitere Erklärung für die reduzierte Zell-Zell-Adhäsion von *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten könnte schließlich die verringerte Expression von Cadherin-5 (CADH5) sein. CADH5 ist ein Ca<sup>2+</sup>-bindendes transmembräres Glykoprotein (Gooding et al. 2004). Die Interaktion von CADH5 mit benachbarten Zellen führt zur Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion durch Ausbildung von *Tight Junctions* (Halbleib and Nelson 2006). Als Bestandteil des *Tight Junction*-Proteinkomplexes ist CADH5 an der Regulation der parazellulären Permeabilität von Epithelen beteiligt (Gavard 2014). Somit könnte die verringerte Menge von CADH5 in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Trophoblasten ebenfalls ein Grund für den reduzierten Stofftransport in TRPV6-defizienten Plazenten sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass TRPV6 die Struktur der extrazellulären Matrix in der plazentaren Labyrinthzone über Proteasen reguliert. Darüberhinaus ist TRPV6 für die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in Trophoblasten verantwortlich und somit wahrscheinlich am transzellulären Ca<sup>2+</sup>-Transport über die fetomaternale Blutbarriere beteiligt.

## **5.2 Rolle von TRPV6 in der murinen Eihülle**

Neben der Plazenta ist die murine Eihülle ebenfalls an der Versorgung des Embryos mit Nährstoffen beteiligt. Die Expression von *Trpv6*-Transkripten und TRPV6-Proteinen in der Eihülle wurde bereits beschrieben (Suzuki et al. 2008, Fecher-Trost et al. 2019). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels Western-Blot und massenspektrometrischer Analyse in Eihüllen am Tag 13,5 der Schwangerschaft bestätigt werden. Analog zu Plazenta und Trophoblasten war TRPV6 nur nach Anreicherung mittels Immunpräzipitation nachweisbar (**4.2.1**). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von TRPV6 in Eihüllen ebenfalls gering

ist. Auch Eihüllen aus *Trpv6-IC/eR26-tGFP*-Mäusen am Tag E13,5 zeigten *Trpv6*-positive Signale über die gesamte Fläche. Dies deutet darauf hin, dass *Trpv6* vermutlich in der gesamten Eihülle exprimiert wird.

TRPV6 war auch in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Eihüllen nachweisbar. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass modifizierte TRPV6-Proteine in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Gewebe vollständig exprimiert wird. In *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen dagegen konnte kein TRPV6 Protein nachgewiesen werden. Vermutlich wird das Protein aufgrund der Deletion der Exons 13-15 nicht gebildet, oder das verkürzte Protein wird als fehlerhaft erkannt und abgebaut.

Bei der morphologischen Analyse von *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen waren keine Veränderungen bezüglich Vaskularisierung und Dicke zu erkennen, lediglich ihr Umfang war reduziert (**4.2.2**). Da bekannt ist, dass Eihülle und Uterus unter anderem durch das Wachstum des Embryos vergrößert werden, ist der verringerte Umfang vermutlich auf die kleineren Embryonen in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Tieren zurückzuführen (Fecher-Trost et al. 2019).

Bei der massenspektrometrischen Proteomanalyse wurden 1744 Proteine identifiziert, von denen 224 unterschiedlich stark im Vergleich zwischen WT- und *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihülle exprimiert sind (**4.2.3**). Die Protease Cathepsin D ist in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen signifikant angereichert, sie wird durch Trophoblastenriesenzellen exprimiert und ist am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Simmons et al. 2007, Screen et al. 2008). Ein mögliches Substrat ist das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin, welches in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen signifikant reduziert ist. Vermutlich wird Fibronectin durch die erhöhte Expression von CATD in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen stärker degradiert als in WT-Gewebe. Darüberhinaus sind die Proteaseinhibitoren A1AT4 und A1AT5 in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen weniger stark exprimiert, was ebenfalls zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität beitragen kann. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen ähnlichen Mechanismus wie in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Trophoblasten, lediglich die Proteasen unterscheiden sich (**4.2.3**).

Annexin 1 (ANXA1) ist in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen angereichert, es handelt sich dabei um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, welches in der Lage ist, hexamere Komplexe zu bilden (van de Graaf et al. 2003, McNeil et al. 2006). Diese sind an der Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran beteiligt (Raphaël et al. 2014). Es wäre also denkbar, dass ANXA1 aufgrund des fehlenden TRPV6-Proteins in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen verstärkt exprimiert wird. Möglicherweise fungiert der TRPV6-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als Feedback-Mechanismus, bleibt dieser aus, könnte es zu einer Überexpression von ANXA1 kommen.

Der transepitheliale Widerstand (TER) war in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen signifikant erhöht (**4.2.4**). Der TER beschreibt den elektrischen Widerstand eines Epithels und ist somit ein Maß für die transzelluläre und parazelluläre Permeabilität von Ionen. Eine erhöhter TER bedeutet somit, dass die Permeabilität für Ionen in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen reduziert ist. Dies könnte zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Unterversorgung von Embryonen in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Müttern beitragen. Die veränderte Permeabilität könnte durch die erhöhte Expression von Cingulin (CING) in *Trpv6<sup>-/-</sup>*-Eihüllen verursacht sein.

Bei CING handelt es sich *Tight Junction*-assoziiertes Protein, welches vermutlich an der Regulation der parazellulären Permeabilität über *Tight Junctions* beteiligt ist (Guillemot et al. 2012). *Tight Junction*-Proteine selbst unterschieden sich im Proteom von WT- und *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen nicht (4.2.3). Werden WT-Eihüllen mit einem TRPV6-Blocker inkubiert oder das freie Ca<sup>2+</sup> durch die Zugabe von EDTA chelatiert, kommt es zu einem signifikanten Anstieg des TER (4.2.4). Der Anstieg des TER ist in beiden Fällen in etwa gleich groß. In *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihüllen bleibt dieser Effekt aus, der TER verändert sich nicht nach Applikation. Die Ergebnisse zeigen, dass die Permeabilität von Eihüllen am Tag 13,5 der Schwangerschaft Ca<sup>2+</sup>-abhängig durch TRPV6 reguliert wird. Um zu untersuchen, in welchem Maß die transzelluläre bzw. parazelluläre Permeabilität von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch TRPV6 beeinflusst wird, könnte man zukünftig den Ca<sup>2+</sup>-Transport über die Eihülle unter Verwendung von radioaktiven <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der Ussing-Kammer messen. Würde dabei der parazelluläre Ionen-Transport mithilfe einer Klemmspannung auf 0 V unterdrückt und ein TRPV6-Antagonist verwendet werden, so ließe sich der Einfluss auf den transzellulären Ca<sup>2+</sup>-Transport bestimmen. Würde zusätzlich der gesamte <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transport über die Eihülle bestimmt ohne Unterdrückung des parazellulären Ionentransports und unter Verwendung eines TRPV6-Antagonisten, so ließe sich aus der Differenz von diesem und dem transzellulären <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transport der parazelluläre <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transport bestimmen.

### 5.3 Einfluss von TRPV6 auf die Proteinexpression im schwangeren Uterus

Die Expression von TRPV6 im schwangeren Uterus wurde bereits beschrieben (Lee and Jeung 2007). Mithilfe von Westernblot und massenspektrometrischer Analyse am Tag 13,5 der Schwangerschaft konnte dies bestätigt werden (4.3.1). Auch im Uterus war die Menge des TRPV6-Proteins so gering, dass es erst nach Anreicherung mittels Immunpräzipitation identifiziert werden konnte.

Die Granzyme C, E und F waren in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri angereichert (4.3.2). Granzyme werden während der Schwangerschaft durch uterine NK-Zellen sekretiert und sind an der Regulation der Plazentation und dem Umbau des uterinen Gewebes beteiligt (Finn and Porter 1975, Tarachand 1986, Allen and Nilsen-Hamilton 1998). Granzym A und B werden ab Tag E7 bis E13 und die Granzyme D-G werden ab Tag E9 bis E17 exprimiert (Allen and Nilsen-Hamilton 1998). Dieses bekannte Expressionsmuster entspricht den identifizierten Granzymisoformen im Uterus am Tag E13,5. Die verstärkte Expression von Granzymen in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri könnte mit einer veränderten Aktivität oder Zahl von NK-Zellen in Zusammenhang stehen. Der Proteaseinhibitor A1AT4 war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri ebenfalls angereichert. Diese Ergebnisse deuten analog zu Plazenta und Eihülle auch auf eine gesteigerte proteolytische Aktivität in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri während der Schwangerschaft hin. Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin war in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri aber nicht degradiert. Möglicherweise wurden hier keine Unterschiede detektiert,

da es sich beim Uterus ebenso wie bei der Plazenta um ein heterogenes Gewebe mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen handelt und Unterschiede, welche in nur einem Zelltyp auftreten, kaum nachweisbar sind. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Annexin 4 (ANXA4) lag in *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri ebenfalls vermehrt vor. ANXA4 ist ebenso wie ANXA1 an der Translokation von TRPV6 in die Plasmamembran beteiligt und könnte auch aufgrund der Abwesenheit von TRPV6 im *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uterus analog zu ANXA1 in der *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Eihülle verstärkt exprimiert sein.

#### **5.4 Einfluss des nicht-funktionellen TRPV6-Proteins (*Trpv6*<sup>mt/mt</sup>) auf den Estruszyklus**

Vorarbeiten zeigen eine zyklusabhängige Expression von *Trpv6* (Lee and Jeung 2007, De Clercq and Vriens 2018), die im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (4.5.1). Mithilfe von Westernblot und massenspektrometrischer Analyse wurde TRPV6 in WT- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri in den Zyklusstadien Proestrus, Estrus und Metestrus nachgewiesen, wobei die Expression von TRPV6 im Estrus am stärksten war. TRPV6 war wie in den anderen Geweben auch im nicht schwangeren Uterus erst nach Anreicherung mittels Immunpräzipitation nachweisbar. Während des Diestrus konnte TRPV6 in WT- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri nicht nachgewiesen werden. In *Trpv6*<sup>-/-</sup>-Uteri konnte eine TRPV6-Expression in keinem der vier Zyklusstadien nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Expression von TRPV6 in der Eihülle (4.2.1).

Die Regulation der *Trpv6*-Expression erfolgt während des Estruszyklus vermutlich über Estrogen. So konnte bereits gezeigt werden, dass die *Trpv6*-Expression in Mäusen nach Estrogeninjektion im Uterus sprunghaft anstieg (De Clercq et al. 2017). Darüberhinaus ist bekannt, dass die Gabe eines Estrogenrezeptorblockers zu einer signifikanten Reduktion der *Trpv6*-Transkriptmenge im Uterus führt (Lee et al. 2009). So könnte man vermuten, dass es durch den Anstieg der Estrogenkonzentration im Proestrus (2.3.1) zu einer verstärkten Expression von *Trpv6*-Transkripten kommt, wodurch schlußendlich die TRPV6-Proteinmenge im Estrus, wie in dieser Arbeit gezeigt, ihr Maximum während des Zyklus erreicht. Die Regulation der *Trpv6*-Expression könnte alternativ aber auch über Prolaktin erfolgen. Es ist bekannt, dass eine Prolaktininjektion bei Mäusen zu einem Anstieg von *Trpv6* im Darm führt (Ajibade et al. 2010). Da die Prolaktinkonzentration während des Proestrus ein lokales Maximum erreicht, könnte dies ebenso ein Auslöser für die Aktivierung der *Trpv6*-Expression sein.

Die massenspektrometrische Proteomanalyse von WT- und *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri in allen vier Zyklusstadien zeigte den Proteaseinhibitor A1AT4 in *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri während Diestrus und Metestrus signifikant reduziert. Im Proestrus war die Protease CATZ in *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri signifikant erhöht. Diese Ergebnisse deuten analog zu Plazenta, Eihülle und schwangerem Uterus darauf hin, dass die proteolytische Aktivität in *Trpv6*<sup>mt/mt</sup>-Uteri während des Estruszyklus erhöht ist. Da Proteasen wie Cathepsine an dem strukturellen Umbau des Uterus im

Zyklusverlauf beteiligt sind (Song et al. 2005), wäre es denkbar, dass TRPV6 in diese Umbauprozesse involviert ist. Jedoch ist bislang unbekannt, inwiefern die Abwesenheit von TRPV6 den Zyklus und damit die Fruchtbarkeit der weiblichen Maus negativ beeinflusst. Granzyme konnten im nicht schwangeren Uterus zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass im nicht schwangeren Uterus keine NK-Zellen (*Granulated Metrial Gland Cells*) vorkommen, sondern erst ab Tag E7 der Schwangerschaft exprimiert werden (Tarachand 1986). Die Menge an Fibronectin war ebenfalls unverändert zwischen WT- und *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri, jedoch könnte auch hier das komplexe Gemisch uteriner Zellen die Detektion von Unterschieden, welche in nur einem Zelltyp vorkommen, erschweren. So wäre es zukünftig sinnvoll z.B. uterine Epithelzellen und Stromazellen isoliert zu untersuchen, um einen besseren Einblick zu bekommen. Im Diestrus war der Progesteronrezeptor (PRGR) und im Proestrus war die Progesteronrezeptoruntereinheit (PGRC1) in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri signifikant angereichert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TRPV6 in die hormonelle Regulation während des Estruszyklus involviert sein könnte. Analog zur Eihülle und zum schwangeren Uterus waren in den Zyklusstadien Diestrus Annexin 2 (ANXA2) und im Proestrus Annexin 1 (ANXA1) und Annexin 4 (ANXA4) in *Trpv6<sup>mt/mt</sup>*-Uteri verstärkt exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass TRPV6-Proteine in die Regulation der proteolytischen Aktivität während des Estruszyklus involviert sind und darüberhinaus eventuell die hormonelle Zyklusregulation beeinflussen. Ob das TRPV6-Protein, bei dem die  $\text{Ca}^{2+}$ -leitende Pore inaktiviert wurde (*Trpv6<sup>mt/mt</sup>*), einen Einfluss auf die Fruchtbarkeit bei weiblichen Mäusen hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es wird aufgrund der Lokalisation von TRPV6 im Uterusepithel und dessen zyklusabhängiger Expression vermutet, dass der Ionenkanal in die Adhäsion und Invasion der Blastozyste sowie in die Dezidualisierung der Stromazellen involviert sein könnte (De Clercq and Vriens 2018).

Um zukünftig die Frage zu klären, ob TRPV6 den Estruszyklus und damit die Fruchtbarkeit beeinflusst, könnte man den Verlauf des Estruszyklus und die Schwangerschaften von WT- und TRPV6-defizienten Mäusen über mehrere Monate miteinander vergleichen.

## 6 Literaturverzeichnis

Adamson, S. L., Y. Lu, K. J. Whiteley, D. Holmyard, M. Hemberger, C. Pfarrer and J. C. Cross (2002). "Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta." Dev Biol **250**(2): 358-373.

Afonina, I. S., S. P. Cullen and S. J. Martin (2010). "Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B." Immunol Rev **235**(1): 105-116.

Ajibade, D. V., P. Dhawan, A. J. Fechner, M. B. Meyer, J. W. Pike and S. Christakos (2010). "Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin." Endocrinology **151**(7): 2974-2984.

Akey, J. M., W. J. Swanson, J. Madeoy, M. Eberle and M. D. Shriver (2006). "TRPV6 exhibits unusual patterns of polymorphism and divergence in worldwide populations." Hum Mol Genet **15**(13): 2106-2113.

Allen, M. P. and M. Nilsen-Hamilton (1998). "Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells." The Journal of Immunology **161**(6): 2772-2779.

Almidani, E., W. Elsidawi, A. Almohamedi, I. Bin Ahmed and A. Alfadhel (2020). "Case Report of Transient Neonatal Hyperparathyroidism: Medically Free Mother." Cureus **12**(2): e7000.

Amphlett, G. W. and M. E. Hinda (1983). "The binding of calcium to human fibronectin." Biochem Biophys Res Commun **111**(3): 1045-1053.

Appelgren, L. E. (1969). "The distribution of labelled testosterone in mice." Acta Endocrinol (Copenh) **62**(3): 505-512.

Bany, B. M. and J. C. Cross (2006). "Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization." Dev Biol **294**(2): 445-456.

Becker, A., S. Mannebach, I. Mathar, P. Weissgerber, M. Freichel, A. P. Loodin, C. Fecher-Trost, A. Belkacemi, A. Beck and S. E. Philipp (2020). "Control of Insulin Release by Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) Ion Channels." Cell Physiol Biochem **54**(6): 1115-1131.

Behrens, J., R. Solga, A. Ziemann, R. H. Rastetter, C. Berwanger, H. Herrmann, A. A. Noegel and C. S. Clemen (2016). "Coronin 1C-free primary mouse fibroblasts exhibit robust rearrangements in the orientation of actin filaments, microtubules and intermediate filaments." Eur J Cell Biol **95**(8): 239-251.

Belkacemi, L., G. Gariépy, C. Mounier, L. Simoneau and J. Lafond (2003). "Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta." Biol Reprod **68**(6): 1943-1950.

Belkacemi, L., G. Gariépy, C. Mounier, L. Simoneau and J. Lafond (2004). "Calbindin-D9k (CaBP9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta." Cell Tissue Res **315**(1): 107-117.

Benn, B. S., D. Ajibade, A. Porta, P. Dhawan, M. Hediger, J. B. Peng, Y. Jiang, G. T. Oh, E. B. Jeung, L. Lieben, R. Bouillon, G. Carmeliet and S. Christakos (2008). "Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k." Endocrinology **149**(6): 3196-3205.

- Bolanz, K. A., M. A. Hediger and C. P. Landowski (2008). "The role of TRPV6 in breast carcinogenesis." Mol Cancer Ther **7**(2): 271-279.
- Boros, S., R. J. Bindels and J. G. Hoenderop (2009). "Active Ca(2+) reabsorption in the connecting tubule." Pflugers Arch **458**(1): 99-109.
- Bronner, F. (2003). "Mechanisms of intestinal calcium absorption." J Cell Biochem **88**(2): 387-393.
- Burren, C. P., R. Caswell, B. Castle, C. R. Welch, T. N. Hilliard, S. F. Smithson and S. Ellard (2018). "TRPV6 compound heterozygous variants result in impaired placental calcium transport and severe undermineralization and dysplasia of the fetal skeleton." Am J Med Genet A **176**(9): 1950-1955.
- Buxton, L. E. and R. N. Murdoch (1982). "Lectins, calcium ionophore A23187 and peanut oil as decidual agents in the uterus of pseudopregnant mice: effects of tranlycypromine, indomethacin, iproniazid and propranolol." Aust J Biol Sci **35**(1): 63-72.
- Buzza, M. S., L. Zamurs, J. Sun, C. H. Bird, A. I. Smith, J. A. Trapani, C. J. Froelich, E. C. Nice and P. I. Bird (2005). "Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin." J Biol Chem **280**(25): 23549-23558.
- Cai, Y., Y. Maeda, A. Cedzich, V. E. Torres, G. Wu, T. Hayashi, T. Mochizuki, J. H. Park, R. Witzgall and S. Somlo (1999). "Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product." J Biol Chem **274**(40): 28557-28565.
- Cao, C., E. Zakharian, I. Borbiri and T. Rohacs (2013). "Interplay between calmodulin and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 channels." Journal of Biological Chemistry **288**(8): 5278-5290.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
- Cemerikic, B., R. Zamah and M. S. Ahmed (1998). "Identification of L-type calcium channels associated with kappa opioid receptors in human placenta." J Mol Neurosci **10**(3): 261-272.
- Cheng, H., A. Beck, P. Launay, S. A. Gross, A. J. Stokes, J. P. Kinet, A. Fleig and R. Penner (2007). "TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells." Cell Calcium **41**(1): 51-61.
- Chubanov, V., S. Waldeger, M. Mederos y Schnitzler, H. Vitzthum, M. C. Sassen, H. W. Seyberth, M. Konrad and T. Gudermann (2004). "Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2894-2899.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.
- Clapp, C., J. Aranda, C. González, M. C. Jeziorski and G. Martínez de la Escalera (2006). "Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function." Trends Endocrinol Metab **17**(8): 301-307.
- Clapp, C., C. González, Y. Macotela, J. Aranda, J. C. Rivera, C. García, J. Guzmán, M. Zamorano, C. Vega, C. Martín, M. C. Jeziorski and G. M. de la Escalera (2006). "Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function." Front Horm Res **35**: 64-73.

Comar, C. L. and R. H. Wasserman (1956). "Radioisotopes in the study of mineral metabolism." Prog Nucl Energy 6 Biol Sci **1**: 153-196.

Courjaret, R., S. Hubrack, A. Daalis, M. Dib and K. Machaca (2013). "The *Xenopus* TRPV6 homolog encodes a Mg(2+) -permeant channel that is inhibited by interaction with TRPC1." J Cell Physiol **228**(12): 2386-2398.

Cross, J. C., M. Hemberger, Y. Lu, T. Nozaki, K. Whiteley, M. Masutani and S. L. Adamson (2002). "Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta." Mol Cell Endocrinol **187**(1-2): 207-212.

De Clercq, K., C. Van den Eynde, A. Hennes, R. Van Bree, T. Voets and J. Vriens (2017). "The functional expression of transient receptor potential channels in the mouse endometrium." Hum Reprod **32**(3): 615-630.

De Clercq, K. and J. Vriens (2018). "Establishing life is a calcium-dependent TRiP: Transient receptor potential channels in reproduction." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1865**(11 Pt B): 1815-1829.

Del Toro, R., K. L. Levitsky, J. López-Barneo and M. D. Chiara (2003). "Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia." J Biol Chem **278**(25): 22316-22324.

DeSesso, J. M., A. L. Williams, A. Ahuja, C. J. Bowman and M. E. Hurtt (2012). "The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy." Crit Rev Toxicol **42**(3): 185-210.

Dietrich, A., M. M. y Schnitzler, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova and H. Kalwa (2005). "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice." Molecular and cellular biology **25**(16): 6980-6989.

Dobrev, M. P., P. N. Pereira, J. Deprest and A. Zwijsen (2010). "On the origin of amniotic stem cells: of mice and men." Int J Dev Biol **54**(5): 761-777.

Duncan, L. M., J. Deeds, F. E. Cronin, M. Donovan, A. J. Sober, M. Kauffman and J. J. McCarthy (2001). "Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma." J Clin Oncol **19**(2): 568-576.

Dunn, L. C. (1928). "A Fifth Allelomorph in the Agouti Series of the House Mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **14**(10): 816-819.

Fan, B., J. Brennan, D. Grant, F. Peale, L. Rangell and D. Kirchhofer (2007). "Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) is essential for the integrity of basement membranes in the developing placental labyrinth." Dev Biol **303**(1): 222-230.

Fan, H., Y. X. Shen and Y. F. Yuan (2014). "Expression and prognostic roles of TRPV5 and TRPV6 in non-small cell lung cancer after curative resection." Asian Pac J Cancer Prev **15**(6): 2559-2563.

Fecher-Trost, C., F. Lux, K. M. Busch, A. Raza, M. Winter, F. Hielscher, T. Belkacemi, B. van der Eerden, U. Boehm, M. Freichel and P. Weissgerber (2019). "Maternal Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (Trpv6) Is Involved In Offspring Bone Development." J Bone Miner Res **34**(4): 699-710.

Fecher-Trost, C., U. Wissenbach, A. Beck, P. Schalkowsky, C. Stoerger, J. Doerr, A. Dembek, M. Simon-Thomas, A. Weber, P. Wollenberg, T. Ruppert, R. Middendorff, H. H. Maurer and V.

- Flockerzi (2013). "The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG." J Biol Chem **288**(23): 16629-16644.
- Ferkowicz, M. J., M. Starr, X. Xie, W. Li, S. A. Johnson, W. C. Shelley, P. R. Morrison and M. C. Yoder (2003). "CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo." Development **130**(18): 4393-4403.
- Finn, C. A. and D. G. Porter (1975). The uterus, Elek.
- Fixemer, T., U. Wissenbach, V. Flockerzi and H. Bonkhoff (2003). "Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression." Oncogene **22**(49): 7858-7861.
- Fleenor, D., A. Petryk, P. Driscoll and M. Freemark (2000). "Constitutive expression of placental lactogen in pancreatic beta cells: effects on cell morphology, growth, and gene expression." Pediatr Res **47**(1): 136-142.
- Flockerzi, V. and B. Nilius (2014). TRPs: truly remarkable proteins. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels, Springer: 1-12.
- Freichel, M., S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi and B. Nilius (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice." Nat Cell Biol **3**(2): 121-127.
- Furukawa, S., N. Tsuji and A. Sugiyama (2019). "Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation." J Toxicol Pathol **32**(1): 1-17.
- Gavard, J. (2014). "Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship." Cell Adh Migr **8**(2): 158-164.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.
- Gooding, J. M., K. L. Yap and M. Ikura (2004). "The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures." Bioessays **26**(5): 497-511.
- Gordon, Z., D. Elad, R. Almog, Y. Hazan, A. J. Jaffa and O. Eytan (2007). "Anthropometry of fetal vasculature in the chorionic plate." J Anat **211**(6): 698-706.
- Gregorio-Teruel, L., P. Valente, J. M. González-Ros, G. Fernández-Ballester and A. Ferrer-Montiel (2014). "Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype 1 modulates allosteric channel activation." J Gen Physiol **143**(3): 361-375.
- Grossman, W. J., P. A. Revell, Z. H. Lu, H. Johnson, A. J. Bredemeyer and T. J. Ley (2003). "The orphan granzymes of humans and mice." Curr Opin Immunol **15**(5): 544-552.
- Guillemot, F., A. Nagy, A. Auerbach, J. Rossant and A. L. Joyner (1994). "Essential role of Mash-2 in extraembryonic development." Nature **371**(6495): 333-336.
- Guillemot, L., Y. Schneider, P. Brun, I. Castagliuolo, D. Pizzuti, D. Martines, L. Jond, M. Bongiovanni and S. Citi (2012). "Cingulin is dispensable for epithelial barrier function and tight junction structure, and plays a role in the control of claudin-2 expression and response to duodenal mucosa injury." J Cell Sci **125**(Pt 21): 5005-5014.

- Halbleib, J. M. and W. J. Nelson (2006). "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis." Genes Dev **20**(23): 3199-3214.
- Hanaoka, K., F. Qian, A. Boletta, A. K. Bhunia, K. Piontek, L. Tsiokas, V. P. Sukhatme, W. B. Guggino and G. G. Germino (2000). "Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents." Nature **408**(6815): 990-994.
- Hardie, R. C. and B. Minke (1992). "The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors." Neuron **8**(4): 643-651.
- Harteneck, C. (2003). "Proteins modulating TRP channel function." Cell Calcium **33**(5-6): 303-310.
- Hasan, M. Z., M. Ikawati, J. Tocharus, M. Kawaichi and C. Oka (2015). "Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice." Dev Biol **397**(1): 89-102.
- Hemberger, M., C. W. Hanna and W. Dean (2020). "Mechanisms of early placental development in mouse and humans." Nat Rev Genet **21**(1): 27-43.
- Hennes, A., K. Held, M. Boretto, K. De Clercq, C. Van den Eynde, A. Vanhie, N. Van Ranst, M. Benoit, C. Luyten, K. Peeraer, C. Tomassetti, C. Meuleman, T. Voets, H. Vankelecom and J. Vriens (2019). "Functional expression of the mechanosensitive PIEZO1 channel in primary endometrial epithelial cells and endometrial organoids." Sci Rep **9**(1): 1779.
- Herington, J. L. and B. M. Bany (2007). "Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization." Biol Reprod **76**(4): 579-588.
- Hilfiker-Kleiner, D., K. Kaminski, E. Podewski, T. Bonda, A. Schaefer, K. Sliwa, O. Forster, A. Quint, U. Landmesser, C. Doerries, M. Luchtefeld, V. Poli, M. D. Schneider, J. L. Balligand, F. Desjardins, A. Ansari, I. Struman, N. Q. Nguyen, N. H. Zschemisch, G. Klein, G. Heusch, R. Schulz, A. Hilfiker and H. Drexler (2007). "A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy." Cell **128**(3): 589-600.
- Hirnet, D., J. Olausson, C. Fecher-Trost, M. Bödding, W. Nastainczyk, U. Wissenbach, V. Flockerzi and M. Freichel (2003). "The TRPV6 gene, cDNA and protein." Cell Calcium **33**(5-6): 509-518.
- Hoenderop, J. G., B. Nilius and R. J. Bindels (2003). "Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation." Pflugers Arch **446**(3): 304-308.
- Hoenderop, J. G., A. W. van der Kemp, A. Hartog, S. F. van de Graaf, C. H. van Os, P. H. Willems and R. J. Bindels (1999). "Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia." J Biol Chem **274**(13): 8375-8378.
- Hoenderop, J. G., J. P. van Leeuwen, B. C. van der Eerden, F. F. Kersten, A. W. van der Kemp, A. M. Mérillat, J. H. Waarsing, B. C. Rossier, V. Vallon, E. Hummler and R. J. Bindels (2003). "Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5." J Clin Invest **112**(12): 1906-1914.
- Hoenderop, J. G., T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius and R. J. Bindels (2003). "Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6." Embo j **22**(4): 776-785.
- Hofherr, A. and M. Köttgen (2011). "TRPP channels and polycystins." Adv Exp Med Biol **704**: 287-313.

- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz and T. Gudermann (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7461-7466.
- Hu, D. and J. C. Cross (2009). "Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta." International Journal of Developmental Biology **54**(2-3): 341-354.
- Hu, D. and J. C. Cross (2010). "Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta." Int J Dev Biol **54**(2-3): 341-354.
- Hughes, D. A., K. Tang, R. Strotmann, T. Schöneberg, J. Prenen, B. Nilius and M. Stoneking (2008). "Parallel selection on TRPV6 in human populations." PLoS One **3**(2): e1686.
- Inagaki, A., H. Nishizawa, S. Ota, M. Suzuki, H. Inuzuka, H. Miyamura, T. Sekiya, H. Kurahashi and Y. Udagawa (2012). "Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia." Placenta **33**(11): 919-926.
- Isermann, B., R. Sood, R. Pawlinski, M. Zogg, S. Kalloway, J. L. Degen, N. Mackman and H. Weiler (2003). "The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy." Nat Med **9**(3): 331-337.
- Ishida, M., K. Ono, S. Taguchi, S. Ohashi, J. Naito, K. Horiguchi and T. Harigaya (2004). "Cathepsin gene expression in mouse placenta during the latter half of pregnancy." J Reprod Dev **50**(5): 515-523.
- Ito, C., H. Yamazaki and T. Yamane (2013). "Earliest hematopoietic progenitors at embryonic day 9 preferentially generate B-1 B cells rather than follicular B or marginal zone B cells." Biochem Biophys Res Commun **437**(2): 307-313.
- Iwatsuki, K., M. Shinozaki, W. Sun, S. Yagi, S. Tanaka and K. Shiota (2000). "A novel secretory protein produced by rat spongiotrophoblast." Biol Reprod **62**(5): 1352-1359.
- Ji, R. P., C. K. Phoon, O. Aristizábal, K. E. McGrath, J. Palis and D. H. Turnbull (2003). "Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper." Circ Res **92**(2): 133-135.
- John, R. and M. Hemberger (2012). "A placenta for life." Reprod Biomed Online **25**(1): 5-11.
- Kasik, J. W. (1998). "A cDNA cloned from pregnant mouse uterus exhibits temporo-spatial expression and predicts a novel protein." Biochem J **330** ( Pt 2)(Pt 2): 947-950.
- Kawaguchi, T., L. Qin, T. Shimomura, J. Kondo, K. Matsumoto, K. Denda and N. Kitamura (1997). "Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor." J Biol Chem **272**(44): 27558-27564.
- Kawamoto, T. (2003). "Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants." Arch Histol Cytol **66**(2): 123-143.
- Kessler, T., U. Wissenbach, R. Grobholz and V. Flockerzi (2009). "TRPV6 alleles do not influence prostate cancer progression." BMC Cancer **9**: 380.
- Kishi, K., L. Ogren, J. N. Southard and F. Talamantes (1988). "Pituitary factors regulating mouse placental lactogen-II secretion during the last half of pregnancy in mice." Endocrinology **122**(5): 2309-2317.

- Kovacs, C. S., L. L. Chafe, M. L. Woodland, K. R. McDonald, N. J. Fudge and P. J. Wookey (2002). "Calcitropic gene expression suggests a role for the intraplacental yolk sac in maternal-fetal calcium exchange." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(3): E721-732.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk (1997). "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility." Nat Genet **15**(2): 201-204.
- Lee, B. M., G. S. Lee, E. M. Jung, K. C. Choi and E. B. Jeung (2009). "Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents." Reprod Biol Endocrinol **7**: 49.
- Lee, G. S. and E. B. Jeung (2007). "Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E132-138.
- Lee, K.-F., E. Li, L. J. Huber, S. C. Landis, A. H. Sharpe, M. V. Chao and R. Jaenisch (1992). "Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system." Cell **69**(5): 737-749.
- Leiser, R. and P. Kaufmann (1994). "Placental structure: in a comparative aspect." Exp Clin Endocrinol **102**(3): 122-134.
- Li, D., J. Yue, Y. Wu, P. A. Barnie and Y. Wu (2018). "HtrA1 up-regulates expression of MMPs via Erk1/2/Rock-dependent pathways." Int J Clin Exp Pathol **11**(2): 998-1008.
- Liao, M., E. Cao, D. Julius and Y. Cheng (2013). "Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy." Nature **504**(7478): 107-112.
- Lieben, L. and G. Carmeliet (2012). "The Involvement of TRP Channels in Bone Homeostasis." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 99.
- Liedtke, D., M. Orth, M. Meissler, S. Geuer, S. Knaup, I. Köblitz and E. Klopocki (2019). "ECM alterations in Fndc3a (Fibronectin Domain Containing Protein 3A) deficient zebrafish cause temporal fin development and regeneration defects." Sci Rep **9**(1): 13383.
- Liman, E. R. (2007). "TRPM5 and taste transduction." Handb Exp Pharmacol(179): 287-298.
- Lintschinger, B., M. Balzer-Geldsetzer, T. Baskaran, W. F. Graier, C. Romanin, M. X. Zhu and K. Groschner (2000). "Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive cation channels." J Biol Chem **275**(36): 27799-27805.
- Linzer, D. I. and S. J. Fisher (1999). "The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy." Mol Endocrinol **13**(6): 837-840.
- Lopez-Jaramillo, P., M. Narvaez, C. Felix and A. Lopez (1990). "Dietary calcium supplementation and prevention of pregnancy hypertension." Lancet **335**(8684): 293.
- Luo, Y., P. M. Vassilev, X. Li, Y. Kawanabe and J. Zhou (2003). "Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel in renal epithelia." Mol Cell Biol **23**(7): 2600-2607.
- Marzioni, D., T. Lorenzi, E. Altobelli, S. R. Giannubilo, F. Paolinelli, C. Tersigni, C. Crescimanno, V. Monsurrò, A. L. Tranquilli, N. Di Simone and M. Castellucci (2012). "Alterations of maternal plasma HTRA1 level in preeclampsia complicated by IUGR." Placenta **33**(12): 1036-1038.

- Masamune, A., H. Kotani, F. L. Sörgel, J. M. Chen, S. Hamada, R. Sakaguchi, E. Masson, E. Nakano, Y. Kakuta, T. Niihori, R. Funayama, M. Shirota, T. Hirano, T. Kawamoto, A. Hosokoshi, K. Kume, L. Unger, M. Ewers, H. Laumen, P. Bugert, M. X. Mori, V. Tsvilovskyy, P. Weißgerber, U. Kriebs, C. Fecher-Trost, M. Freichel, K. N. Diakopoulos, A. Berninger, M. Lesina, K. Ishii, T. Itoi, T. Ikeura, K. Okazaki, T. Kaune, J. Rosendahl, M. Nagasaki, Y. Uezono, H. Algül, K. Nakayama, Y. Matsubara, Y. Aoki, C. Férec, Y. Mori, H. Witt and T. Shimosegawa (2020). "Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis." Gastroenterology **158**(6): 1626-1641.e1628.
- Mason, A. E., D. Grier, S. F. Smithson, C. P. Burren and E. Gradhand (2020). "Post-mortem histology in transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6) under-mineralising skeletal dysplasia suggests postnatal skeletal recovery: a case report." BMC Med Genet **21**(1): 64.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori and K. Nakao (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." Nat Med **3**(9): 1029-1033.
- McLean, A. C., N. Valenzuela, S. Fai and S. A. Bennett (2012). "Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification." J Vis Exp(67): e4389.
- McNeil, A. K., U. Rescher, V. Gerke and P. L. McNeil (2006). "Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair." J Biol Chem **281**(46): 35202-35207.
- McRae, A. C. and R. B. Church (1990). "Cytoplasmic projections of trophectoderm distinguish implanting from preimplanting and implantation-delayed mouse blastocytes." J Reprod Fertil **88**(1): 31-40.
- Méndez-Reséndiz, K. A., Ó. Enciso-Pablo, R. González-Ramírez, R. Juárez-Contreras, T. Rosenbaum and S. L. Morales-Lázaro (2020). "Steroids and TRP Channels: A Close Relationship." Int J Mol Sci **21**(11).
- Meško, M., T. Lebar, P. Dekleva, R. Jerala and M. Benčina (2020). "Engineering and Rewiring of a Calcium-Dependent Signaling Pathway." ACS Synth Biol **9**(8): 2055-2065.
- Metcalfe, D. (2003). "The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor." Stem Cells **21**(1): 5-14.
- Milles, L. F., E. M. Unterauer, T. Nicolaus and H. E. Gaub (2018). "Calcium stabilizes the strongest protein fold." Nat Commun **9**(1): 4764.
- Miner, J. H., J. Cunningham and J. R. Sanes (1998). "Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain." J Cell Biol **143**(6): 1713-1723.
- Mochizuki, T., G. Wu, T. Hayashi, S. L. Xenophontos, B. Veldhuisen, J. J. Saris, D. M. Reynolds, Y. Cai, P. A. Gabow and A. Pierides (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein." Science **272**(5266): 1339-1342.
- Molomut, N., D. M. Spain, S. D. Gault and I. Kreisler (1954). "The induction of metastases from sarcoma I in C57BL/6 mice." Am J Pathol **30**(2): 375-389.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.

- Montell, C., K. Jones, E. Hafen and G. Rubin (1985). "Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation." Science **230**(4729): 1040-1043.
- Montgomery, V., D. Loutradis, D. Tulchinsky and A. Kiessling (1988). "FSH-induced ovulation in intact and hypophysectomized mice." J Reprod Fertil **84**(1): 1-6.
- Moore, C. and W. B. Liedtke (2017). *Frontiers in Neuroscience*
- Osmomechanical-Sensitive TRPV Channels in Mammals. Neurobiology of TRP Channels. T. L. R. Emir. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis
- © 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.: 85-94.
- Moreau, R., G. Daoud, R. Bernatchez, L. Simoneau, A. Masse and J. Lafond (2002). "Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta." Biochim Biophys Acta **1564**(2): 325-332.
- Moreau, R., G. Daoud, A. Masse, L. Simoneau and J. Lafond (2003). "Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta." Mol Reprod Dev **65**(3): 283-288.
- Mould, A., M. A. Morgan, L. Li, E. K. Bikoff and E. J. Robertson (2012). "Blimp1/Prdm1 governs terminal differentiation of endovascular trophoblast giant cells and defines multipotent progenitors in the developing placenta." Genes Dev **26**(18): 2063-2074.
- Natale, B. V., C. Schweitzer, M. Hughes, M. A. Globisch, R. Kotadia, E. Tremblay, P. Vu, J. C. Cross and D. R. C. Natale (2017). "Sca-1 identifies a trophoblast population with multipotent potential in the mid-gestation mouse placenta." Sci Rep **7**(1): 5575.
- Nett, V., N. Erhardt, A. Wyatt and U. Wissenbach (2021). "Human TRPV6-pathies caused by gene mutations." Biochim Biophys Acta Gen Subj **1865**(6): 129873.
- Niemeyer, B. A., C. Bergs, U. Wissenbach, V. Flockerzi and C. Trost (2001). "Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca<sup>2+</sup> entry by protein kinase C and calmodulin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3600-3605.
- Nilius, B. and V. Flockerzi (2014). "Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface." Handb Exp Pharmacol **223**: v - vi.
- Nilius, B., J. Prenen, J. G. Hoenderop, R. Vennekens, S. Hoefs, A. F. Weidema, G. Droogmans and R. J. Bindels (2002). "Fast and slow inactivation kinetics of the Ca<sup>2+</sup> channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3." J Biol Chem **277**(34): 30852-30858.
- Nilius, B. and A. Szallasi (2014). "Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine." Pharmacol Rev **66**(3): 676-814.
- Obholz, K. L., A. Akopyan, K. G. Waymire and G. R. MacGregor (2006). "FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells." Dev Biol **298**(2): 498-513.
- Oikawa, S., C. Inuzuka, M. Kuroki, Y. Matsuoka, G. Kosaki and H. Nakazato (1989). "Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 39-45.

- Okada, T., S. Shimizu, M. Wakamori, A. Maeda, T. Kurosaki, N. Takada, K. Imoto and Y. Mori (1998). "Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain." J Biol Chem **273**(17): 10279-10287.
- Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, C. Wall and G. Keller (1999). "Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse." Development **126**(22): 5073-5084.
- Papaleo, E., P. Fantucci and L. De Gioia (2005). "Effects of Calcium Binding on Structure and Autolysis Regulation in Trypsins. A Molecular Dynamics Investigation." J Chem Theory Comput **1**(6): 1286-1297.
- Parkening, T. A., T. J. Collins and E. R. Smith (1982). "Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle." Neurobiol Aging **3**(1): 31-35.
- Peng, J.-B., Y. Suzuki, G. Gyimesi and M. A. Hediger (2017). "13 TRPV5 and TRPV6." Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells: 241.
- Peng, J. B., E. M. Brown and M. A. Hediger (2003). "Epithelial Ca<sup>2+</sup> entry channels: transcellular Ca<sup>2+</sup> transport and beyond." J Physiol **551**(Pt 3): 729-740.
- Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown and M. A. Hediger (1999). "Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption." J Biol Chem **274**(32): 22739-22746.
- Pennington, K. A., J. M. Schlitt and L. C. Schulz (2012). "Isolation of primary mouse trophoblast cells and trophoblast invasion assay." J Vis Exp(59): e3202.
- Pereira, P. N., M. P. Dobрева, L. Graham, D. Huylebroeck, K. A. Lawson and A. N. Zwijsen (2011). "Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model." BMC Dev Biol **11**: 48.
- Piwnicka, D., I. Fernandez, N. Binart, P. Touraine, P. A. Kelly and V. Goffin (2006). "A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D." Mol Endocrinol **20**(12): 3263-3278.
- Plant, T. D. and M. Schaefer (2003). "TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels." Cell Calcium **33**(5-6): 441-450.
- Qamar, S., M. Vadivelu and R. Sandford (2007). "TRP channels and kidney disease: lessons from polycystic kidney disease." Biochem Soc Trans **35**(Pt 1): 124-128.
- Rai, A. and J. C. Cross (2014). "Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry." Dev Biol **387**(2): 131-141.
- Ralston, A. and J. Rossant (2008). "Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo." Dev Biol **313**(2): 614-629.
- Raphaël, M., V. Lehen'kyi, M. Vandenberghe, B. Beck, S. Khalimonchyk, F. Vanden Abeele, L. Farsetti, E. Germain, A. Bokhobza, A. Mihalache, P. Gosset, C. Romanin, P. Clézardin, R. Skryma and N. Prevarskaya (2014). "TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(37): E3870-3879.

- Ruoslahti, E. (1988). "Fibronectin and its receptors." Annu Rev Biochem **57**: 375-413.
- Sakoff, J. A. and R. N. Murdoch (1995). "Uterine receptivity to the artificial decidual agent, concanavalin A, in pseudopregnant QS mice." Reprod Fertil Dev **7**(5): 1095-1100.
- Salamonsen, L. A. and G. Nie (2002). "Proteases at the endometrial-trophoblast interface: their role in implantation." Rev Endocr Metab Disord **3**(2): 133-143.
- Salamonsen, L. A., J. Zhang and M. Brasted (2002). "Leukocyte networks and human endometrial remodelling." J Reprod Immunol **57**(1-2): 95-108.
- Salon, C., S. Lantuejoul, B. Eymin, S. Gazeri, C. Brambilla and E. Brambilla (2005). "The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis." Future Oncol **1**(5): 649-660.
- Sander, V. A., G. B. Facorro, L. Piehl, E. Rubín de Celis and A. B. Motta (2009). "Effect of DHEA and metformin on corpus luteum in mice." Reproduction **138**(3): 571-579.
- Saotome, K., A. K. Singh, M. V. Yelshanskaya and A. I. Sobolevsky (2016). "Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6." Nature **534**(7608): 506-511.
- Sarkar, D. K., S. A. Chiappa, G. Fink and N. M. Sherwood (1976). "Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats." Nature **264**(5585): 461-463.
- Sasaki, Y. and H. Hidaka (1982). "Calmodulin and cell proliferation." Biochem Biophys Res Commun **104**(2): 451-456.
- Savignac, M., B. Mellström and J. R. Naranjo (2007). "Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes." Pflugers Arch **454**(4): 523-533.
- Schindl, R., R. Fritsch, I. Jardin, I. Frischauf, H. Kahr, M. Muik, M. C. Riedl, K. Groschner and C. Romanin (2012). "Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx." J Biol Chem **287**(42): 35612-35620.
- Schmidt, W. (1992). "The amniotic fluid compartment: the fetal habitat." Adv Anat Embryol Cell Biol **127**: 1-100.
- Schultz, J. F. and D. R. Armant (1995). "Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor." J Biol Chem **270**(19): 11522-11531.
- Schulz, L. C., E. P. Widmaier, J. Qiu and R. M. Roberts (2009). "Effect of leptin on mouse trophoblast giant cells." Biol Reprod **80**(3): 415-424.
- Screen, M., W. Dean, J. C. Cross and M. Hemberger (2008). "Cathepsin proteases have distinct roles in trophoblast function and vascular remodelling." Development **135**(19): 3311-3320.
- Shimomura, T., K. Denda, A. Kitamura, T. Kawaguchi, M. Kito, J. Kondo, S. Kagaya, L. Qin, H. Takata, K. Miyazawa and N. Kitamura (1997). "Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor." J Biol Chem **272**(10): 6370-6376.
- Simmons, D. G., A. L. Fortier and J. C. Cross (2007). "Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta." Dev Biol **304**(2): 567-578.

- Simmons, D. G., S. Rawn, A. Davies, M. Hughes and J. C. Cross (2008). "Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus." BMC Genomics **9**: 352.
- Singh, A. K., L. L. McGoldrick, E. C. Twomey and A. I. Sobolevsky (2018). "Mechanism of calmodulin inactivation of the calcium-selective TRP channel TRPV6." Science advances **4**(8): eaau6088.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Soares, M. J. (2004). "The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface." Reprod Biol Endocrinol **2**: 51.
- Song, G., T. E. Spencer and F. W. Bazer (2005). "Cathepsins in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon tau." Endocrinology **146**(11): 4825-4833.
- Sorenson, R. L., T. C. Brelje and C. Roth (1993). "Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy." Endocrinology **133**(5): 2227-2234.
- Squires, P. M., S. J. Dixon and T. G. Kennedy (1993). "Requirement for Ca<sup>2+</sup> mobilization and increased prostaglandin production for maximal decidualization in rats and the involvement of angiotensin II." J Reprod Fertil **98**(2): 423-429.
- Stewart, J. M. (2020). "TRPV6 as a target for cancer therapy." Journal of Cancer **11**(2): 374.
- Storch, U., A. L. Forst, M. Philipp, T. Gudermann and M. Mederos y Schnitzler (2012). "Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes." J Biol Chem **287**(5): 3530-3540.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan and A. Patapoutian (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-829.
- Strübing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. E. Clapham (2001). "TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain." Neuron **29**(3): 645-655.
- Sun, M., E. Goldin, S. Stahl, J. L. Falardeau, J. C. Kennedy, J. S. Acierno, Jr., C. Bove, C. R. Kaneski, J. Nagle, M. C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann and S. A. Slaugenhaupt (2000). "Mucopolysaccharidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel." Hum Mol Genet **9**(17): 2471-2478.
- Sutherland, A. (2003). "Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior." Dev Biol **258**(2): 241-251.
- Suzuki, Y., D. Chitayat, H. Sawada, M. A. Deardorff, H. M. McLaughlin, A. Begtrup, K. Millar, J. Harrington, K. Chong, M. Roifman, K. Grand, M. Tominaga, F. Takada, S. Shuster, M. Obara, H. Mutoh, R. Kushima and G. Nishimura (2018). "TRPV6 Variants Interfere with Maternal-Fetal Calcium Transport through the Placenta and Cause Transient Neonatal Hyperparathyroidism." Am J Hum Genet **102**(6): 1104-1114.

- Suzuki, Y., C. S. Kovacs, H. Takanaga, J. B. Peng, C. P. Landowski and M. A. Hediger (2008). "Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport." J Bone Miner Res **23**(8): 1249-1256.
- Suzuki, Y., H. Sawada, T. Tokumasu, S. Suzuki, S. Ninomiya, M. Shirai, T. Mukai, C. T. Saito, G. Nishimura and M. Tominaga (2020). "Novel TRPV6 mutations in the spectrum of transient neonatal hyperparathyroidism." J Physiol Sci **70**(1): 33.
- Szabo, R., A. Molinolo, K. List and T. H. Bugge (2007). "Matriptase inhibition by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 is essential for placental development." Oncogene **26**(11): 1546-1556.
- Szklanna, P. B., K. Wynne, M. Nolan, K. Egan, F. N. Áinle and P. B. Maguire (2017). "Comparative proteomic analysis of trophoblast cell models reveals their differential phenotypes, potential uses, and limitations." Proteomics **17**(10): e1700037.
- Tanaka, H., K. Nagaike, N. Takeda, H. Itoh, K. Kohama, T. Fukushima, S. Miyata, S. Uchiyama, S. Uchinokura, T. Shimomura, K. Miyazawa, N. Kitamura, G. Yamada and H. Kataoka (2005). "Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta." Mol Cell Biol **25**(13): 5687-5698.
- Tarachand, U. (1986). "Decidualisation: origin and role of associated cells." Biol Cell **57**(1): 9-16.
- Tayade, C., Y. Fang and B. A. Croy (2007). "A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure." J Reprod Dev **53**(3): 455-463.
- Thordarson, G., P. Folger and F. Talamantes (1987). "Development of a placental cell culture system for studying the control of mouse placental lactogen II secretion." Placenta **8**(6): 573-585.
- Thordarson, G., L. Ogren, J. R. Day, K. Bowens, P. Fielder and F. Talamantes (1989). "Mammary gland development and alpha-lactalbumin production in hypophysectomized, pregnant mice." Biol Reprod **40**(3): 517-524.
- Togashi, K., Y. Hara, T. Tominaga, T. Higashi, Y. Konishi, Y. Mori and M. Tominaga (2006). "TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion." Embo j **25**(9): 1804-1815.
- Ueno, M., L. K. Lee, A. Chhabra, Y. J. Kim, R. Sasidharan, B. Van Handel, Y. Wang, M. Kamata, P. Kamran, K. I. Sereti, R. Ardehali, M. Jiang and H. K. Mikkola (2013). "c-Met-dependent multipotent labyrinth trophoblast progenitors establish placental exchange interface." Dev Cell **27**(4): 373-386.
- van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop, D. Gkika, D. Lamers, J. Prenen, U. Rescher, V. Gerke, O. Staub, B. Nilius and R. J. Bindels (2003). "Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex." Embo j **22**(7): 1478-1487.
- Vassilev, P. M., L. Guo, X. Z. Chen, Y. Segal, J. B. Peng, N. Basora, H. Babakhanlou, G. Cruger, M. Kanazirska, C. Ye, E. M. Brown, M. A. Hediger and J. Zhou (2001). "Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease." Biochem Biophys Res Commun **282**(1): 341-350.

- Velotti, F., G. Palmieri, D. D'Ambrosio, M. Piccoli, L. Frati and A. Santoni (1992). "Differential expression of granzyme A and granzyme B proteases and their secretion by fresh rat natural killer cells (NK) and lymphokine-activated killer cells with NK phenotype (LAK-NK)." Eur J Immunol **22**(4): 1049-1053.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Vidak, E., U. Javoršek, M. Vizovišek and B. Turk (2019). "Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment." Cells **8**(3).
- Voets, T., A. Janssens, G. Droogmans and B. Nilius (2004). "Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel." Journal of Biological Chemistry **279**(15): 15223-15230.
- Voets, T., A. Janssens, J. Prenen, G. Droogmans and B. Nilius (2003). "Mg<sup>2+</sup>-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6." J Gen Physiol **121**(3): 245-260.
- Voets, T., J. Prenen, A. Fleig, R. Vennekens, H. Watanabe, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, G. Droogmans, R. Penner and B. Nilius (2001). "CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties." J Biol Chem **276**(51): 47767-47770.
- Walmer, D. K., M. A. Wrona, C. L. Hughes and K. G. Nelson (1992). "Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone." Endocrinology **131**(3): 1458-1466.
- Wang, J. and D. R. Armant (2002). "Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation." Cells Tissues Organs **172**(3): 190-201.
- Wang, Z., C. Ng, X. Liu, Y. Wang, B. Li, P. Kashyap, H. A. Chaudhry, A. Castro, E. M. Kalontar, L. Ilyayev, R. Walker, R. T. Alexander, F. Qian, X. Z. Chen and Y. Yu (2019). "The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex." EMBO Rep **20**(11): e48336.
- Weiler-Guettler, H., W. C. Aird, H. Rayburn, M. Husain and R. D. Rosenberg (1996). "Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos." Development **122**(7): 2271-2281.
- Weissgerber, P., U. Kriebs, V. Tsvilovskyy, J. Olausson, O. Kretz, C. Stoerger, S. Mannebach, U. Wissenbach, R. Vennekens, R. Middendorff, V. Flockerzi and M. Freichel (2012). "Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca<sup>2+</sup> absorption and male fertility much like single D541A pore mutation." J Biol Chem **287**(22): 17930-17941.
- Weissgerber, P., U. Kriebs, V. Tsvilovskyy, J. Olausson, O. Kretz, C. Stoerger, R. Vennekens, U. Wissenbach, R. Middendorff, V. Flockerzi and M. Freichel (2011). "Male fertility depends on Ca<sup>2+</sup> absorption by TRPV6 in epididymal epithelia." Sci Signal **4**(171): ra27.
- Wen, S. R., H. P. Qi, Y. J. Ren, G. J. Liu, F. C. Gong, H. Zhong and S. Bi (2011). "Expression of  $\delta$  Np73 in hippocampus of APP/PS1 transgenic mice following GFP-BMSCs transplantation." Neurol Res **33**(10): 1109-1114.
- Westwood, F. R. (2008). "The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging." Toxicol Pathol **36**(3): 375-384.
- Wiemers, D. O., R. Ain, S. Ohboshi and M. J. Soares (2003). "Migratory trophoblast cells express a newly identified member of the prolactin gene family." J Endocrinol **179**(3): 335-346.

- Wiemers, D. O., L. J. Shao, R. Ain, G. Dai and M. J. Soares (2003). "The mouse prolactin gene family locus." Endocrinology **144**(1): 313-325.
- Williamson, R. C., C. A. Cowell, C. L. Hammond, D. J. Bergen, J. A. Roper, Y. Feng, T. C. Rendall, P. R. Race and M. D. Bass (2014). "Coronin-1C and RCC2 guide mesenchymal migration by trafficking Rac1 and controlling GEF exposure." J Cell Sci **127**(Pt 19): 4292-4307.
- Williamson, R. C., C. A. M. Cowell, T. Reville, J. A. Roper, T. C. S. Rendall and M. D. Bass (2015). "Coronin-1C Protein and Caveolin Protein Provide Constitutive and Inducible Mechanisms of Rac1 Protein Trafficking." J Biol Chem **290**(25): 15437-15449.
- Wissenbach, U., B. A. Niemeyer, T. Fixemer, A. Schneidewind, C. Trost, A. Cavalie, K. Reus, E. Meese, H. Bonkhoff and V. Flockerzi (2001). "Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer." J Biol Chem **276**(22): 19461-19468.
- Wooding, F. and A. Flint (1994). Placentation. Marshall's physiology of reproduction, Springer: 233-460.
- Woods, L., V. Perez-Garcia and M. Hemberger (2018). "Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models." Front Endocrinol (Lausanne) **9**: 570.
- Woudenberg-Vrenken, T. E., A. L. Lameris, P. Weißgerber, J. Olausson, V. Flockerzi, R. J. Bindels, M. Freichel and J. G. Hoenderop (2012). "Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca<sup>2+</sup> absorption." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **303**(7): G879-885.
- Yamamoto, T., K. F. Roby, S. C. Kwok and M. J. Soares (1994). "Transcriptional activation of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme expression during trophoblast cell differentiation." J Biol Chem **269**(9): 6517-6523.
- Yamane, T. (2018). "Mouse Yolk Sac Hematopoiesis." Front Cell Dev Biol **6**: 80.
- Yamashita, S., H. Mizumoto, H. Sawada, Y. Suzuki and D. Hata (2019). "TRPV6 Gene Mutation in a Dizygous Twin With Transient Neonatal Hyperparathyroidism." J Endocr Soc **3**(3): 602-606.
- Yoshimoto, M., E. Montecino-Rodriguez, M. J. Ferkowicz, P. Porayette, W. C. Shelley, S. J. Conway, K. Dorshkind and M. C. Yoder (2011). "Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1468-1473.
- Yuan, J. P., K. Kiselyov, D. M. Shin, J. Chen, N. Shcheynikov, S. H. Kang, M. H. Dehoff, M. K. Schwarz, P. H. Seeburg, S. Muallem and P. F. Worley (2003). "Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors." Cell **114**(6): 777-789.
- Zagranichnaya, T. K., X. Wu and M. L. Villereal (2005). "Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells." J Biol Chem **280**(33): 29559-29569.
- Zon, L. I. (1995). "Developmental biology of hematopoiesis." Blood **86**(8): 2876-2891.
- Zong, L., L. Wang, P. Huang, W. Shao, Y. Song and W. Gou (2013). "High temperature requirement A1 in placental tissues and serum from pre-eclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction." Arch Med Sci **9**(4): 690-696.

Zou, W. B., Y. C. Wang, X. L. Ren, L. Wang, S. J. Deng, X. T. Mao, Z. S. Li and Z. Liao (2020). "TRPV6 variants confer susceptibility to chronic pancreatitis in the Chinese population." Hum Mutat **41**(8): 1351-1357.

## 6.1 Eigene Veröffentlichungen

Mueller D, Jung K, **Winter M**, Rogoll D, Melcher R, Richling E. Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chem.* 2017 Sep 15;231:275-286. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.130. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28450007.

Mueller D, Jung K, **Winter M**, Rogoll D, Melcher R, Kulozik U, Schwarz K, Richling E. Encapsulation of anthocyanins from bilberries - Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chem.* 2018 May 15;248:217-224. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.058. Epub 2017 Dec 16. PMID: 29329847.

Fecher-Trost C, Lux F, Busch KM, Raza A, **Winter M**, Hielscher F, Belkacemi T, van der Eerden B, Boehm U, Freichel M, Weissgerber P. Maternal Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (Trpv6) Is Involved In Offspring Bone Development. *J Bone Miner Res.* 2019 Apr;34(4):699-710. doi: 10.1002/jbmr.3646. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30786075.

**Winter M**, Weissgerber P, Klein K, Lux F, Yildiz D, Wissenbach U, Philipp SE, Meyer MR, Flockerzi V, Fecher-Trost C. Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) Proteins Control the Extracellular Matrix Structure of the Placental Labyrinth. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 18;21(24):9674. doi: 10.3390/ijms21249674. PMID: 33352987; PMCID: PMC7767235.

## 6.2 Vorträge und Präsentationen

5th German Pharm-Tox Summit 2-5 March Leipzig I 2020, 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Physiological function of TRPV6 channels during pregnancy, **M. Winter**, P. Weissgerber, C. Fecher-Trost, V. Flockerzi (Homburg/DE), **Vortrag**

6th German Pharm-Tox Summit 1-3 March 2021 Digital, 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) proteins control the extracellular matrix structure of the placental labyrinth, **M. Winter**, P. Weissgerber, C. Fecher-Trost, V. Flockerzi (Homburg/DE), **Posterpräsentation**

## **7 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.