

Aus der Fachrichtung 2.4
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes

TRPM3: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von: Janine Pöss

geb. am: 22.05.1981 in Saarbrücken

Betreuer: Dr. Niemeyer-Hoth / Prof. Dr. Flockerzi

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	5
2. EINLEITUNG	7
2.1. DER BOTENSTOFF KALZIUM	7
2.2. TRP-KANÄLE	7
2.2.1. Die TRP-Superfamilie	7
2.2.2. Die TRPM-Unterfamilie.....	11
2.3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	17
3. MATERIAL	18
3.1. BEZUGSQUELLEN.....	18
3.2. ARBEITSMATERIALIEN	18
3.3. GERÄTE	19
3.4. CHEMIKALIEN.....	19
3.5. REAGENZIENSYSTEME.....	19
3.6. GRÖßENSTANDARDS.....	19
3.7. KONSTRUKTLISTE.....	20
3.7.1. Oligodesoxynukleotide für TRPM3-Konstrukte	20
3.7.2. Oligodesoxynukleotide für sonstige Konstrukte.....	20
3.7.3. Oligodesoxynukleotide zur DNS-Sequenzierung.....	21
3.8. PLASMIDVEKTOREN	21
3.9. RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME	21
3.10. ANTIKÖRPER.....	22
3.11. BAKTERIENSTÄMME.....	22
3.12. ANTIBIOTIKA	22
3.13. DATENBANKEN UND COMPUTERPROGRAMME.....	22
3.14. PUFFER UND LÖSUNGEN.....	22
3.14.1. Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Experimente	22
3.14.2. Puffer und Lösungen für die proteinbiochemischen Experimente	25
3.15. NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN.....	28
4. METHODEN	29
4.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
4.1.1. Herstellung hitzeschockkompetenter Bakterienzellen.....	29
4.1.2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Elektroporation von DNS	30
4.1.3. Transformation von Plasmid-DNS in kompetente Bakterienzellen.....	30
4.1.4. Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen.....	31
4.1.5. Analyse und Aufreinigung von DNS-Fragmenten mittels DNS-Gelelektrophorese	32
4.1.6. Alkohol-Fällung von DNS.....	33
4.1.7. Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen	34
4.1.8. Dephosphorylierung von DNS durch Alkalische Phosphatase (AP/CIP).....	34
4.1.9. Ligation von DNS- Fragmenten in Plasmidvektoren	35
4.1.10. Amplifizierung von DNS- Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	36
4.1.11. Gezielte Punktmutagenese.....	38
4.1.12. Kolonien-PCR	39

4.1.13. Enzymatische Sequenzierung von Plasmid-DNS nach Sanger	40
4.2. BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM.....	43
4.2.1. Übersicht.....	43
4.2.2. Plasmide und kompetente Bakterien.....	44
4.2.3. Herstellung der Medien	45
4.2.4. Hitzeschocktransformation der Plasmide pBTL und pTRG.....	46
4.2.5. Präparation von pBTL und pTRG	47
4.2.6. Elektroporation von pTRG und pBTL in kompetente Bakterien.....	47
4.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	49
4.3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	49
4.3.2. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	49
4.3.3. Ko-Immunpräzipitation von Proteinen	49
4.3.4. Native Proteinfällung mit Aceton/Methanol.....	51
4.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
4.3.6. Western-Blot Analyse.....	52
4.3.7. Redetektion (Strippen).....	52
5. ERGEBNISSE	53
5.1. TRPM3-INTERAKTIONSTUDIEN (BACTERIOMATCH® II SYSTEM).....	53
5.1.1. Interaktionen innerhalb der Aminotermini	54
5.1.2. Interaktionen zwischen Amino- und Carboxytermini.....	55
5.1.3. Interaktionen des verkürzten Carboxyterminus von TRPM3_β3'H.....	57
5.1.4. Interaktionen innerhalb der Carboxytermini.....	58
5.1.5. Zerstörung der putativen Coiled-Coil-Region von TRPM3	59
5.2. TRPM3 KO-IMMUNPRÄZIPITATION	63
5.2.1. Klonierung des TRPM3-Konstrukts zur Ko-Immunpräzipitation	63
5.2.2. Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation.....	64
6. DISKUSSION	66
6.1. ALTERNATIVES SPLEIßEN IN DER TRP-FAMILIE	66
6.2. INTERAKTIONSTUDIEN MIT DEM BACTERIOMATCH® II SYSTEM.....	67
6.3. MULTIMERISIERUNG VON TRP-KANÄLEN.....	69
6.3.1. Coiled-Coil-Regionen.....	70
6.3.2. Zerstörung der Coiled-Coil-Region von TRPM3	71
6.4. KO-IMMUNPRÄZIPITATION.....	72
7. LITERATURVERZEICHNIS	74
8. DANKSAGUNG	80
9. LEBENS LAUF	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EINHEITEN UND GRÖßEN

cm	Zentimeter
g	Gramm
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
h	Stunde
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
mA	Milliampere
mM	Millimolar
M	Molar
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
min	Minute
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Unit (Enzymaktivität)
V	Volt
% (v/v)	Volumen/Volumen (x ml/100 ml)
% (w/v)	Maße/Volumen (x g/100 ml)

SONSTIGE ABKÜRZUNGEN

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurerest
Ank	Ankyrin-Repeat
Bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin
cDNS	Copy DNS
CIP	Alkalische Phosphatase (<i>calf intestine phosphatase</i>)
dATP	Desoxyadenosin-5' triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5' triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5' triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5' triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5' triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanosin

HA	Hämagglutinin
HEK293	human embryonal kidney cells
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KO-IP	Ko-Immunpräzipitation
LB	Luria Bertani Nährmedium
OD _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PM	Punktmutante
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
Primer	Oligodesoxynukleotid
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	LB-Medium mit 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 0,4 % Glucose
T	Thymidin
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit 0,1 % (w/v) Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
TRP	transientes Rezeptor Potential
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Uridin
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Die Proteine der TRP-Familie bilden Kationenkanäle, welche an verschiedenen sensorischen und zellbiologischen Prozessen beteiligt sind. TRPM3 ist das zuletzt identifizierte Mitglied der TRPM-Familie, einer der drei größten Unterfamilien der TRP-Kanäle. Eine Vielzahl verschiedener TRPM3-Varianten, welche durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts entstehen, konnte bisher gefunden werden. Posttranskriptionale Modifizierungen wurden bei vielen Mitgliedern der TRP-Proteine nachgewiesen und könnten zu der großen funktionellen Diversität dieser Familie beitragen. Die durch alternatives Spleißen entstandenen Varianten eines TRP-Proteins weisen teilweise verschiedene biophysikalische Eigenschaften und Aktivierungsmechanismen auf. Lediglich für eines der vielen Spleißereignisse der TRPM3 prä-mRNS sind die funktionellen Auswirkungen bekannt: alternatives Spleißen innerhalb der Porenregion von TRPM3 bedingt eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften des Kanals für divalente Kationen.

In dieser Arbeit wurden Proteininteraktionen verschiedener TRPM3-Spleißvarianten untersucht, welche alternative erste Exons besitzen und je nach Länge der carboxyterminalen Region unterschiedlich gut aktivierbar sind. Durch Analyse der Interaktionsmuster von TRPM3-Proteinfragmenten mittels eines Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems (Bacteriomatch[®]II) sollten Spleißform-spezifische Interaktionsdomänen identifiziert werden, welche funktionelle Unterschiede der untersuchten TRPM3-Varianten eventuell erklären könnten.

Mittels der durchgeführten Experimente konnten jedoch keine relevanten, Spleißform-spezifischen Unterschiede detektiert werden. Allerdings wurde im Carboxyterminus aller untersuchter TRPM3-Proteine eine starke Interaktionsregion identifiziert, welche eine putative Coiled-Coil-Domäne, ein charakteristisches Strukturmotiv der TRPM-Unterfamilie, aufwies. Die Coiled-Coil-Region wurde durch gezielte Mutation einer strukturell wichtigen Aminosäure zerstört. Dies führte bei weiteren Experimenten mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems zu einem vollständigen Verlust der Interaktionsfähigkeit der mutierten Proteinfragmente.

Des Weiteren wurde die Mutation in das Volllängenprotein TRPM3 eingefügt. Eine nachfolgend durchgeführte Ko-Immunopräzipitation zeigte, dass die mutierte Untereinheit noch in der Lage war, mit anderen Untereinheiten zu interagieren. Die könnte darauf hindeuten, dass die Proteininteraktionen in vivo zusätzliche Interaktionsdomänen benötigen, welche in den Experimenten mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems maskiert waren oder nicht untersucht werden konnten (z.B. innerhalb der Transmembranregionen).

SUMMARY – TRPM3: ANALYSIS OF PROTEIN INTERACTIONS

TRP family proteins form cation channels which take part in different sensory and cell-biological processes. TRPM3 is the last identified member of the TRPM group, one of the three largest TRP channel subfamilies. A multitude of different protein variants are known for TRPM3 which result from alternative splicing of the primary transcript. Posttranscriptional modifications are found in many TRP proteins and could, in part, account for the functional diversity of this family. Different variants of the same protein can differ in their biophysical properties and in their mechanism of activation. For one of the numerous splice events of the TRPM3 protein the functional consequences have been investigated. Alternative splicing within the pore region of TRPM3 modifies the channel's permeability for divalent cations.

In the framework of this thesis, protein interactions of different TRPM3 splice variants were analysed using the Bacteriomatch[®]II system. The investigated TRPM3 variants differ in their first exon as well as in the length of their carboxyterminal tail. These differences appear to have an effect on the ability to form functional channels. The aim of the experiments was to identify spliceform specific interaction domains which could possibly account for the functional differences of the variants. However, no relevant spliceform specific differences could be detected. We identified a strong interaction domain in the carboxterminal end of all TRPM3 variants which contained a putative coiled-coil region, a characteristic structural pattern of the TRPM family. Subsequently, the coiled-coil region was mutated by directed point mutagenesis and tested for its ability to interact. Additional experiments using the Bacteriomatch II system revealed that the mutated protein fragments had lost their ability to perform protein interactions.

Furthermore, the point mutation was inserted in the full-length TRPM3 protein. However, co-immunoprecipitation experiments revealed that the mutated channel subunit was still able to interact with wild type subunits. Apparently, in vivo interactions of full length channel proteins might require additional interaction sites that were either not uncovered or not feasible to investigate (e.g. transmembrane domains) in the Bacteriomatch[®]II analysis.

2. EINLEITUNG

2.1. DER BOTENSTOFF KALZIUM

Kalziumionen sind ubiquitär vorkommende, intrazelluläre Botenstoffe. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei zahlreichen biochemischen und physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Kontraktion von Herz- und Skelettmuskelzelle und der Freisetzung von Neurotransmittern. Die Konzentration an freiem Kalzium, $[Ca^{2+}]$, ist in den verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedlich. Im endoplasmatischen Retikulum und im Extrazellulärraum ist sie beispielsweise 10000-fach höher als im Zytosol. An der strengen Regulation und Aufrechterhaltung dieser Konzentrationsgradienten sind ATP-abhängige Kalziumpumpen und Natrium-Kalzium-Austauscher beteiligt, welche in der Zellmembran und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Infolge einer Stimulation der Zelle steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration schlagartig an, wobei Ca^{2+} einerseits aus intrazellulären Speichern mobilisiert wird und andererseits durch spannungsabhängige oder ligandenaktivierte Kalziumkanäle einströmt. Viele Mitglieder der Familie der TRP-Kanäle sind an den Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt, indem sie den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum vermitteln. Da die meisten TRP-Kanäle jedoch nicht sehr selektiv sind, ist auch der Na^+ -Einstrom von physiologischer Bedeutung.

2.2. TRP-KANÄLE

2.2.1. DIE TRP-SUPERFAMILIE

Der Namensgeber der TRP-Familie ist ein kalzium-permeabler Ionenkanal, welcher bei der Phototransduktion im Fliegenauge eine essentielle Rolle spielt. Bei einer spontan aufgetretenen *Drosophila melanogaster*-Mutante wurde ein Elektroretinogramm durchgeführt. Die detektierten Photorezeptorpotenziale waren im Vergleich zu denen des Wildtyps verändert: Die durch einen langen Lichtreiz hervorgerufene Depolarisation war bei dem Wildtyp anhaltend, bei der Mutante hingegen lediglich vorübergehend („transient“) (Cosens and Manning, 1969). Die spontane Mutation betraf den Ionenkanal, der bei dem Wildtyp für die länger anhaltende Potenzialänderung verantwortlich war. Basierend auf dieser Beobachtung wurden das mutierte Gen und dessen Genprodukt, der Ionenkanal, TRP genannt (Hardie and Minke, 1992; Montell and Rubin, 1989). Die Bezeichnung TRP steht hierbei für „transient receptor potential“.

Basierend auf Aminosäuresequenz-Homologien kann die Superfamilie der TRP-Kanäle in sieben Unterfamilien eingeteilt werden (Pedersen et al., 2005). Die drei Größten sind die TRPC- („classical“ oder „canonical“), die TRPM- („Melastatin“) und die TRPV- („Vanilloid“) Familie (Montell et al., 2002). Des Weiteren sind die TRPML- („Mucolipin“), die TRPP- („Polycystin“), die TRPA- („Ankyrin“) und die TRPN-Gruppe („no mechanoreceptor potential C“) bekannt.

Abbildung 1 zeigt den phylogenetischen Stammbaum der TRP-Superfamilie und stellt den Verwandtschaftsgrad der einzelnen Mitglieder untereinander graphisch dar.

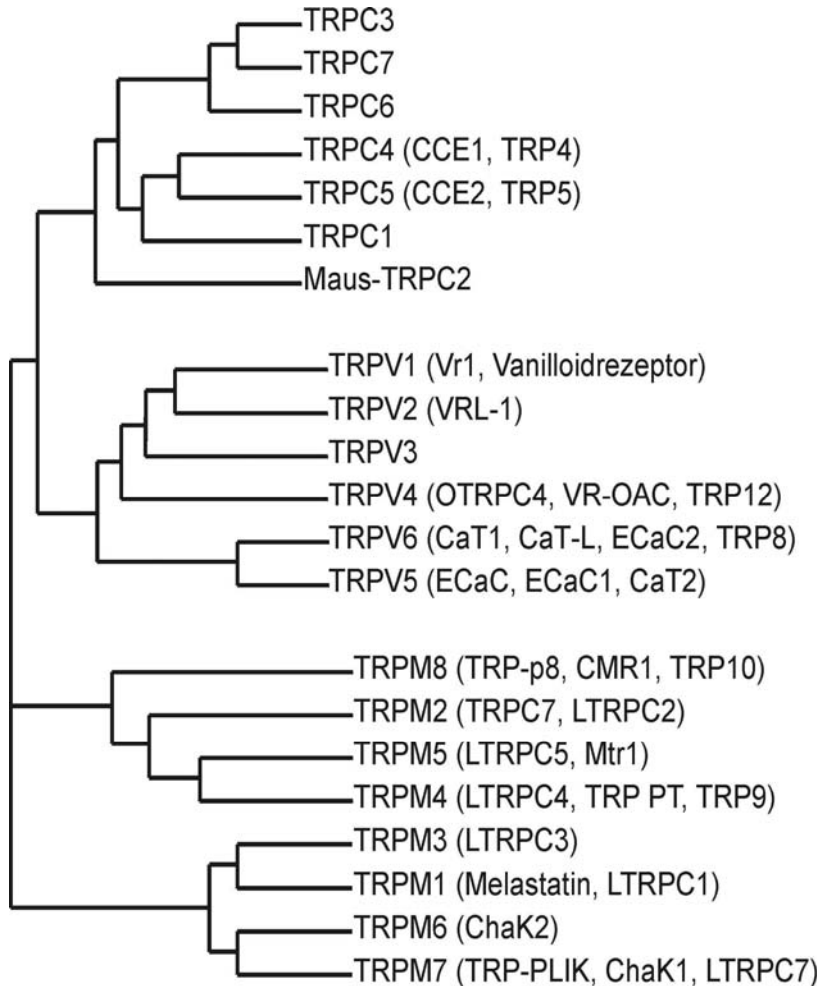


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der drei größten Untergruppen der TRP-Superfamilie, in Klammern angegeben sind ältere Bezeichnungen der jeweiligen TRP-Mitglieder.

ALLGEMEINE STRUKTUR UND FUNKTION VON TRP-KANÄLEN

Die meisten TRP-Proteine sind Kationenkanäle. Als strukturelles Charakteristikum besitzen die Mitglieder der TRP-Superfamilie sechs putative Transmembrandomänen, welche als S1-S6 bezeichnet werden. Zwischen den Transmembranregionen fünf und sechs befindet sich eine putative Porenregion. Amino- und Carboxytermini sind intrazellulär lokalisiert (Clapham, 2003; Montell et al., 2002).

Die drei größten Unterfamilien weisen jeweils charakteristische Strukturelemente auf. Im Aminoterminus aller Mitglieder der Familien TRPV, TRPC und auch von TRPA1 sind beispielsweise so genannte Ankyrin repeats lokalisiert. Die TRPM-Familie hingegen weist dieses Strukturmotiv nicht auf. Ankyrin repeats spielen eine Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Alle Mitglieder der TRPM-Familie besitzen eine carboxyterminale Coiled-Coil-Region. Auch Mitglieder der TRPC- und teilweise der TRPV-Familie weisen eine oder mehrere Coiled-Coil-Regionen auf, deren Positionen bezüglich des Amino- oder Carboxyterminus jedoch nicht konserviert sind. Mehr oder weniger stark konserviert ist hingegen die hinter S6 gelegene, so genannte TRP-Domäne. Dieses etwa 23 bis 25 Aminosäurereste umfassende Strukturmotiv beginnt mit der Aminosäuresequenz „EWKFAR“, der so genannten „TRP-Box“ (Montell, 2005). Die Funktion der TRP-Domäne ist noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie unter anderem eine PI(4,5)P₂-Interaktionsstelle darstellen könnte (Rohacs et al., 2005). In den Unterfamilien TRPP und TRPML ist zwischen den ersten beiden Transmembrandomänen eine etwa 200 Aminosäurereste umfassende, extrazelluläre Schleife zu finden. Die Identifikation der beschriebenen Strukturmerkmale von TRP-Kanälen erfolgte durch Analysen der Primärstrukturen mittels geeigneter Algorithmen. Bisher wurde außer der carboxyterminalen Proteinkinasedomäne von TRPM7 (Yamaguchi et al., 2001) und der Ankyrin repeat Region von TRPV2 (Jin et al., 2006; McCleverty et al., 2006) kein TRP-Protein kristallisiert. TRP-Proteine besitzen im Gegensatz zu den klassischen spannungsabhängigen Kanälen keinen Spannungssensor, welcher bei Letzteren in Form regelmäßig angeordneter, positiv geladener Aminosäurereste im Bereich der vierten Transmembrandomäne lokalisiert ist.

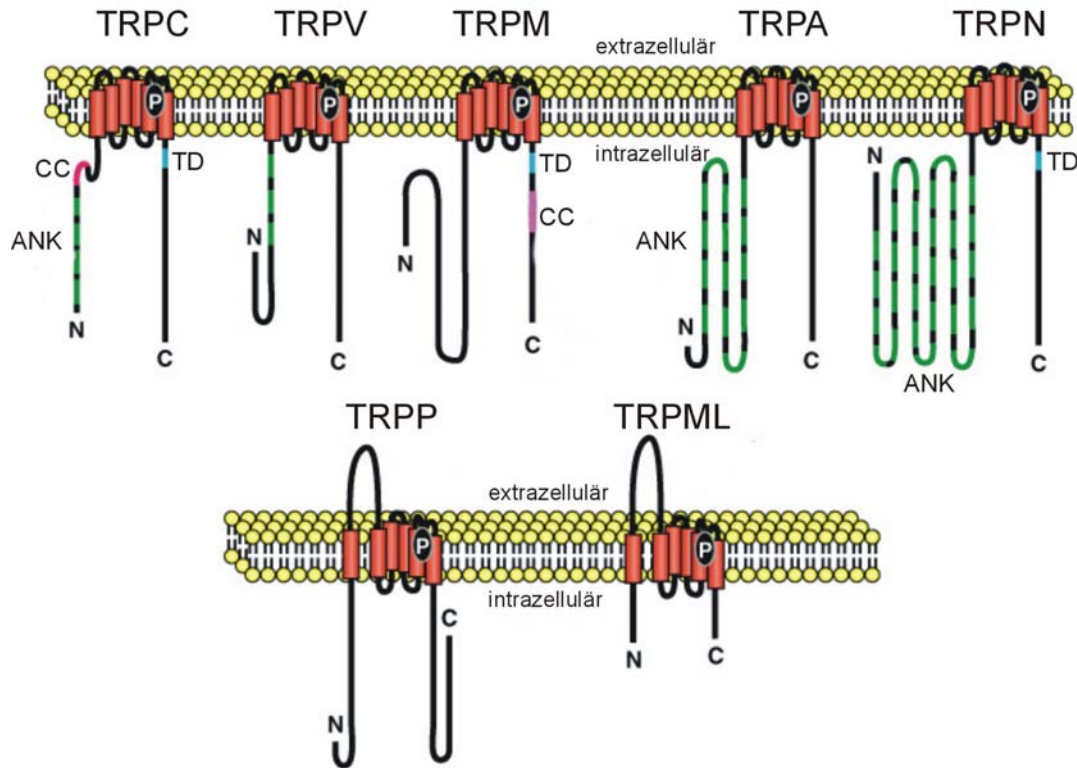


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung wichtiger Strukturmerkmale der TRP-Proteine aller Unterfamilien am Beispiel jeweils eines Mitgliedes; gezeigt sind TRPC1, TRPV1, TRPM8*, TRPA1, TRPN1, PKD2, MLN1: ANK, Ankyrin repeats; TD, TRP-Domäne; CC, Coiled Coil; P, Porenregion; die Transmembrandomänen sind als rote Zylinder dargestellt, N steht für Aminoterminus, C für Carboxyterminus. * TRPM6/7 besitzen als einzige Mitglieder der TRPM-Unterfamilie eine carboxyterminale Proteinkinasedomäne, hier nicht gezeigt.

Trotz beschriebener struktureller Ähnlichkeiten differieren die einzelnen Mitglieder der TRP-Familie teilweise stark in ihren funktionellen Eigenschaften wie Permeabilität, Selektivität und Aktivierungsmechanismen. Die meisten TRP-Kanäle sind mehr oder minder permeabel für Kalziumionen. Eine Ausnahme bilden TRPM4 und TRPM5, welche lediglich monovalente Kationen leiten und somit für Kalzium impermeabel sind (Hofmann et al., 2003; Launay et al., 2002). Bisher sind bis auf wenige Ausnahmen keine spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten für TRP-Kanäle gefunden worden. TRP-Proteine erfüllen ein breit gefächertes Spektrum an Funktionen, wobei sie besonders in der Sinnesphysiologie eine zentrale Rolle spielen. So sind sie beispielsweise wichtig für den Gehör-, den Geruchs- und den Geschmackssinn sowie für die Wahrnehmung von Temperatur und Berührung. In einigen Fällen ist die Expression von TRP-Kanälen auf spezialisierte Zellen beschränkt, viele TRP-Proteine sind jedoch an ubiquitären Prozessen beteiligt wie beispielsweise der Wahrnehmung von osmotischem Stress, der Regulation der intrazellulären Magnesiumkonzentration oder der Erhaltung der Kalziumhomöotase (Montell, 2005; Pedersen et al., 2005). TRP-Kanäle spielen auch in pathophysiologischen Abläufen eine Rolle.

Der Erbkrankheit „Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie“ (HSH) liegen beispielsweise Mutationen im TRPM6-Gen zugrunde (Schlingmann et al., 2002). Eine verstärkte Expression von TRPV6 und TRPM8 korreliert mit der Progressionstendenz von Prostatakarzinomen (Bidaux et al., 2005; Fixemer et al., 2003), eine verminderte Expression von TRPM1 mit der Progression maligner Melanome (Duncan et al., 2001). Bei der neurodegenerativen, lysosomalen Speicherkrankheit Mukopolysaccharidose Typ IV ist das defekte Gen ein entfernt verwandtes Mitglied der TRP-Familie (Altarescu et al., 2002). Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) beruht in 20% auf einer Mutation des Gens PKD2, welches für den Ionenkanal TRPP2 kodiert (Kiselyov et al., 2007; Qamar et al., 2007).

2.2.2. DIE TRPM-UNTERFAMILIE

ALLGEMEINE CHARAKTERISTIKA

Die TRPM-Unterfamilie besitzt acht Mitglieder (Montell, 2005). Die Namensgebung dieser Gruppe erfolgte nach dem ersten bekannten Mitglied, TRPM1 oder auch Melastatin (Duncan et al., 1998). Entsprechend der Aminosäure-Sequenzhomologie kann man die TRPM-Familie in weitere Untergruppen untergliedern: TRPM1/3, TRPM4/5, TRPM6/7 und TRPM2/8. Drei Mitglieder der TRPM-Familie, TRPM2, TRPM6 und TRPM7, sind so genannte „Chanzyme“. Hierunter versteht man funktionelle Ionenkanäle, welche an ihrem Carboxyterminus Enzymdomänen aufweisen (Cahalan, 2001; Perraud et al., 2001). Die Anzahl der Transmembranregionen der TRPM-Proteine ist noch nicht sicher bekannt. Man nimmt zwar an, dass auch die Mitglieder dieser Familie sechs Transmembranregionen aufweisen, für TRPM2 wurden jedoch in einer Studie sieben (Nagamine et al., 1998); für TRPM8 in einer Studie sieben (Tsavaler et al., 2001), in einer anderen sechs bis acht (Peier et al., 2002) Transmembranregionen vorhergesagt. Im Vergleich zu der TRPC- und der TRPV-Unterfamilie ist der Aminoterminus der TRPM-Proteine deutlich länger und enthält keine Ankyrin repeats. Im Aminoterminus fast aller TRPM-Proteine ist eine etwa 700 Aminosäurereste lange TRPM-Homologieregion lokalisiert. Hierbei handelt es sich um ein strukturelles Charakteristikum der TRPM-Gruppe, dessen Bedeutung und Funktion noch weitgehend unklar ist. Carboxyterminal befindet sich die TRP-Domäne. Die Variation der Gesamtlänge von TRPM-Proteinen beruht auf der unterschiedlichen Länge der Carboxytermini.

COILED-COIL-REGIONEN

Carboxyterminal lokalisierte, putative Coiled-Coil-Regionen stellen neben den oben beschriebenen Strukturmotiven ein weiteres Charakteristikum der TRPM-Unterfamilie dar (Abbildung 3). Coiled-Coil-Domänen sind ubiquitär vorkommende Proteinmotive, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (Lupas and Gruber, 2005; Woolfson, 2005). Sie bestehen meist aus zwei bis fünf parallel oder antiparallel zu einem „Supercoil“ angeordneten α -Helices.

In diesen wiederholt sich ein Motiv aus sieben Aminosäureresten (Heptaden), welche mit den Buchstaben a bis g bezeichnet werden. Die meist hydrophoben Aminosäurereste a und d, welche im Inneren des Supercoils lokalisiert sind, bilden die Interaktionsfläche (Arndt et al., 2002; Burkhard et al., 2001; Lupas, 1996). Die übrigen, polaren oder geladenen, Aminosäurereste können an intra- oder interhelikalen Interaktionen beteiligt sein und so zu Spezifität und Stabilität des Supercoils beitragen. Die von den Aminosäureresten e und g gebildeten Interaktionen sind hierbei für die Spezifität besonders bedeutsam.

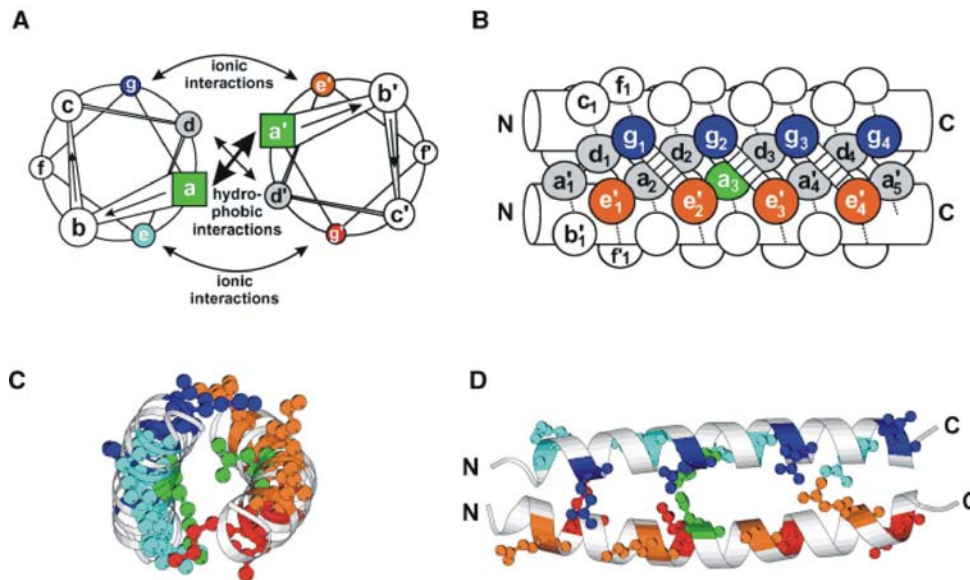


Abbildung 3: schematische Darstellung eines parallelen, dimeren Coiled-Coil. A: Querschnitt durch das Coiled-Coil-Dimer. Die hydrophoben Aminosäurereste der Positionen a und g bilden eine Interaktionsfläche, die hydrophilen Reste e und g können ebenfalls interagieren. B: Die Zylinder stellen das Helixgerüst dar, die Kreise die Seitenketten der Aminosäurereste. C, D: Bändermodell des Coiled-Coil-Dimers; in C ist ein Querschnitt dargestellt, in D eine Seitenansicht (Mason und Arndt, ChemBioChem 2004).

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass Coiled-Coil-Regionen eine entscheidende Rolle bei der Homomultimerisierung der beiden TRPM-Proteine TRPM8 und TRPM2 spielen (Erlor et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006).

DIE MITGLIEDER DER TRPM-UNTERFAMILIE

TRPM2 ist ein nicht selektiver Kationenkanal, welcher stark im Gehirn exprimiert wird (Fonfria et al., 2006; Hill et al., 2006). Im Aminoterminus befindet sich eine Calmodulin-Bindungsstelle (Tong et al., 2006), im proximalen Carboxyterminus ein TRP-Motiv, welches von einer putativen Coiled-Coil-Region gefolgt wird. Als eines der drei Chanzyme der TRPM-Familie besitzt TRPM2 eine ADP-Ribosepyrophosphatase-Aktivität (NUDT9-H-Domäne) im Bereich des distalen Carboxyterminus (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). TRPM2 wird durch ADP-Ribose sowie durch Substanzen, welche den zellulären Redoxstatus beeinflussen, aktiviert (Kraft et al., 2004; Perraud et al., 2001).

Die Aktivierung infolge der Veränderung des Redoxstatus scheint durch die Bindung von NAD⁺ an die NUDT9-Domäne zu erfolgen (Sano et al., 2001). Dies könnte auf eine Rolle von TRPM2 bei dem Prozess des Hypoxie-induzierten Zelltods hindeuten.

Die beiden weiteren Chanzyme dieser Gruppe, TRPM6 und TRPM7, enthalten eine atypische Proteinkinaseaktivität im Carboxyterminus (Runnels et al., 2001), welche Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der α -Kinase-Familie aufweist. Die Kinasedomäne von TRPM7 wurde kristallisiert und analysiert (Yamaguchi et al., 2001). TRPM7 wird ubiquitär exprimiert, TRPM6 vor allem in den Epithelien der Niere und des Gastrointestinaltrakts. Beide Kanäle sind für Magnesiumionen sowie für verschiedene andere divalente Kationen permeabel (Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004a) und werden durch die Magnesiumkonzentration reguliert. Wie bereits erwähnt können TRPM6 und TRPM7 Heteromultimere bilden (Chubanov et al., 2005; Chubanov et al., 2004). TRPM6 spielt in der Niere und im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle bei der Reabsorption von Magnesium (Voets et al., 2004b). Nach einem funktionellen Knock-Out von TRPM7 kann die Zelllinie DT-40 B lediglich in einem magnesiumreichen Medium überleben. Dies deutet auf eine für diese Zellen lebensnotwendige Funktion des TRPM7-vermittelten Magnesiumeinstroms hin (Nadler et al., 2001). Des Weiteren scheint TRPM7 an dem Prozess des hypoxischen, neuronalen Zelltods beteiligt zu sein (Aarts et al., 2003). Eine Mutation des TRPM7-Gens führt beim Zebrafisch zu Wachstumsretardierung und zu Skelettdeformitäten (Elizondo et al., 2005). Dies kann auf eine wichtige Rolle von TRPM7 bei der Skeletogenese schließen lassen.

TRPM4 und TRPM5 sind spannungsabhängige, monovalent-selektive Kationenkanäle. Sie sind impermeabel für Kalzium, scheinen aber durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert zu werden (Hofmann et al., 2003; Launay et al., 2004; Nilius et al., 2003). TRPM5 wird in Geschmacksrezeptorzellen der Zunge exprimiert und ist dort an der Wahrnehmung verschiedener Geschmacksqualitäten beteiligt (Perez et al., 2003; Zhang et al., 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass TRPM4 in Mastzellen den Ca²⁺-Einstrom und somit die Freisetzung von Histamin sowie anderer Entzündungsmediatoren reguliert (Vennekens et al., 2007).

TRPM8 ist im Gegensatz zu seinem nächsten Verwandten TRPM2 kein Chanzym. Es wird besonders stark in den sensorischen Neuronen der Spinalganglien und des Trigeminalganglions exprimiert (Clapham, 2003; Peier et al., 2002). In maligne entartetem Prostatagewebe und auch in Gewebe von Brust-, Kolon- und Hauttumoren ist die Expression von TRPM8 im Vergleich zu gesundem Gewebe hochreguliert (Tsavaler et al., 2001). Des Weiteren wird TRPM8 in sensorischen Nervenfasern der Zunge exprimiert (Abe et al., 2005). TRPM8 ist ein nichtselektiver, kalziumpermeabler Kationenkanal. Er wird durch Kälte (8-28°C) sowie durch verschiedene Substanzen aktiviert, welche ein Kältegefühl hervorrufen wie beispielsweise Menthol, Icilin und Eukalyptol (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Dies geschieht durch eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven (Voets et al., 2004a). Bei TRPM8 handelt es sich somit um einen Kälterezeptor in sensorischen Neuronen.

Das Protein TRPM1 („Melastatin“) ist das erste Mitglied und der Namensgeber der TRPM-Unterfamilie. Es wurde erstmals in Melanomzelllinien identifiziert. Die Expression von TRPM1 korreliert invers mit dem Metastasierungsrisiko und der Aggressivität maligner Melanome (Duncan et al., 2001; Duncan et al., 1998), weshalb vermutet wurde, TRPM1 könne ein potenzielles Tumorsuppressorprotein darstellen. Zukünftig könnte TRPM1 als diagnostischer Marker eingesetzt werden. Obwohl TRPM1 das erste klonierte Mitglied der TRPM-Unterfamilie darstellt, sind seine biophysikalischen Eigenschaften noch weitgehend unklar. Wie auch bei seinem nächsten Verwandten TRPM3 sind mehrere verschiedene Spleißvarianten bekannt.

TRPM3

TRPM3 ist das am spätesten identifizierte Mitglied der TRPM-Unterfamilie. Es bildet zusammen mit TRPM1 eine der Untergruppen der TRPM-Familie. Das TRPM3-Gen kodiert für eine große Anzahl verschiedener Spleißvarianten (Abbildung 4). Anette Lis und Stephan Philipp klonierten aus dem Gehirn der Maus fünf verschiedene cDNS, welche als mTRPM3_α1-5 bezeichnet werden (Oberwinkler et al., 2005). Die von diesen cDNS kodierten Proteine sind 1699 bis 1721 Aminosäurereste lang. (Grimm et al. 2003) klonierten eine weitere TRPM3-Variante nach Identifikation dreier überlappender, partieller cDNS-Klone in menschlichem Hirn- und Nierengewebe. Dieses Protein weist eine Länge von 1325 Aminosäureresten auf und wird als hTRPM3₁₃₂₅ bezeichnet. Das komplette Transkript konnte bisher jedoch noch nicht kloniert werden.

mTRPM3_α1-5 und hTRPM3₁₃₂₅ weisen einige strukturelle Unterschiede auf. Den mTRPM3_α-Varianten fehlt Exon 2, wodurch Exon 1 direkt von Exon 3 gefolgt wird. Dem Protein hTRPM3₁₃₂₅ hingegen fehlt Exon 1. Somit stellt das in mTRPM3_α1-5 nicht vorhandene Exon 2 das erste Exon von hTRPM3₁₃₂₅ dar. Durch alternatives Spleißen ist der Carboxyterminus von hTRPM3₁₃₂₅ um etwa 350 Aminosäurereste kürzer als der der mTRPM3_α-Varianten. Zudem differieren die terminalen Aminosäurereste von hTRPM3₁₃₂₅ von der Sequenz des längeren Carboxyterminus der mTRPM3_α-Varianten.

Lee et al. (2003) klonierten sechs TRPM3-Varianten aus einer cDNS-Bibliothek aus menschlichem Nierengewebe. Diese Varianten werden als hTRPM3_a-f bezeichnet und weisen Längen von 1544 bis 1579 Aminosäureresten auf. Die Carboxytermini von hTRPM3_a-f sind identisch mit denen von mTRPM3_α1-5. Im Aminoterminus hingegen sind hTRPM3_a-f im Vergleich zu mTRPM3_α1-5 um 155 Aminosäurereste verkürzt. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass es sich bei mTRPM3_a-f um vollständige cDNS-Sequenzen handelt.

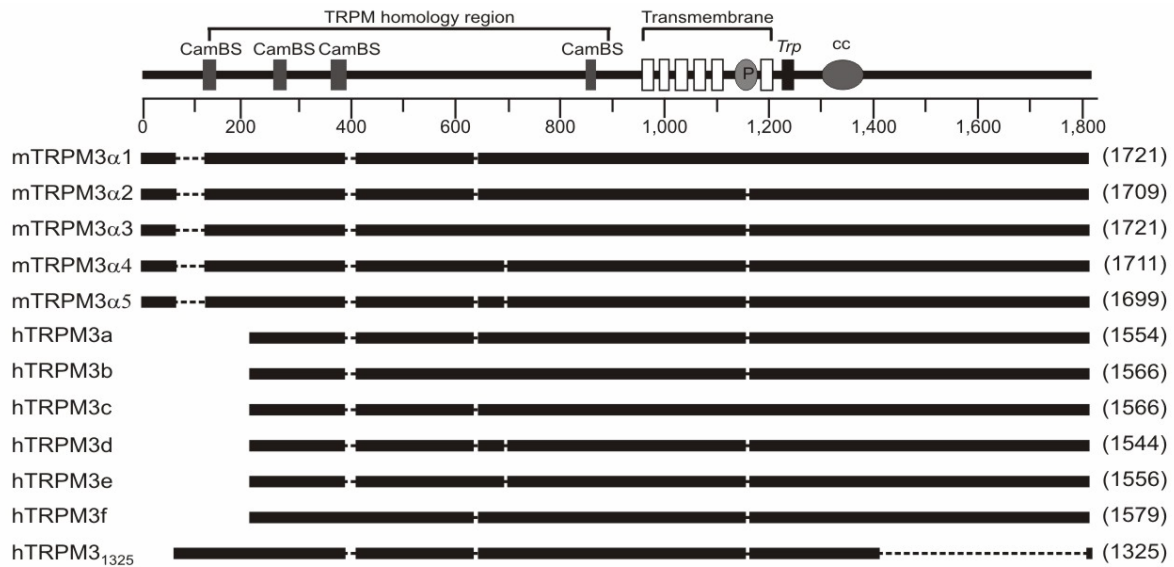


Abb. 4: Schematische Darstellung des TRPM3-Proteins. Gezeigt sind vier putative Calmodulin-Bindungsstellen (CamBS), die TRPM Homologieregion, sechs Transmembrandomänen mit der putativen Porenregion (P), die TRP-Domäne (*Trp*) und die carboxyterminale Coiled-Coil-Region (cc). Gezeigt ist zudem eine Übersicht über die verschiedenen Spleißvarianten von TRPM3, die Anzahl der Aminosäurereste ist jeweils in Klammern angegeben. (Entnommen aus: Oberwinkler and Philipp, 2007).

Strukturell weisen alle TRPM3-Varianten einige typische Charakteristika von TRP-Kanälen auf: sechs putative Transmembrandomänen, ein TRP-Motiv und eine carboxyterminal lokalisierte Coiled-Coil-Region (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Im Gegensatz zu Mitgliedern der TRPV- und TRPC-Gruppen besitzen TRPM3-Kanäle keine Ankyrin repeats. Im Aminoterminus von TRPM3 ist eine etwa 700 Aminosäurereste lange TRPM-Homologieregion lokalisiert. Man findet dieses Strukturmotiv in den Varianten mTRPM3 α 1-5, hTRPM3₁₃₂₅ und teilweise ebenfalls in den aminoterminal verkürzten Varianten hTRPM3 α a-f. Ein weiteres Strukturmerkmal von TRPM3 sind vier putative Calmodulin-Bindungsstellen, welche im Aminoterminus lokalisiert sind. Die erste dieser Calmodulin-Bindungsstellen wird von Exon 2 kodiert, weshalb sie lediglich für die Variante hTRPM3₁₃₂₅ vorhergesagt werden kann (Abbildung 4).

Beim Menschen wird TRPM3 besonders stark in Nierengewebe exprimiert. Hier konnten TRPM3-Transkripte mittels semiquantitativer PCR, Northern Blot und in-Situ-Hybridisierung nachgewiesen werden (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003). TRPM3 wurde zudem mittels Westernblot in Membranfraktionen von menschlichem und bovinem Nierengewebe nachgewiesen. Im Nierengewebe der Maus scheint TRPM3 nicht exprimiert zu werden. In Hirngewebe wurde die Expression von TRPM3 mittels Northern Blot (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005) und in-Situ-Hybridisierung nachgewiesen, wobei die stärksten Signale von Epithelzellen des Plexus choroideus erhalten wurden (Oberwinkler et al., 2005). Dies könnte auf eine Rolle von TRPM3 bei der Kationenhomöostase des Liquors hindeuten.

Mittels RT-PCR wurde eine starke Expression von TRPM3 in verschiedenen Gehirnbereichen (Basalganglien, Hippocampus, Kleinhirn), den Ovarien und den Nebenhoden der Maus nachgewiesen (Kunert-Keil et al., 2006). Eine weitere Arbeit wies ebenfalls mittels RT-PCR eine starke Expression von TRPM3 in menschlichem Hirn-, Nieren- und Fettgewebe nach (Fonfria et al., 2006). TRPM3-Transkripte wurden auch in vielen weiteren Geweben gefunden, beispielsweise in einer Neuroblastomzelllinie (Bollimuntha et al., 2005), in Neuronen der Trigemininalganglien (Nealen et al., 2003), in Leber, Pankreas und Rückenmark (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003). Zudem wurde die Expression von TRPM3 im menschlichen Auge nachgewiesen (Oberwinkler et al., 2005).

TRPM3-Kanäle sind bei heterologer Expression in HEK 293 Zellen konstitutiv aktiv (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Bei fluorometrischen Messungen wiesen HEK-Zellen, welche TRPM3-Proteine mit der kürzeren Porenregion (TRPM3_α2, hTRPM3₁₃₂₅) exprimierten, eine höhere basale zytosolische Ca²⁺-Konzentration auf als Kontrollzellen. Nach Zugabe von Ca²⁺ zu einer Ca²⁺-freien extrazellulären Lösung zeigte die zytosolische Ca²⁺-Konzentration in TRPM3-exprimierenden Zellen einen deutlich größeren Anstieg als die der Kontrollzellen. Elektrophysiologische Experimente bestätigten die konstitutive Aktivität von TRPM3-Kanälen mit der kürzeren Porenregion (Grimm et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005) und konnten nachweisen, dass die Spleißvariante mit der längeren Porenregion (TRPM3_α1) ebenfalls konstitutiv aktiv ist (Oberwinkler et al., 2005).

Die Aktivität von TRPM3_α1 und von TRPM3_α2 kann durch intrazelluläre Magnesiumionen gehemmt werden (Oberwinkler et al., 2005). Interessanterweise tritt dieses Phänomen ebenfalls bei den engen Verwandten TRPM6 und TRPM7 auf (Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004b).

Extrazelluläre, divalente Kationen blockieren die auswärts-rektifizierenden Ströme durch TRPM3 unabhängig von der Länge der Porenregion (Oberwinkler et al., 2005). Monovalente Kationen hingegen reduzieren die auswärts-rektifizierenden Ströme der Variante mit der längeren Porenregion (TRPM3_α2), nicht jedoch der Variante mit der kürzeren Porenregion (TRPM3_α1).

Die Aktivierungsmechanismen von TRPM3 sind noch nicht vollständig geklärt. Auf die Zugabe einer hypotonen, extrazellulären Lösung reagierten HEK-Zellen, welche mit hTRPM3₁₃₂₅-cDNS transfiziert wurden, mit einem deutlich stärkeren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration als nicht transfizierte Kontrollzellen (Grimm et al., 2003). Hypotone Bedingungen konnten ebenfalls Ströme in TRPM3-transfizierten HEK-Zellen auslösen (Grimm et al., 2003). Zusammen mit der Expression von TRPM3 in Nierengewebe könnte dies auf eine Rolle dieses Proteins bei der renalen Osmoregulation hindeuten.

Das endogene Sphingolipid D-erythro-sphingosin (SPH) konnte in hTRPM3₁₃₂₅ exprimierenden Zellen einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration induzieren (Grimm et al., 2005), welcher unabhängig von der Funktion der Proteinkinase C war. Auch durch Zugabe von 5µM Thapsigargin und 1 µM Xestospongin C konnte der Anstieg der Kalziumkonzentration nicht inhibiert werden. Somit scheint die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺- Speicher nicht an den Effekten von SPH auf TRPM3-exprimierende Zellen beteiligt zu sein.

Dies könnte bedeuten, dass Sphingosin in der Lage ist, TRPM3 direkt zu aktivieren und dass TRPM3 an der Sphingolipid-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist (Grimm et al., 2005).

2.3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Ein bedeutendes Charakteristikum von TRPM3 ist die große Anzahl an Proteinvarianten, welche durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts entstehen. Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse von Proteininteraktionen verschiedener TRPM3-Spleißvarianten. Mittels eines Bakterien-zwei-Hybrid-Systems (Bacteriomatch[®]II Two-Hybrid-System von Stratagene) sollte untersucht werden, ob sich die funktionellen Unterschiede zwischen den einzelnen TRPM3-Varianten eventuell durch Spleißform-spezifische Protein-Interaktionsmodule erklären lassen.

3. MATERIAL

3.1. BEZUGSQUELLEN

Abimed (Langenfeld, D)
AmershamPharmacia Biotec (Freiburg, D)
AppliChem (Darmstadt, D)
Applied Biosystems (Foster City, USA)
BD Biosciences (Bedford, USA)
Boehringer Ingelheim (Ingelheim, D)
Beckman (München, D)
Bio-Rad Laboratories (München, D)
Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Cambrex (Taufkirchen, D)
Charles River Laboratories
(Wilmington, USA)
Eppendorf (Hamburg, D)
Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Fuji (Düsseldorf, D)
GFL (Burgwedel, D)
Gilson (Bad Camberg, D)
Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Hermle (St. Leon-Rot, D)
Holten (Allerød, DK)
IKA (Staufen, D)
Integra Biosciences (Fernwald, D)
Invitrogen (San Diego, USA)
Jackson Laboratory (Main, USA)
Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Li-Cor (Lincoln, USA)
Memmert (Schwabach, D)
Merck (Darmstadt, D)
MWG Biotech (Ebersberg, D)
New England Biolabs (NEB, Frankfurt, D)
New Brunswick Scientific (Edison NJ, USA)
Nunc (Roskilde, DK)
Operon (Köln, D)
Pierce (Rockford, USA)
Peqlab (Erlangen, D)
Promega (Mannheim, D)
Qiagen (Hilden, D)
Roche (Basel, CH)
Roth (Karlsruhe, D)
Sarstedt (Nümbrecht, D)
Sigma (Deisenhofen, D)
Stratagene (Heidelberg, D)
Uniequip (Martinsried, D)
Whatman (Brentford, UK)
Wheaton (New Jersey, USA)
Zeiss (Oberkochen, D)

3.2. ARBEITSMATERIALIEN

Dialyseschläuche
96-Lochplatten mit Filtrationseinheit:

Pipettenspitzen mit Filter, steril:
Nitrocellulose-Membran:
Röntgenfilme:
Sephärose zum Befüllen der Filterplatten:
Sterile Gefäße für Labor und Zellkultur:
Sterile Einmalpipetten für Labor/Zellkultur:
Elektroporationsküvetten:

Petrischalen:

Dialysis Tubing MWCO 12000 (Sigma)
Whatman Microplate Devices Unifilter
(Whatman)
Filter Tip FT 20, 200 und 1000 (Greiner)
Hybond N (Amersham Pharmacia)
Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia)
Sephadex™ G-50 (Amersham Pharmacia)
Falcon (BD Biosciences)
Serological pipettes (Sarstedt)
Gene Pulser Cuvette 0,1/0,2 cm electrode gap 50
(Biorad)
94 x 16 mm (Greiner), 150 x 20 mm (Sarstedt)

3.3. GERÄTE

DNS Sequenzierungsapparat:	Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Elektroporationsgerät:	Gene Pulser (Bio-Rad)
Schüttelinkubator:	Scientific Series 25 Incubator Shaker
Gelelektrophorese-Apparatur:	Biorad Model 3000 Xi (Bio-Rad)
Phosphorimager:	Fujifilm BAS-2500 (Fuji)
Photometer:	Gene quant II (Amersham Pharmacia)
Pipetten:	Pipetman (Gilson)
Pippettierhilfe:	Pipetboy acu (Integra Biosciences)
Schüttelwasserbad:	WB 14 (Mettler)
Sicherheitswerkbank:	Kötterman 8511 (Köttermann)
Thermocycler:	Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)
	My Cycler™ Thermal Cycler (Bio Rad)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf)
	Kühlzentrifuge J2-HS centrifuge (Beckman)
	96-Lochplatten- Zentrifuge 4°- 15°C (Sigma)
Reinstwasseranlage:	Reinstwassersystem Clear plus (SG-Wasseraufbereitung)
UV-Tisch:	Transilluminator 4000 (Stratagene)

3.4. CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia, Boehringer Ingelheim, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen.

3.5. REAGENZIENSYSTEME

ABI Prism Big Dye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V 1.1 (Applied Biosystems)
Eppendorf Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf)
Qiagen Plasmid Mini Kit, Maxi Kit und Spin Mini Kit (Qiagen)

3.6. GRÖßENSTANDARDS

M9-Marker (Eigenherstellung, U. Wissenbach)
Prestained Proteinmarker (PepLab)
Dual Color Proteinmarker (Bio-Rad)
CJ-Proteinmarker (Eigenherstellung)

3.7. KONSTRUKTLISTE

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen MWG oder Operon bezogen.

3.7.1. OLIGODESOXYNUKLEOTIDE FÜR TRPM3-KONSTRUKTE

Konstruktname	Aminosäure- reste	Oligonukleotid- name	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Tm °C
α N1(1)	1-349	BAN 244 for pH 388 rev	CGGGATCCATGGGCAAGAAGTGGAGGG	60
			CAATTGAGATCACATTGGGTCC	64
β N1 (2)	1-346	BAN 245 for pH 388 rev	CGGGATCCATGCCAGGGCCGTGGGG	60
			CAATTGAGATCACATTGGGTCC	64
C-Term (3)	1131-1721	BAN 240 for BAN 241 rev	CGGGATCCGAGGTCAAGTCGATATCCAAC	60
			CCGCTCGAGTTAGTTGTGCTTGCTTTCAAAG	60
C-Term 1-H (4)	1131-1325	BAN 240 for BAN 242 rev	CGGGATCCGAGGTCAAGTCGATATCCAAC	60
			CCGCTCGAGTTATACTGAATAAAAAGGATGTTC	60
C-Term 2 (5)	1325-1721	BAN 243 for BAN 241 rev	CGGGATCCCTTCAAGAGAGTATAGACCC	58
			CCGCTCGAGTTAGTTGTGCTTGCTTTCAAAG	60
C-Term 1 (6)	1131-1339	BAN 240 for BAN 261 rev	CGGGATCCGAGGTCAAGTCGATATCCAAC	56
			CCGCTCGAGTTATGGGGATATGGTCTCCTC	56
N-Term 2 (7)	347-871	BAN 266 for BAN 267 rev	CGGGATCCCGAGGGAAGATATGTACC	54
			CCGCTCGAGTTAGGGTGCCTTGTAGAACTC	56
PM_L1270P (in C-Term 1)	Quickchange von C-Term1	BAN 272 for BAN 273 rev	CATCCGGCTAGCACAGCCAGAGGACCTCATCGGGC GCCCGATGAGGTCCTCTGGCTGTGCTAGCCGGATG	

Tabelle 1a: Oligodesoxynukleotide für TRPM3-Konstrukte zur Amplifikation mittels PCR

3.7.2. OLIGODESOXYNUKLEOTIDE FÜR SONSTIGE KONSTRUKTE

Konstruktname	Aminosäure- reste	Oligonukleotid- Name	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Tm °C
N7apTRG	116-191	BAN 126 for BAN 085 rev	CGGGATCCGAGGGTCAGACTGCACTG	58
			CCGGAATTCGGCCCCGGATGTCAGCTC	62
N7apBTL	116-191	BAN 127 for ISE 07 rev	CGGAATTCGAGGGTCAGACTGCACTG	58
			CGGGATCCTTAGGCCCGGATGTCAGCTC	64
HSD17pBTL	1-329	BAN 250 for BAN 252 rev	GCGAATTCATGGCCCGCACCGTGGTG	62
			TCCGCTCGAGTTACTGCGGGGCGGCCG	62
HSD17pTRG	1-329	BAN 251 for BAN 252 rev	GCGAATTCAGATGGCCCGCACCGTGGTG	54
			TCCGCTCGAGTTACTGCGGGGCGGCCG	62
TRPV1N1	1-230	BAN 236 for BAN 238 rev	CGGGATCCATGGAACAACGGGGCTAGC	56
			CCGCTCGAGTTACGCAGCCTGGACATCTG	56
TRPV1N2	231-433	BAN 237 for BAN 239 rev	CGGGATCCGCTAACGGGCACTTCTTC	56
			CCGCTCGAGTTAGATGCGCTTGACAAATCTG	56
TRPV1Nf	1-433	BAN 236 for BAN 239 rev	CGGGATCCATGGAACAACGGGGCTAGC	56
			CCGCTCGAGTTAGATGCGCTTGACAAATCTG	56

Tabelle 1b: Oligodesoxynukleotide für sonstige Konstrukte zur Amplifikation mittels PCR

3.7.3. OLIGODESOXYNUKLEOTIDE ZUR DNS-SEQUENZIERUNG

Plasmid	Oligonukleotid-Name	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Tm °C
pBTL	pBTL for2 abi	AGTACCCAATGATCCCATGC	60
	pBTL2 rev abi	ATACAGATGTAGGTGTTCCAC	60
pTRG	pTRG for 2	GTCGTGCGGCAACCATTC	58
	BAN 145 (pTRG rev)	GATTCGTCGCCCGCCATA	58
pCAGGS	pCAGGS for	AACGTGCTGGTTATTGTGC	56
	pCAGGS rev	ACCTTCTGATAGGCAGCC	56
pBluescript	FV79	CACGACGTTGTAAAACGA	56
	FV80	CAGGAAACAGCTATGAC	50

Tabelle 1c: Oligodesoxynukleotide zur DNS-Sequenzierung

3.8. PLASMIDVEKTOREN

Plasmide sind ringförmig geschlossene, selbst-replizierende DNS-Moleküle. Sie können unabhängig von der chromosomalen DNS vererbt werden. Plasmide enthalten Gene, deren Genprodukte dem bakteriellen Wirt Selektionsvorteile bringen können, beispielsweise indem sie eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika vermitteln. Plasmide bestehen mindestens aus einem Selektionsmarker, einem Replikationsstart (origin of replication, ori) und einer Klonierungsstelle. Die Klonierungsstelle ist ein Polylinker, welcher Erkennungssequenzen für eine Reihe von Restriktionsenzymen beinhaltet.

BAKTERIEN ZWEI-HYBRID-SYSTEM

pTRG (Stratagene)

pBTL (Stratagene)

EXPRESSIONSPLASMIDE

pCAGGS (J. Miyazaki, S. Philipp)

pcDNA3 (Invitrogen)

pBluescript II SK, KS (Stratagene)

3.9. RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME

RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Restriktionsenzyme wurden von Invitrogen und von New England Biolabs bezogen.

MODIFIZIERENDE ENZYME

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Roche)

Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)

Pfu (Proofreading Polymerase) (Stratagene)

Pfu Turbo (Proofreading Polymerase) (Stratagene)

Pfu (Eigenherstellung, S. Buchholz)

RNase A (Sigma)

T4-DNS-Polymerase (Roche)

T4-DNS-Ligase (New England Biolabs)

Taq-Polymerase (Eigenherstellung, S. Buchholz)

3.10. ANTIKÖRPER

Anti-HA Klon 12CA5 (Roche); Maus monoklonal; 0,4 µg/µl

Anti-Myk, Klon 9E10 (Roche); Maus monoklonal; 1:1000

Anti-Maus-HRP-Konjugat (Daniela); 1:30000

3.11. BAKTERIENSTÄMME

XL1-Blue subcloning grade competent cells (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

Der Stamm XL1-Blue wurde für die Amplifikation von Plasmiden eingesetzt.

Bacteriomatch[®] II- Reporterstamm : Validation reporter competent cells (Stratagene) #200192 XL-1 Blue MRF`Kan

Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' *laqI^q HIS3 aadA Kan^r*]

Bacteriomatch[®] II Electrocompetent Reporter Cells (Stratagene) #200195 XL-1 Blue MRF`Kan

Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' *laqI^q HIS3 aadA Kan^r*]

3.12. ANTIBIOTIKA

Alle Antibiotika wurden von Sigma oder AppliChem bezogen.

Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
50 mg/ml Ampicillin in H ₂ O	100 µg/ml
25 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol	34 µg/ml
50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O	50 µg/ml
10 mg/ml Tetracyclin-HCl in H ₂ O	15 µg/ml

Alle Stocklösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, zu 1 ml portioniert und bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

3.13. DATENBANKEN UND COMPUTERPROGRAMME

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

BLAST

(Altschul et al., 1990)

www.ch.embnet.org

Coils

(Lupas et al., 1991)

www.ncbi.nlm.nih.gov

PubMed

Omiga 2.0 software

Oxford Molecular Ltd., 1999

3.14. PUFFER UND LÖSUNGEN

3.14.1. PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN EXPERIMENTE

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde gereinigtes, deionisiertes Wasser H₂O_{bidest} verwendet.

- **0,5 M EDTA**

186,1 g/l 2Na-EDTA

Dampfsterilisation bei 121 °C und 1 bar für 45 Minuten.

- **Lysozymbilösung**

Für eine Endkonzentration von 10mg/ml wurden 10mg Lysozym auf 1ml H₂O_{bidest} gegeben.

- **7,5 M NH₄Acetat**

578,1 g/l NH₄Acetat

- **5 M NaCl**

292,2 g/l NaCl

Dampfsterilisation bei 121 °C und 1 bar für 45 Minuten.

- **1 x TSS-Puffer**

Für 50ml	Substanz	Endkonzentration
12,5ml	PEG 3350 40%	10%
2,5ml	MgCl ₂ , 1M	50mM
2,5ml	DMSO 100%	5%
<i>ad 50ml</i>	<i>LB Medium</i>	

- **RNS-Nuklease Wasser**

Für 100ml	Substanz	Endkonzentration
99,2ml	RNaseA [10mg/ml]	10mg/ml
500µl	Tris HCl 2M, pH 7,5	10mM
300µl	NaCl, 5M	15mM
<i>100ml</i>		

Aliquotieren à 1ml, 15min bei 100°C erhitzen, Lagerung bei -20°C.

- **10 x DNS- Auftragspuffer**

Für 50ml	Substanz	Endkonzentration
20g	Harnstoff 40% (w/v)	40% (w/v)
20g	Glycerin 99% (w/v)	40% (w/v)
5ml	EDTA, 0,5M, pH 8,0	50 mM
500µl	Tris-HCl, 1M, pH 7,0	10 mM
1 Spatelspitze	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
1 Spatelspitze	Xylencyanol 10FF	0,25 % (w/v)
<i>ad 50ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **STETL-Puffer**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
80g	Saccharose	8%
50ml	Triton X-100	5%
25ml	Tris, pH8, 2M	50mM
100ml	EDTA, 0,5M	50mM
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

Vor Verwendung wurden 10 µl/ml frisch angesetzte Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben.

- **TBE (Tris, Borat, EDTA)-Puffer, pH 8,0**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
108g	Tris HCl	0,89M
55g	Borsäure	0,89M
40ml	0,5M EDTA, pH 8,0	0,02M
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **1 x TE**

Für 50ml	Substanz	Endkonzentration
500µl	Tris HCl pH8	10mM
100µl	EDTA 0,5M, pH8	1mM
<i>ad 50ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **10x PCR-Reaktionspuffer**

Für 100ml	Substanz	Endkonzentration
1,21g	Tris HCl	100mM
0,305g	MgCl ₂ *6H ₂ O	15mM
3,728g	KCl	500mM
<i>ad 100ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

3.14.2. PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE PROTEINBIOCHEMISCHEN EXPERIMENTE

- **1 M Tris, pH 7,5**

121g Tris (Base) in 800ml H₂O_{steril} lösen.

pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure (37%) auf pH 7,5 einstellen.

ad 1000ml H₂O_{steril}

Dampfsterilisation bei 121°C und 1 bar für 45 Minuten.

- **2 x Laemmliauftragspuffer (Proteinauftragspuffer) pH 6,8**

Für 90ml	Substanz	Endkonzentration
8g	SDS	8% (w/v)
12ml	Tris-HCl, pH 6,8	120mM
10mg	Bromphenolblau	0,01%(w/v)
25,2g	Glycerin 99% (w/v)	20% (w/v)
<i>ad 90ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

Zu je 900µl aliquotieren, jeweils 100µl β-Mercaptoethanol hinzugeben.

- **Proteaseninhibitoren**

1 µg /ml Leupeptin
0,1 mM PMSF
1 mM Pepstatin A
0,3 µM Aprotinin
1 mM Benzamidin

- **Blockierungspuffer**

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

- **1x TBST-Puffer**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
1g	Tween 20	0,1% (w/v)
<i>ad 1000ml</i>	<i>1x TBS</i>	

- **Blotting Puffer pH 8,3**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
10g	SDS	1% (w/v)
30,29g	Tris-HCl, pH 6,8	250mM
144g	Glycin	1,92M
200g	Methanol	20%
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **10x TBS-Puffer pH 7,5**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
60,5g	Tris-HCl	500mM
87,6g	NaCl	1,5M
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **10x SDS Elektrophoresepuffer pH 8,3**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
30,3g	Tris-HCl	250mM
144,1g	Glycin	1,92M
10g	SDS	1 % (w/v)
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **4x Trenngelpuffer pH 8,8**

Für	Substanz	Endkonzentration
72,68g	Tris-HCl pH 8,8	1,5M
1,6g	SDS	0,4% (w/v)
<i>ad 400ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **4x Sammelgelpuffer pH 6,8**

Für 200ml	Substanz	Endkonzentration
12,1g	Tris-HCl pH 6,8	0,5M
0,96g	SDS	0,4%
<i>ad 200ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **PBS**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
8g	NaCl	138mM
0,2g	KCl	2,68mM
0,2g	KH ₂ HPO ₄	1,46mM
1,42g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,09mM
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **RIPA-Puffer**

Für 200ml	Substanz	Endkonzentration
1,75g	NaCl	150mM
1,21g	Tris HCl pH 8,0	50mM
0,37g	EDTA pH 8,0	5mM
0,2g	SDS	0,1%
1g	Na-Deoxycholat	0,5%
2g	Nonidet P40	1%
<i>ad 200ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

- **Detergens (“Stripping”)-Puffer**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
7,57g	Tris HCl pH 6,8	62,5 mM
20g	SDS	2%
7g	β- Mercaptoethanol	0,7 % (w/v)
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

3.15. NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

FLÜSSIGKULTUR:

- **LB (Luria-Bertani)-Medium, pH7,5**

Für 1000ml	Substanz	Endkonzentration
10g	Caseinhydrolysat	1% (w/v)
5g	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
10g	NaCl	1% (w/v)
<i>ad 1000ml</i>	<i>H₂O_{steril}</i>	

Dampfsterilisation bei 121°C und 1 bar für 20 Minuten. Nach Abkühlen auf 50°C wurden die benötigten Antibiotika zugesetzt.

- **SOC-Medium:**

Für 5ml	Substanz	Endkonzentration
50 µl	MgSO ₄ 1M (autoklaviert)	10mM
50 µl	MgCl ₂ 1M (autoklaviert)	10mM
100 µl	Glukose 20% (autoklaviert)	0,4% (w/v)
<i>ad 5ml</i>	<i>LB Medium</i>	

PLATTENKULTUR: LB-AGAR

1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium.

Dampfsterilisation bei 121°C und 1 bar für 20 Minuten. Nach Abkühlen auf 50°C wurden die benötigten Antibiotika zugesetzt.

Zur Herstellung der Medien und der Plattenkulturen für Experimente mittels des Bacteriomatch[®] II Systems von Stratagene siehe 5.2.3.

4. METHODEN

4.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die folgenden Methoden sind an das Buch „Molecular Cloning- A Laboratory Manual“ von Sambrook et al. (2001) angelehnt.

4.1.1. HERSTELLUNG HITZESCHOCKKOMPETENTER BAKTERIENZELLEN

Transformationskompetente Bakterien können aufgrund einer chemischen Vorbehandlung fremde Plasmid-DNS leichter aufnehmen. Für den in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstamm XL-1 Blue wurde das Protokoll von (Chung et al., 1989) verwendet. Von einem fraktionierten Ausstrich des Bakterienstammes wurde eine einzelne Kolonie in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium steril überführt und in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Daraufhin wurde ein Erlenmeyerkolben, welcher 100 ml LB-Medium enthielt, mit 1 ml dieser Kultur beimpft. Der Ansatz wurde im Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,35-0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm inkubiert. Anschließend wurde er in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C und 4500xg für 15 Minuten sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellsediment in 10 ml eiskaltem 1xTSS-Puffer resuspendiert. Je 300 µl der Zellsuspension wurden zügig in eiskalte Eppendorfgefäße portioniert und durch Überführen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wurde eine Portion der so gewonnenen Bakterienzellen mit 10-50 ng eines Testplasmids transformiert (siehe 4.1.3.). Der Transformationsansatz wurde dann 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien ausgezählt und die Transformationskompetenz ausgerechnet (siehe Formel). Angestrebt wurde ein Kompetenzwert von 10^7 bis 10^8 Transformanden/µg Plasmid-DNS.

Die Transformationskompetenz berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Transformanden/ } \mu\text{g DNS} = n \times F \times V_G/V_x \times 1/m$$

n ausgezählte Kolonienzahl

F Verdünnungsfaktor

V_G Gesamtvolumen des Transformationsansatzes

V_x ausplattiertes Volumen

m Menge an eingesetztem Plasmid [µg]

4.1.2. HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION VON DNS

Von einem fraktionierten Ausstrich des Bakterienstammes E.coli XL-1 Blue MRF`Kan (Stratagene, #200195) wurde eine einzelne Kolonie in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium steril überführt und in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden zwei Erlenmeyerkolben, welche je 400 ml LB-Medium enthielten, mit je 0,5 ml der Vorkultur bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6 inkubiert. Die Ansätze wurden auf vier sterile Zentrifugenbecher aufgeteilt und 15 Minuten bei 4500xg und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig dekantiert und die Zellsedimente in 4x250 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation mit 4500xg bei 4 °C wurden die Überstände vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die Sedimente in 2 x 250 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und anschließend erneut für 15 Minuten mit 4500xg bei 4 °C zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden erneut mit einer Pipette abgezogen. Die Sedimente wurden in 2 x 100 ml eiskalter, steriler 10-prozentiger Glycerol-Lösung vereint und erneut für 15 Minuten mit 4500xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen. Das Sediment wurde in 1,5 ml 10-prozentiger Glycerol-Lösung resuspendiert, zu 60 µl portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Kompetenz wurde durch eine Elektroporation mit 10-50 ng pBTL als Testplasmid ermittelt. Der Transformationsansatz wurde 1:100, 1:1000 und 1:10 000 verdünnt und auf LB-Agar mit 34 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Kompetenz berechnet (Formel s.o.). Für eine erfolgreiche Elektroporation müssen sämtliche Ionen aus der Bakteriensuspension entfernt werden. Ist dies nicht der Fall, so kommt es nach Anlegen der Spannung (siehe unten) zu einem Kurzschluss. Daher ist es wichtig, die oben beschriebenen Waschschrte korrekt durchzuführen. Angestrebt wurde ein Wert von 10^8 - 10^9 Transformanden pro µg Plasmid.

4.1.3. TRANSFORMATION VON PLASMID-DNS IN KOMPETENTE BAKTERIENZELLEN

Hier wurde das von Chung und Mitarbeitern (Chung et al., 1989) entwickelte Protokoll verwendet.

200 µl hitzeschockkompetenter Bakterien wurden mit dem gesamten Ligationsansatz oder mit 10-50 ng eines Testplasmids in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis gestellt und danach 1 Minute bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock). Nachdem der Ansatz weitere 2 Minuten auf Eis gestellt wurde erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium, welches zuvor auf Raumtemperatur temperiert worden war. Es folgte eine Inkubation von 1-1,5 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C. Nach dieser Zeit wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden war, ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde 3 Minuten bei 3500 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µl dekantiert.

Das Bakteriensediment wurde in diesem verbleibenden Rest resuspendiert und wiederum auf LB-Agar ausplattiert.

4.1.4. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS AUS BAKTERIENZELLEN

ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS IM ANALYTISCHEN MAßSTAB

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll beruht auf der so genannten „boiling method“ (Holmes and Quigley, 1981).

LB-Medium-Übernachtskulturen (5 ml), welche mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen waren, wurden mit jeweils einer Bakterienkolonie beimpft und danach über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 1,5 ml der Bakterienkultur sedimentiert, in 300 µl STET-L-Puffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterienwände wurden durch die Behandlung mit dem Detergens und Lysozym enthaltenden STET-L-Puffer zerstört. Durch nachfolgendes, 1 minütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die Proteine und die genomische DNS denaturiert und mittels Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge abgetrennt. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und verworfen. Zur Fällung der Plasmid-DNS wurde 300 µl Isopropanol zu dem verbleibenden Überstand gegeben. Der Ansatz wurde anschließend 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Zur Reinigung wurden 1000 µl 70-prozentiges Ethanol auf das Plasmid-DNS-Sediment gegeben und erneut für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands wurde das Sediment trocknen gelassen und anschließend in 50 µl RNS-Nuklease-Wasser gelöst.

PRÄPARATIVE PLASMID-DNS-ISOLIERUNG

Präparative Plasmid-DNS-Isolierung im größeren Maßstab: 1 ml einer beimpften 5 ml-Übernachtskultur wurden zu 400 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum gegeben und in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNS mittels des „Qiagen Plasmid Maxi Kits“ (Kat.nr.12163) erfolgte nach Anweisung des Herstellers Qiagen. Diese Methode beruht auf der „alkalischen Lyse“ (Birnboim and Doly, 1979). Hierbei werden die Bakterienwände zunächst durch einen stark alkalischen, detergenshaltigen Puffer zerstört. Proteine, chromosomale DNS und Plasmid-DNS denaturieren. Durch Zugabe einer sauren Kaliumacetatlösung fallen das Detergens SDS, die denaturierten Proteine, die chromosomale DNS und die Zellwandbestandteile aus. Die Plasmid-DNS hingegen renaturiert und bleibt in Lösung. Durch Zentrifugation werden die denaturierten Bestandteile abgetrennt. Die Plasmid-DNS wird anschließend mittels einer Anionenaustauscher-Säule von allen restlichen Verunreinigungen befreit.

Präparative Plasmid- DNS- Isolierung im kleineren Maßstab: Die Plasmidisolierung mittels „QiaPrep® Spin Miniprep Kit“ (Kat.nr.27106) und dem „FastPlasmid Mini Kit“ (Eppendorf, Kat.nr.955150601) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS MITTELS ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der enthaltenen aromatischen Basen Licht der Wellenlänge 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die Konzentration der vermessenen DNS-Lösung folgendermaßen bestimmt werden:

$$c[\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times F \times M$$

A _{260nm}	Absorption bei 260 nm,
F	Verdünnungsfaktor
M	Multiplikationsfaktor F (beträgt für dsDNS 50µg/ml)

Dabei ist zu beachten, dass diese Funktion lediglich dann linear ist, wenn der Wert der Absorption zwischen 0,1 und 1 liegt. Liegt er außerhalb dieses Bereichs muss daher eine neue Verdünnung angesetzt werden.

Mit der Absorptionsspektroskopie kann zudem die Reinheit der DNS-Lösung bestimmt werden. Proteine absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm. Der Quotient der Absorption einer DNS-Lösung bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.1.5. ANALYSE UND AUFREINIGUNG VON DNS-FRAGMENTEN MITTELS DNS-GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNS-Fragmenten. Aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen wandert DNS im elektrischen Feld zur Anode. Da verschieden große DNS-Fragmente auch unterschiedlich schnell durch die Poren der Gelmatrix wandern, werden sie nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die DNS-Fragmente auf dem Gel sichtbar zu machen wurde der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet. Einzelne Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen Basen der DNA. Durch diesen Vorgang wird die Eigenfluoreszenz dieses Farbstoffs bei Anregung mit UV-Licht erhöht. Bei Betrachtung unter UV-Licht werden die aufgetrennten Nukleinsäurefraktionen in den Gelen somit deutlich sichtbar. Die DNS-Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Durch Zugabe von Glycerol wurde die Dichte der Proben erhöht und somit das präzise Laden der Geltaschen erleichtert. Ein Größenstandard (M9-Marker, Eigenherstellung) ermöglichte das Abschätzen der Fragmentgrößen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet.

AGAROSE-GELE

Zu analytischen Zwecken wurde herkömmliche Agarose (Roth), zu präparativen Zwecken SeaKem GTG-Agarose (Cambrex) verwendet, welche einen höheren Reinheitsgrad aufweist. Es wurden jeweils 0,8-prozentige Gele hergestellt, die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 100-150 V.

Herstellung eines 0,8-prozentigen Agarosegels:

300 ml 1x TBE- Puffer wurde in einen 500 ml Erlenmeyerkolben oder in eine 500 ml Glasflasche gegeben. Anschließend wurde 2,4 g Agarose zugegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle etwa 4 bis 6 Minuten aufkochen gelassen bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Danach wurde der Ansatz auf einem Magnetrührer vorsichtig abkühlen gelassen. Nach Abkühlen auf 50°C wurden pro 100 ml Gelansatz 5 µl Ethidiumbromid 1 % (w/v) hinzu pipettiert und die Lösung in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen.

SDS-GELELEKTROPHORESE s. 4.3.5.

ISOLIERUNG VON DNS AUS GELEN: ELEKTROELUTION

Um eine DNS-Bande aus einem GTG-Agarosegel zu isolieren wurde sie unter UV-Licht der Wellenlänge 305-320 nm dargestellt, ausgeschnitten und in einen autoklavierten Dialyseschlauch überführt. Dieser wurde dann mit 300 µl H₂O oder 1 x TBE gefüllt, mit Dialyseklammern luftblasenfrei verschlossen und in ein mit 1xTBE versehenes Pufferreservoir zwischen zwei Elektroden gelegt. Bei einer angelegten Stromstärke von 135 mA und einer Temperatur von etwa 4-6 °C wurde die DNS aus dem Gelstück in die umgebende Lösung eluiert. Anschließend wurde die DNS-Lösung vorsichtig aus dem Dialyseschlauch in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Dialyseschlauch wurde mit 100 µl H₂O oder 1xTBE gespült. Anschließend wurde die DNS mit Ethanol aus der vereinigten Lösung ausgefällt.

Herstellung der Dialyseschläuche:

Der Dialyseschlauch wurde in etwa 6-8 cm lange Stücke geschnitten. Diese wurden in 10 mM EDTA autoklaviert und mit H₂O_{steril} gespült. Gegebenenfalls wurde mehrmals mit 10 mM EDTA autoklaviert bis die gelbliche Trübung der Dialyseschläuche verschwunden war.

Die Dialyseschläuche wurden bei 4 °C in 100%igen Ethanol gelagert.

4.1.6. ALKOHOL-FÄLLUNG VON DNS

DNS weist in wässrigen Lösungsmitteln eine gute Löslichkeit auf. In organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Isopropanol ist sie hingegen schlecht löslich, besonders in Anwesenheit einwertiger Ionen. Um Plasmid-DNS zu konzentrieren wurde die wässrige DNS-Lösung mit 0,1 Volumenteilen 7,5-molarer Ammoniumacetatlösung versetzt.

Nach sorgfältigem Mischen wurde das 2,5-fache Volumen an reinem Ethanol zugesetzt. Mittels Zentrifugation (30 Minuten, 1160xg) wurden die gefällten DNS-Fragmente sedimentiert. Um eventuell vorhandene Salze zu entfernen wurde das DNS-Sediment mit dem 2,5-fachen Volumen 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 Minuten, 1160x g). Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das Sediment über Kopf trocknen gelassen und in einem geeigneten Volumen H_2O_{steril} aufgenommen.

4.1.7. SPALTUNG VON DNS DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte, in der Regel palindromische DNS-Sequenzen, innerhalb welcher sie die DNS an einer definierten Stelle schneiden. Hierbei werden entweder glatte (blunt ends) oder einzelsträngige Enden (sticky ends) erzeugt.

Die Konzentration der Enzyme wird in Units (U) pro ml angegeben. 1 Unit ist definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 μ g Substrat-DNS in einem Ansatz von 50 μ l in einer Stunde bei der korrekten Temperatur und im korrekten Puffer vollständig zu schneiden. Die Herstellung der Reaktionsansätze erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Zu präparativen Zwecken wurden 1-1,5 μ g DNS in einem Gesamtvolumen von 40 μ l für drei Stunden bei optimaler Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 μ g DNS in 20 μ l Gesamtvolumen für etwa eine Stunde bei optimaler Temperatur inkubiert.

4.1.8. DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNS DURCH ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP/CIP)

Wird ein Vektor mit einem Restriktionsenzym geschnitten so entstehen kompatible Enden, welche sich wieder miteinander verbinden können. Somit kann es zu einer Rezirkulation des Vektors kommen, ohne dass die Insertion des gewünschten DNS-Fragments erfolgte. Dies soll durch die Entfernung des 5'-Phosphatrests des geschnittenen Vektors verhindert werden. Da die Verknüpfung zweier Nukleotide durch das Enzym DNS-Ligase stets von 5'-Phosphat auf 3'-Desoxyribose erfolgt, soll durch die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen eine Rezirkulation des Vektors verhindert und somit wird die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Insertion des DNS-Fragments erhöht werden. Die alkalische Phosphatase wird aus dem Dünndarm von Kälbern isoliert, weshalb sie auch als Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) bezeichnet wird.

Protokoll und Reaktionsansatz bei Verwendung der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Roche):

26	µl	geschnittene Plasmid-DNS in H ₂ O
3	µl	10 x Dephosphorylierungspuffer (0,5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8,5)
1	µl	Alkalische Phosphatase

- Inkubation 1 Stunde bei 37 °C
- Zugabe von 0,5 µl Alkalischer Phosphatase
- Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C
- Hitzeinaktivierung für 15 Minuten bei 75 °C
- Aufreinigung der DNS durch GTG-Agarose-Gelelektrophorese oder Fällung mit Ammoniumazetat/Ethanol.

Protokoll bei Verwendung der Antarctic Phosphatase (NEB):

- Inkubation 1 Stunde bei 37 °C
- Inkubation 5 Minuten bei 65 °C
- Aufreinigung der DNS durch GTG-Agarose-Gelelektrophorese oder Fällung mit Ammoniumazetat/Ethanol.

4.1.9. LIGATION VON DNS- FRAGMENTEN IN PLASMIDVEKTOREN

Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphat-Gruppe unter Hydrolyse von ATP. Sie werden beispielsweise dazu verwendet, ein bestimmtes DNS-Fragment in ein linearisiertes Plasmid zu inserieren. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde das Enzym T4-DNS-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Die Inkubation der Ligationen erfolgte bei 16 °C über Nacht oder alternativ bei 4 °C für 48- 60 Stunden.

Reaktionsansatz:

X	µl	Vektor (entsprechend ca. 50-100 ng)
Y	µl	Fragment (molekulares Verhältnis von Vektor zu Fragment ungefähr 1:3)
1	µl	T4 DNA-Ligase (2.000 U/µl, NEB)
1,5	µl	T4 DNA-Ligasepuffer (NEB 10x), enthält ATP
ad 15	µl	H ₂ O _{bidest}

4.1.10. AMPLIFIZIERUNG VON DNS- FRAGMENTEN MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist es möglich, eine spezifische DNS-Sequenz in vitro zu amplifizieren. Mit Hilfe zweier Oligodesoxynukleotide (Primer), eines 2'-Desoxynukleotid-5'triphosphat-Gemischs (dNTPs) und einer DNS-Polymerase wird eine DNS-Matrize exponentiell amplifiziert (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987).

Die Polymerasekettenreaktion besteht aus 25 bis 50 Zyklen, wobei sich jeder Zyklus aus drei Reaktionsschritten zusammensetzt. Der erste Schritt dient der Denaturierung der DNS-Matrize, also dem Schmelzen der doppelsträngigen DNS. Während des zweiten Schrittes lagern sich die Oligodesoxynukleotide, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren, an homologe Sequenzen des Matrizenstrangs an. Die Temperatur richtet sich hierbei nach der Schmelztemperatur und damit der Länge der eingesetzten Oligodesoxynukleotide. Der dritte Schritt dient der Elongation. Hier synthetisiert die DNS-Polymerase mit Hilfe der freien Nukleotide ausgehend von der 3'OH-Gruppe des Oligodesoxynukleotids eine zur Matrize komplementäre DNS-Sequenz. Durch Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der amplifizierten DNS-Sequenz. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tab.1 aufgeführt.

Die Schmelztemperatur der Oligodesoxynukleotide wurde nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

$$\text{Schmelztemperatur } T_m = 4x (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2x (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

In den hier beschriebenen Experimenten wurde sowohl mit der Taq-Polymerase als auch mit der Pfu-Polymerase gearbeitet (s. 4.9.). Das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* liegt bei etwa 74 °C. Die Taq-Polymerase weist eine hohe Prozessivität auf, bei 70 °C synthetisiert sie ungefähr 2800 Nukleotide pro Minute. Von Nachteil ist ihre relativ hohe Fehlerrate (etwa 1 Fehler pro 1000 eingebaute Basen). Die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* besitzt neben der 5'-3'-DNS-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, welche Basenfehlpaarungen erkennt und korrigiert. Durch diese so genannte „proof reading“-Funktion ist die Fehlerwahrscheinlichkeit der Pfu-Polymerase mit etwa 1 Fehler pro 10⁷ eingebaute Basen wesentlich geringer als die der Taq-Polymerase. Die Syntheserate beträgt etwa 1000 Nukleotide pro Minute. Soll ein PCR-Produkt in ein Plasmid inseriert werden, so werden am 5'-Ende des Oligonukleotids Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingefügt, so dass das fertige PCR-Endprodukt an beiden Enden die erwünschten Restriktionsschnittstellen enthält. Nach enzymatischer Modifikation mittels Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Aufreinigung kann das PCR-Produkt durch Ligation in das gewünschte Plasmid inseriert werden.

PROTOKOLLE FÜR DIE AMPLIFIKATION VON DNS-FRAGMENTEN MITTELS TAQ- OLYMERASE

Temperatur	Zeit	Funktion	Cyclen
94°C	3min	Denaturierung	-
94°C	30sek	Denaturierung	20-30
58-66°C	30sek	Oligodesoxynukleotid-Anlagerung	
72°C	30sek-3min *	Elongation	
72°C	5min	Finale Elongation	-

*pro 1000 Nukleotide des zu amplifizierenden DNS-Moleküls wurde eine Elongationszeit von 1min gewählt.

Die PCR wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

Volumina	Reagenz
1µl	Matrizen-DNS (Plasmid-DNS 50ng/µl)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 1 (10pmol/µl)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 2 (10pmol/µl)
5µl	PCR-Puffer 10x
1µl	dNTPs (10mM)
1µl	Taq-Polymerase*
ad 50ml	H ₂ O _{PCR}

Es wurde die taq-Polymerase aus eigener Herstellung (Protokoll nach Engelke et al., 1990; Frau S. Buchholz) verwendet.

PROTOKOLLE FÜR DIE AMPLIFIKATION VON DNS- FRAGMENTEN MITTELS PHUSION- POLYMERASE (NEB)

Temperatur	Zeit	Funktion	Cyclen
98°C	30sek	Denaturierung	-
98°C	10sek	Denaturierung	20-30
55-66°C	20sek	Oligodesoxynukleotid-Anlagerung	
72°C	20sek-80sek*	Elongation	
72°C	5min	Finale Elongation	-

*pro 1000 Nukleotide des zu amplifizierenden DNS-Moleküls wurde eine Elongationszeit von 20 Sekunden gewählt.

Die PCR wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

Volumina	Reagenz
1µl	Matrizen-DNS (Plasmid-DNS 50ng/µl)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 1 (10pmol/µl)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 2 (10pmol/µl)
10µl	Puffer 5x (NEB)
1µl	dNTPs (10mM) (NEB)
0,5µl	Phusion-Polymerase (NEB)
ad 50ml	H ₂ O _{PCR}

4.1.11. GEZIELTE PUNKTMUTAGENESE

Mit Hilfe dieses Verfahrens kann ein einzelnes Basenpaar oder auch mehrere aufeinander folgende Basenpaare mutiert werden. Die gewünschte Mutation wird hierbei mittels zweier zueinander komplementärer Oligodesoxynukleotide eingeführt. Die Mutationen sollten in der Mitte der Oligodesoxynukleotide lokalisiert sein, wobei sich zu beiden Seiten der Mutation etwa 10 bis 15 zur Matrize komplementäre Basen befinden sollten. Bei der PCR wurden die in 4.1.10. beschriebenen Bedingungen für die Phusion-Polymerase verwendet. Bei Durchführung der PCR ist zu beachten, dass das gesamte Plasmid amplifiziert werden muss.

PROTOKOLL FÜR DIE PCR ZUR GEZIELTEN PUNKTMUTAGENESE

Temperatur	Zeit	Cyclen
98°C	30sek	-
98°C	10sek	12
55°C	20sek	
72°C	60sek	
72°C	5min	-

Nach Beendigung der PCR wurde 1 µl des Enzyms Dpn1 zu dem PCR-Produkt gegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch das Enzym Dpn1 wird die *dam*⁺-methylierte Matrizen-DNS jeweils an einer Dpn1-Erkennungssequenz (methyliertes Adenosin) geschnitten und dadurch nahezu vollständig zerstört. Das nicht methylierte PCR-Produkt, welches die gewünschte Punktmutation enthält, bleibt hingegen erhalten. Die in dem PCR-Produkt noch vorhandenen Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat werden nach der Transformation durch bakterieneigene Ligasen geschlossen. Die Plasmide pCDNA3, pEYFP und pTRG eignen sich gut als Matrizen-DNS zur Punktmutagenese, das pCAGGS-Plasmid jedoch nicht. Nach Beendigung des Dpn1-Verdaus wurden 10 µl des PCR-Produkts in kompetente Zellen transformiert (4.1.3.). Nach präparativer Plasmid-DNS-Isolierung (4.1.4.) wurde mittels enzymatischer Sequenzierung (4.1.13.) die DNS mit der gewünschten Mutation identifiziert.

4.1.12. KOLONIEN-PCR

Die Kolonien-PCR ist eine schnelle und relativ zuverlässige Methode zur Identifikation von Bakterienklonen mit korrekt inserierter DNS. Hierzu wurden die zu prüfenden Kolonien zunächst auf der Agar-Platte nummeriert. Die jeweilige Matrizen-DNS wurde in Form einer halben Bakterien-Kolonie mit der Pipettenspitze von der Agar-Platte abgenommen und in einen PCR-Ansatz pipettiert. Hierbei wurde darauf geachtet, nicht die gesamte Kolonie von der Agar-Platte zu entfernen, um noch Material für eine Vorkultur zur Verfügung zu haben. Durch Erhitzen auf 95 °C wurden die Bakterienzellen lysiert und somit die Matrizen-DNS für die DNS-Polymerase zugänglich gemacht. Die in der PCR-Reaktion verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden so gewählt, dass die Klone mit korrekt inserierter DNS anhand der Länge der entstehenden PCR-Produkte erkannt werden konnten. Nach der PCR wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit 10 µl des PCR-Ansatzes durchgeführt und die positiven Kolonien identifiziert. Von diesen wurden Vorkulturen angeimpft und in einem weiteren Schritt die gewünschte DNA präpariert.

PROTOKOLL FÜR KOLONIEN-PCR

Temperatur	Zeit	Funktion	Cyclen
94°C	5min	Denaturierung	-
94°C	30sek	Denaturierung	20-30
55-66°C	30sek	Oligodesoxynukleotid-Anlagerung	
72°C	20sek-80sek	Elongation	
72°C	10min	Finale Elongation	-

Die PCR wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

Volumina	Reagenz
½	Kolonie (enthält Matrizen-DNS)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 1 (10pmol/µl)
2,5µl	Oligodesoxynukleotid 2 (10pmol/µl)
5µl	PCR- Puffer 10x
1µl	dNTPs (10mM)
1µl	Taq- Polymerase
ad 50ml	H ₂ O _{PCR}

4.1.13. ENZYMATISCHE SEQUENZIERUNG VON PLASMID-DNS NACH SANGER

Mit Hilfe dieses enzymatischen Verfahrens (Sanger et al., 1977) kann die Basenfolge, also die „Sequenz“ eines DNS-Moleküls bestimmt werden. Ausgehend von dem Reaktionsgemisch zugegebenen Oligodesoxynukleotiden synthetisiert eine Polymerase zum Matrizenstrang komplementäre DNS-Stränge. Hierbei werden 4 Reaktionen parallel durchgeführt, wobei jeweils zu den Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) ein Didesoxyribonukleotidtriphosphat gegeben wird. Durch den Einbau dieser ddNTPs kommt es in den neu synthetisierten DNS-Strängen an jeder zur Matrizen-DNS korrespondierenden Position zu einem Kettenabbruch. Dieser beruht darauf, dass das Didesoxyribonukleotidtriphosphat keine 3'-OH Gruppe besitzt und somit die Polymerase keine Phosphodiesterbindung mit dem 5'-Phosphat eines Nukleotids aufbauen kann.

Eine derzeit häufig verwendete Methode stellt das so genannte „cycle sequencing“ dar, bei dem sich folgende Schritte ähnlich wie bei der Polymerasekettenreaktion 4.1.11.) bei definierten Temperaturen periodisch wiederholen:

1. Denaturierung
2. Oligodesoxynukleotid-Anlagerung
3. Extension durch Einbau von dNTPs
4. Termination durch Einbau eines ddNTPs

In dieser Arbeit wurde eine von der Firma ABI etablierte Methode verwendet. Der von dieser Firma entwickelte Sequenzierautomat verarbeitet die Proben mittels elektrokinetischer Injektion. Die durch die oben beschriebene Sequenzreaktion entstandenen DNS-Fragmente werden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Bei dieser Methode werden alle ddNTPs zu einem Reaktionsgemisch gegeben, da die in dem von der Firma ABI erworbenen Reagenziensystem enthaltenen ddNTPs mit 4 unterschiedlichen Farbstoffen („DyeTerminator“) markiert sind. Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurden die erhaltenen fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente von den nicht eingebauten Nukleotiden und der Polymerase gereinigt. Dies erfolgte durch Auftragen der Proben auf vorher mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ gewaschene Sepharosesäulen und anschließender Elution.

Aufreinigung der Sequenzreaktion über Sepharosesäulen:

Äquilibrieren der Sepharose:

96-Lochplatten mit Filtrationseinheit wurden mit Sepharose befüllt. Zum Aufquellen der Sepharose wurde $300 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ in je ein Well gegeben. Es folgte eine 3 stündige Inkubation bei Raumtemperatur.

Aufreinigung der Sequenzreaktion:

Nach Zentrifugation der Sepharose-Platte (5 Minuten, $910\times g$) wurde das Eluat verworfen und in jedes Well $150 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ gegeben. Die Sepharose-Platte wurde erneut zentrifugiert (5 Minuten, $910\times g$) und das Eluat wiederum verworfen. In $0,2 \text{ ml}$ Reaktionsgefäße (spätere „Auffanggefäße“) wurde je $8 \mu\text{l}$ HiDi-Formamid gegeben. Die Sepharose-Platte wurde auf die 96-Loch-Halterung mit den Auffanggefäßen mit Formamid gestellt und die Sequenzreaktion auf die äquilibrierte Sepharose gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5 Minuten, $910\times g$), wobei die synthetisierten DNS-Fragmente in die Auffanggefäße mit dem vorgelegten Formamid eluiert wurden.

„CYCLE-SEQUENCING“

Temperatur	Zeit	Funktion	Cyclen
95°C	1min	Denaturierung	-
95°C	10sek	Denaturierung	35
55°C	2,5min	Oligodesoxynukleotid-Anlagerung und Extension bzw. Termination	
8°C	<i>dauerhaft</i>	<i>Lagerung der Reaktion</i>	-

Die Reaktion wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

Volumina	Reagenz
3µl	DNS-Lösung, ca. 1,5µg DNS z.B. aus QiaMini®
1,5µl	Big Dye®
1µl	Oligodesoxynukleotid (10pmol/µl)
<i>ad 12µl</i>	<i>H₂O_{HPLC}</i>

4.2. BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM

4.2.1. ÜBERSICHT

Ein Zwei-Hybrid-System dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. In dieser Arbeit wurde das Bakterien-zwei-Hybrid-System (Bacteriomatch[®]II Two-Hybrid-System) von Stratagene (Kat.nr. 240065) verwendet (Dove et al., 1997). Hierbei wird die DNS eines zu untersuchenden Proteins (der so genannte Köder, englisch „bait“) in dem Plasmid pBTL mit der DNS für ein Bakteriophagen λ -Repressor-Protein (λ cI) fusioniert. Die DNS des potenziellen Interaktionspartners (die Beute, englisch „target“) wird in dem Plasmid pTRG mit der DNS für die RNS-Polymerase α -Untereinheit fusioniert. Mittels Elektroporation werden beide Plasmide mitsamt inserierter DNS der zu untersuchenden Proteine in die kompetenten Bakterienzellen des Reporterstamms kotransformiert. Nachdem in den Zellen die Synthese der beiden Fusionsproteine erfolgt ist, bindet das mit dem „Köder“ fusionierte λ -Repressor-Protein (λ cI) an die λ -Operator-Sequenz strangaufwärts des Promotors der Reporter-kassette. Nur wenn die beiden zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren kann die mit dem „Beute“-Protein fusionierte RNS-Polymerase an den Promotor binden und die Transkription der Reportergene aktivieren (Abbildung 5).

Die Reporter-Bakterienzellen des Bacteriomatch[®]II Systems tragen zwei Reportergene, HIS3 und *aaadA*. Das Genprodukt von HIS3 komplementiert eine in diesem Reporterstamm vorhandene HisB-Mutation im Histidin-Syntheseweg. Da die Reporter-kassette immer abgelesen wird, wird auch das HIS3-Genprodukt kontinuierlich synthetisiert. Somit ist auch ohne Interaktion der zu untersuchenden Proteine und ohne Transkriptionsaktivierung der Reporter-kassette durch die α -Polymerase ein Wachstum des Reporterstamms auf Histidin-Mangelmedium möglich. Um zu gewährleisten, dass ein Wachstum ausschließlich dann erfolgt, wenn eine Interaktion von „Köder-“, und „Beute“-Protein stattgefunden hat, muss dem Medium die Substanz 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zugegeben werden. 3-AT stellt einen kompetitiven Inhibitor des HIS3-Genprodukts dar. In seiner Anwesenheit wird ohne Aktivierung der Reporter-kassette durch Interaktion der beiden Proteine nicht mehr ausreichend HIS3-Genprodukt synthetisiert um ein Wachstum auf Histidinmangelmedium zu ermöglichen.

Jeder Kotransformationsansatz wird auf zwei Medien ausplattiert. Auf dem Selektionsmedium 3-AT-Agar („Selective Screening Medium“) wird die Protein-Protein-Interaktion untersucht. Das Kontrollmedium No-AT-Agar („Nonselective Screening Medium“) enthält lediglich Chloramphenicol und Tetracyclin, die beiden Selektionsmarker der Plasmide pTRG und pBTL. Es dient somit der Kontrolle der Kotransformationseffizienz.

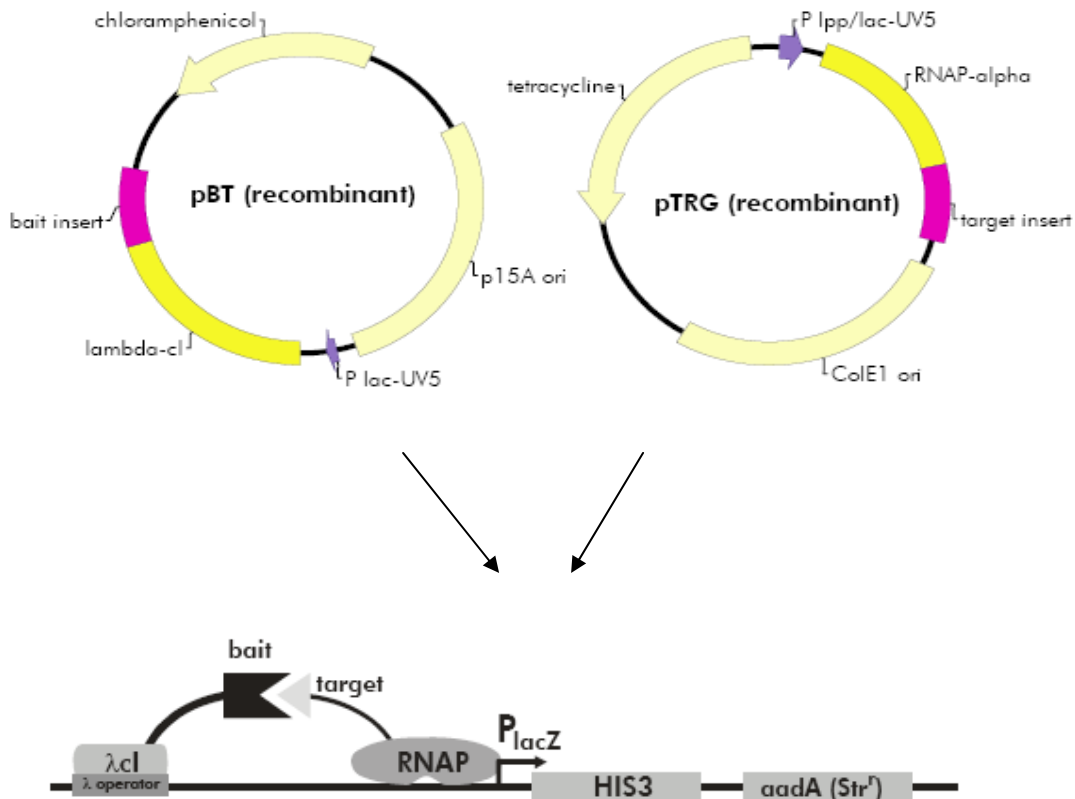


Abbildung 5: Übersicht über die Funktionsweise des Bacteriomatch[®]II Two-Hybrid-Systems: Die DNS der zu untersuchenden Proteine X und Y wird in den Plasmiden pBTL und pTRG aminoterminal mit der DNS des λ cl-Proteins bzw. der RNS-Polymerase α fusioniert. Anschließend werden beide Plasmide in die kompetenten Reporter-Bakterienzellen kotransfomiert. In den Bakterien werden die beiden Fusionsproteine λ cl-X und RNS-Polymerase α -Y synthetisiert. Das λ cl-X-Fusionsprotein bindet an den λ -Operator der Reporter-kassette. Nur wenn Y und X interagieren kann die RNS-Polymerase α an den Promotor binden, was ein Ablesen der Reporter-gene ermöglicht. Dies sind beim Bacteriomatch[®]II-System HIS3 (Fähigkeit zur Histidinsynthese) und *aadA* (Streptomycinresistenz).

4.2.2. PLASMIDE UND KOMPETENTE BAKTERIEN

KONSTRUKTION REKOMBINANTER pBTL-UND pTRG-PLASMIDE

Beim Entwurf der Oligodesoxynukleotide zur PCR-Amplifikation der zu untersuchenden DNS muss der Leserahmen eingehalten werden um die korrekte Entstehung der Fusionsproteine zu gewährleisten. Das Triplet TAG wird von den Bakterienstämmen des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems nicht als Stopcodon erkannt da diese eine *supE44* Mutation tragen, welche einen Amber Suppressor darstellt. Die gerichtete Inserierung von DNS in pBTL über die BamHI- und XhoI-Schnittstellen kann Probleme bereiten, da sich die Schnittstellen beider Enzyme teilweise überlappen.

Die enzymatische Modifikation, Aufreinigung und Rekombination der zu untersuchenden DNS-Fragmente und der Plasmid-DNS erfolgte wie oben beschrieben.

EIGENHERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN FÜR BACTERIOMATCH® II

Aus den von Stratagene käuflich erworbenen Original-Bakterienzellen Bacteriomatch® II Validation Reporter Competent Cells XL-1 Blue MRF`Kan wurden nach den zuvor beschriebenen Methoden (4.1.1., 4.1.2.) sowohl elektrokompente als auch hitzeschockkompetente Zellen hergestellt.

4.2.3. HERSTELLUNG DER MEDIEN

10 X M9-SALZE

Volumina	Substanz
85g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
30g	KH ₂ PO ₄
10g	NH ₄ Cl
5g	NaCl
<i>ad 1l</i>	<i>H₂O dest.</i>

20 min bei 121°C, 2 bar autoklavieren

M9 MEDIUM ADDITIVA (FÜR 500 ML M9+-MEDIUM)

Lösung I

Volumina	Substanz
10ml	20% (w/v) Glucose (sterilfiltriert)
5ml	Adenin HCl (sterilfiltriert)
50ml	10 x His dropout amino acid supplement (BD/Clontech; 15 min bei 121°C, 2 bar autoklaviert.)

Lösung II

Volumina	Substanz
0,5ml	1 M MgSO ₄ (autoklaviert)
0,5ml	1 M Thiamin HCl (sterilfiltriert)
0,5ml	10 mM ZnSO ₄ (autoklaviert)
0,5ml	100 mM CaCl ₂ (autoklaviert)
0,5ml	50 mM IPTG (sterilfiltriert)

Lösung II zu Lösung I geben, mischen.

M9⁺ HIS-DROPOUT BROTH (500 ML)

In steriler Flasche mischen:

Volumina	Substanz
380ml	H ₂ O dest.
50ml	10 x M9-Salze
76,5ml	M9 Medium Additiva (ein Ansatz)

Bei 4 °C lagern.

NO AT AGAR (500 ML)

- In 500 ml Flasche mischen: 380 ml H₂O dest.; 7,5 g Agar
- 30 Minuten bei 121 °C, 1,2 bar autoklavieren.
- Den Agar im Wasserbad auf 70 °C abkühlen, dann 50 ml 10 x M9-Salze steril zugeben.
- Den Agar im Wasserbad auf 52 °C temperieren. Zu einem Ansatz M9 Medium Additiva 625 µl Chloramphenicol (20 mg/ml) und 625 µl Tetracyclin (10 mg/ml) hinzugeben.
- Den gesamten Ansatz M9 Medium Additiva (68,75 ml) mit dem Agar/ M9-Salz-Gemisch verrühren, sofort in Petrischalen gießen. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

5 MM 3-AT AGAR (500 ML)

Prozedere wie bei No AT Agar, allerdings wird dem Ansatz aus M9 Medium Additiva und den beiden Antibiotika noch 2,5 ml 1 M 3-AT (gelöst in DMSO) hinzugefügt:

3-AT ist hitzelabil, es zersetzt sich bei über 55 °C. Daher sollte der Zusatz erst nach Abkühlung auf <55 °C erfolgen.

4.2.4. HITZESCHOCKTRANSFORMATION DER PLASMIDE PBTL UND PTRG

Bei Transformationen für Experimente mittels des Bacteriomatch[®]II Systems wurde ein gesamter Ligationsansatz zu 100 µl hitzeschockkompetenten Zellen („Bacteriomatch[®]II Validation Reporter Competent Cells“; siehe 3.11.) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Transformation wurde nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt (4.1.3.), wobei folgende Änderungen zu beachten sind: Nach dem Hitzeschock und der 2 minütigen Inkubation auf Eis wurden dem Ansatz statt 1 ml LB-Medium 960 µl SOC-Medium zugegeben.

Bakterien mit dem pBTL-Plasmid wurden auf LB-Agar mit 34 µg/ml Chloramphenicol kultiviert, Bakterien mit dem Plasmid pTRG auf LB-Agar mit 15 µg/ml Tetracyclin. Aufgrund der potenziellen Toxizität der Vektoren muss die Inkubationstemperatur bei Kultivierung der Bakterien auf nährstoffreichem LB-Agar 30 °C betragen. Die Inkubation erfolgte für 17-30 Stunden bei 30 °C und anschließend, wenn nötig, bis zu der gewünschten Koloniengröße bei Raumtemperatur.

4.2.5. PRÄPARATION VON PBTL UND PTRG

Beide Plasmide des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems sind so genannte „Low-Copy-Plasmide“. In einer Wirtszelle liegen etwa 10 Kopien des pBTL- und etwa 20-30 Kopien des pTRG-Plasmids vor. Zur analytischen Präparation im Mini-Maßstab wurden im Vergleich zum Standard-Protokoll (4.1.4.) folgende Modifikationen vorgenommen: das Bakteriensediment von 3 bis 4,5 ml Bakterienkultur wurde statt in 300 µl STETL in 800 µl STETL suspendiert. Die Zentrifugation bei 13000 rpm erfolgte für 30 Minuten anstelle von 15 Minuten. Des Weiteren erfolgte das Ausfällen der DNS nach Entfernung des Sediments mit 800 µl anstelle von 300 µl Isopropanol.

Für Kotransformations-Experimente wurde die Plasmid-DNS mit einem „Qiagen Plasmid Mini Kit“ aus 8 ml Vorkultur oder einem „Qiagen Spin Mini Kit“ nach einem Protokoll für Low-Copy-Plasmide gemäß den Angaben des Herstellers präpariert.

4.2.6. ELEKTROPORATION VON PTRG UND PBTL IN KOMPETENTE BAKTERIEN

Bei der Elektroporation führt eine kurzzeitig angelegte Hochspannung zu Porenbildung in der Zellwand, durch welche die DNS in die Zellen gelangen kann. Um einen Kurzschluss zu vermeiden muss sich die DNS in einer ionenfreien Lösung befinden, weshalb der Ligationsansatz vor der Elektroporation gefällt wurde. Hierbei sollte das Gesamtvolumen der DNS-Lösung nicht mehr als 5 µl betragen. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 40 µl Bakteriensuspension wurden durch Auf- und Abpipettieren mit der DNS vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt.

Alle Elektroporationen wurden mit dem GenePulser der Firma BioRad durchgeführt.

Bedingungen für 1 mm Küvetten: 400 Ω; 1,5 kV; 25 µF; die Zeitkonstante sollte 7,7-9,4 betragen

Bedingungen für 2 mm Küvetten: 200 Ω; 2,5 kV; 25 µF; die Zeitkonstante sollte 4,6-4,9 betragen

Nach der Elektroporation wurde unverzüglich 960 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben. Hier wurde auf zügiges Handeln geachtet, da jede Verzögerung die Vitalität der Zellen vermindert. Danach wurde der Transformationsansatz in ein 12 ml-Röhrchen überführt und für 2 Stunden mit 200 rpm bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Bakterienzellen für das Wachstum auf dem Minimalmedium vorbereitet. Zunächst wurden sie für 5 Minuten bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das SOC-Medium wurde entfernt und durch 1 ml M9⁺ Histidinmangelmedium (HisDropout Broth) ersetzt, in welchem das Sediment resuspendiert wurde. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 5000 rpm, 5 Minuten wurde der Überstand erneut entfernt und das Sediment wiederum in 1 ml frischem M9⁺ Histidinmangelmedium resuspendiert. Während einer weiteren Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C und 200 rpm wurden die Zellen an das Minimalmedium adaptiert.

Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension auf zwei Selektionsmedien ausplattiert. Von jedem Kotransformationsansatz wurden 200 µl auf eine No-AT-Agarplatte und 200 µl auf eine 5 mM 3-AT-Agarplatte plattiert. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C und bei Bedarf noch weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Rahmen der Kotransformationsexperimente wurde für jedes eingesetzte rekombinante Plasmid eine Transaktivierung durch eine Negativkontrolle ausgeschlossen. Ebenso wurde stets eine Positivkontrolle durchgeführt. Unter den hier beschriebenen Bedingungen sind bei einem gelungenen Kotransformationsexperiment alle No-AT-Agarplatten dicht bewachsen. Eine Ausnahme bilden lediglich die Negativkontrollen mit dem pTRG-Leerplasmid. Hier schien sich die zuvor schon beschriebene Toxizität des Plasmids in weniger dicht bewachsenen No-AT-Agarplatten zu äußern. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion waren die 5 mM 3-AT-Agarplatten dicht bewachsen.

4.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

4.3.1. KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Zusatz von 5 % CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in Steriltechnik unter einer Reinraumwerkbank mit sterilen Pipetten, Zellkulturflaschen und Medien von Frau Heidi Löhr durchgeführt.

HEK293-tsA201-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Invitrogen) kultiviert. Bei tsA-Zellen handelt es sich um modifizierte HEK293-Zellen, welche mit dem großen T-Antigen des SV40 Virus stabil transfiziert sind (ECACC Katalog No. 85120602). Dieses Antigen bindet an den Replikationsursprung (SV40 Origin of Replication) der Expressionsplasmide, was gegenüber den nicht modifizierten HEK293-Zellen zu einer verstärkten intrazellulären Plasmidexpression und somit auch zu einer erhöhten Gen- und Proteinexpression führt. Das Passagieren der Zellen erfolgte mit Trypsin (Sigma).

4.3.2. TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN

TRANSFEKTION MIT FUGENE

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNS in eukaryotische Zellen eingebracht. Hierbei wurde Fugene 6 (Roche) als Transfektionsreagenz verwendet.

Die Transfektion erfolgte 24 h nachdem die Zellen in Schalen (Durchmesser 3,1 cm) ausgesäht worden waren und zu 70-80 % konfluent waren. Pro Schale wurden 100 µl Optimem-1 Medium/Glutamax-I (Invitrogen) in Eppendorfgefäßen vorgelegt. Zu diesem wurden jeweils 6 µl Fugene 6 (Roche) und danach 2-3 µg Plasmid-DNS gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml frischem Zellkulturmedium versehen und das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben.

4.3.3. KO-IMMUNPRÄZIPITATION VON PROTEINEN

Die Ko-Immunpräzipitation dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Mittels eines spezifischen Antikörpers wird ein Zielprotein mitsamt seinen etwaigen Interaktionspartnern aus einem Proteingemisch präzipitiert. Hierbei werden kleine Proteinkügelchen aus Sepharose (so genannte Beads) verwendet, welche mit Protein A oder Protein G beschichtet sind. Diese beiden Proteine binden mit hoher Spezifität Fc-Fragmente von Antikörpern.

Die über Protein G oder A an die Sepharosekügelchen gebundenen Antikörper/Protein-Komplexe enthalten neben dem Zielprotein auch die mit Letzterem assoziierten Interaktionspartner. Nachfolgend können alle Proteine mittels Westernblot nachgewiesen werden.

KO-IMMUNPRÄZIPITATION MIT MONOKLONALEM ANTIKÖRPER

Zwei Tage vor dem Experiment wurden 2 mal 5 Schalen tsA-Zellen mit der Plasmid-DNS der zu untersuchenden Proteine transfiziert. Die Zellen wurden in 70-80% Konfluenz ausgesät. Zelldichte und Zellvitalität wurden mikroskopisch untersucht. Bei Verwendung von GFP-Fusionsproteinen wurde zudem die Intensität der grünen Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 460 nm beurteilt. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und jede Schale mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden zu jeder Schale 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg/ml Trypsin, 0,2 mg/ml EDTA) gegeben und die Zellen 1 Minute inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl FCS-haltigem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem 15 ml Falcon Röhrchen vereinigt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm, 4 °C 5 Minuten sedimentiert, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut bei 1000 rpm, 4 °C, 5 Minuten zentrifugiert. Die konsequente Durchführung des Experiments auf Eis und die Verwendung von Proteaseninhibitoren sollte hierbei dem Abbau von Proteinen durch Proteasen entgegenwirken. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml des mit Proteaseninhibitoren versehenen RIPA-Puffers aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Zelllysate wurde sukzessive jeweils 10 x durch 0,7 mm, 0,55 mm- und 0,4 mm-Kanülen geschert. 50 µl des Lysates wurden für die Proteinfällung abgenommen, der Rest wurde in einer kühlbaren Tischzentrifuge bei 4 °C 15 Minuten, 13000 rpm zentrifugiert. Um eine unspezifische Bindung der Zelllysate-Proteine an die Protein G Sepharose zu erkennen, wurden 80 µl mit RIPA-Puffer vorgewaschene Protein G Sepharose mit dem Überstand des Zelllysats für 1 Stunde bei 4 °C auf einem Rüttler vorinkubiert. Die Sepharose wurde durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde der monoklonale Antikörper Anti-HA-AK (12CA5; 0,4 µg/µl) hinzu gegeben. Das Zelllysate/Antikörper-Gemisch wurde im Rüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Sepharose G der Präinkubation wurde 5 x für 2 Minuten bei 4 °C auf einem Rüttler mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und nach Zugabe von 80 µl 2 x Laemmli-Puffer bei -20 °C gelagert. Dem Zelllysate/Antikörper-Gemisch wurden 80 µl gewaschene Sepharose G zugesetzt und das Gemisch für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Rüttler inkubiert. Dann wurde die Sepharose sedimentiert und 20 µl des Überstands als Kontrolle abgenommen. Der Überstand wurde mit 20 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C gelagert. Das Sepharose-Sediment wurde 5 x für 2 Minuten mit 1 ml RIPA-Puffer auf dem Rüttler gewaschen, mit 80 µl 2 x Laemmli-Puffer gemischt und bei -20 °C gelagert. Vor der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden alle Proteine für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert.

4.3.4. NATIVE PROTEINFÄLLUNG MIT ACETON/METHANOL

Die Proteinlösung wurde mit zwei Volumenanteilen Aceton versetzt, die Proteine während einer 10 minütigen Inkubation auf Eis ausgefällt und anschließend bei 14000 rpm, 4 °C 10 Minuten sedimentiert. Das Proteinsediment wurde zweimal mit vier Volumenanteilen Methanol gewaschen, luftgetrocknet und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

4.3.5. SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteingemische unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische Detergens SDS bindet an stark hydrophobe Bereiche der Proteine und durchbricht nicht-kovalente Bindungen. Die Proteine werden linearisiert und deren Eigenladung weitgehend maskiert. Somit entstehen negativ geladene Komplexe, welche ein annähernd proportionales Verhältnis von Ladung und Größe des Proteins aufweisen. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine in dem Polyacrylamid-Gel ist somit lediglich von deren relativen Molekülmassen abhängig. In dem großporigen Sammelgel werden die Proteine fokussiert, in dem kleinporigen Trenngel aufgetrennt.

Zusammensetzung 7%iges Trenngel

Für 10ml	Substanz
2,5ml	Trenngelpuffer
5,66ml	H_2O_{steril}
1,75ml	40% Acrylamid
75µl	10% APS
15µl	TEMED
<i>10ml</i>	

Zusammensetzung 4%iges Sammelgel

Für 5ml	Substanz
1,25ml	Trenngelpuffer
3,21ml	H_2O_{steril}
0,5ml	40% Acrylamid
37,5µl	10% APS
7,5µl	TEMED
<i>5ml</i>	

Die hitzedenaturierten, mit Proteinauftragspuffer versetzten Proteinproben und ein Protein-Größenstandard wurden in die Geltaschen geladen. Zur Fokussierung der Proteine wurde eine Spannung von 80 V angelegt, welche nachfolgend auf 150 V erhöht wurde.

4.3.6. WESTERN-BLOT ANALYSE

Bei diesem Verfahren werden Proteine mittels Elektrophorese von einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, sodass sie nachfolgend mit einem Antikörper detektiert werden können. Hierbei wurde der nach dem so genannten „Sandwich-Verfahren“ zusammengesetzte Blot in einer Kunststoffkassette fixiert und in die Blotting-Apparatur eingebaut, welche mit Blotting Puffer gefüllt wurde. Nun wurden die Proteine während 1,5 Stunden bei 350 mA von dem Gel auf die Membran transferiert. Die vorgefärbten Proteinstandards wurden auf der Membran markiert und die freien Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation in Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend folgte über Nacht bei 4 °C die Bindung des Erst-Antikörpers (Anti-Myc, Klon 9E10; 1:1000 verdünnt) an das Zielprotein. Die Membran wurde drei Mal mit TBST gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweit-Antikörper (Anti-Maus-HRP-Konjugat (Daniela); 1:30000; in 5% Milchpulver/1xTBS) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit TBST und einem mit TBS erfolgte die Chemolumineszenz-Entwicklung (ECL-Reaktion). In dieser Reaktion wird das zyklische Diacylhydrazid Luminol unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid und Peroxidase oxidiert. Nachdem die Membran eine Minute mit dem frisch angesetzten ECL-Reagenz inkubiert wurde, konnten die Proteine auf Röntgenfilmen nachgewiesen werden.

4.3.7. REDETEKTION (STRIPPEN)

Da die Bindung der Antikörper an die auf der Membran befindlichen Proteine nicht kovalent erfolgt, können diese durch die Behandlung mit Detergens- („Stripping“-) Puffer entfernt werden. Hierzu wurde die Membran vier Mal mit TBST gewaschen und nachfolgend 30 Minuten bei 50 °C mit Detergens-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 6 x 5 Minuten in TBST gewaschen und 1 Stunde mit Blockierungspuffer inkubiert.

5. ERGEBNISSE

5.1. TRPM3-INTERAKTIONSTUDIEN (BACTERIOMATCH® II SYSTEM)

KLONIERUNG REKOMBINANTER TRPM3-FRAGMENTE FÜR DAS BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM

Bei der Untersuchung von mTRPM3-Proteininteraktionen mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems wurde mit drei verschiedenen mTRPM3-Spleißvarianten gearbeitet: TRPM3_α1, TRPM3_β1 und TRPM3_β3'H. Die Aminotermini von TRPM3_α1 und TRPM3_β1 unterscheiden sich in ihren ersten etwa 60 Aminosäureresten. TRPM3_β3'H weist den gleichen Aminoterminus auf wie die Variante TRPM3_β1. Der Carboxyterminus von TRPM3_β3'H ist kürzer und weicht zudem in seinen sechs terminalen Aminosäureresten von dem Carboxyterminus der beiden anderen Varianten (TRPM3_α1 und TRPM3_β1) ab (Abbildung 6).

Ausgehend von dieser cDNS wurden verschiedene Fragmente hergestellt, welche anhand der Restriktionsschnittstellen BamH1 und Xho1 gerichtet in die beiden Plasmide pBTL und pTRG kloniert wurden. Um die Fragmente korrekt mit dem λCI-Protein des pBTL-Plasmids sowie mit der RNS-Polymerase des pTRG-Plasmids zu fusionieren, wurde auf die Einhaltung des richtigen Leserahmens geachtet. Zudem wurde am Carboxyterminus aller Fragmente ein Stop-Kodon angefügt. Die Kotransformations-Experimente mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems wurden wie unter Methoden beschrieben durchgeführt (4.2.). Um auszuschließen, dass ein rekombinantes DNS-Fragment alleine, das heißt ohne einen Interaktionspartner, eine Transkriptionsaktivierung induziert, wurde für jedes eingesetzte rekombinante DNS-Konstrukt eine Negativkontrolle durchgeführt. Des Weiteren wurde zu jedem Kotransformations-Experiment eine Positivkontrolle durchgeführt.

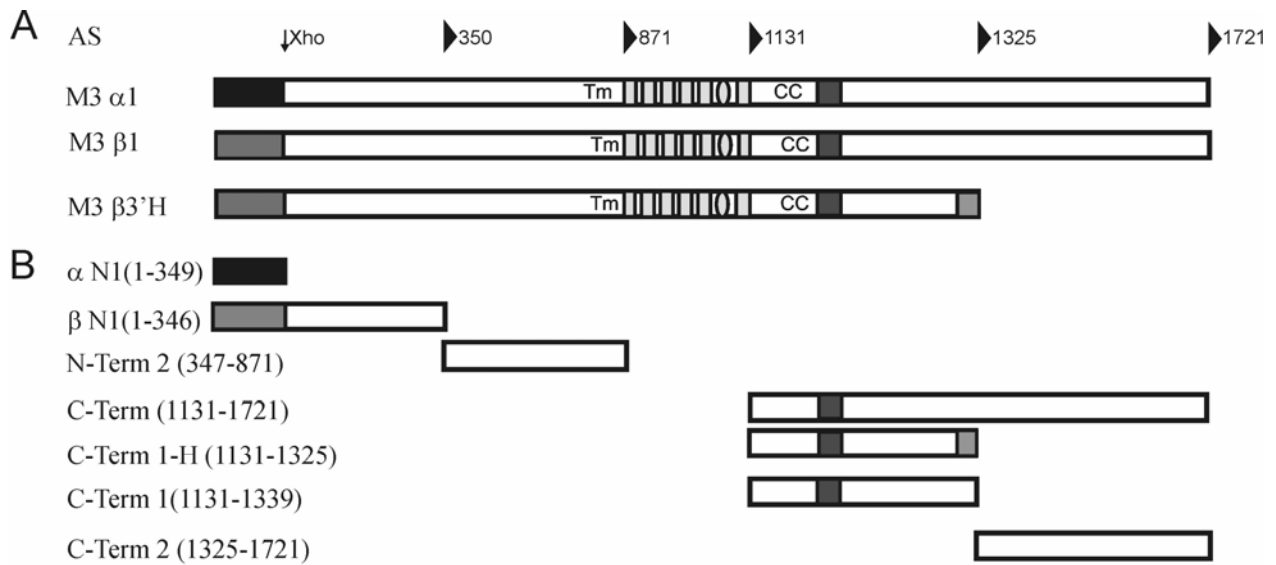


Abbildung 6: A: Übersicht über die Grundstruktur der verwendeten mTRPM3 Proteine. TRPM3_α1 und TRPM3_β1 unterscheiden sich in den ersten 60 Aminosäureresten des Aminoterminus. TRPM3_β3'H besitzt den gleichen Aminoterminus wie TRPM3_β1 (α-Aminoterminus schwarz/β-Aminoterminus dunkelgrau). Der verkürzte Carboxyterminus von TRPM3_β3'H unterscheidet sich von dem von TRPM3_α1 und TRPM3_β1 in seinen sechs terminalen Aminosäuren (hellgrau). Alle drei Varianten weisen eine Coiled-Coil-Region auf (cc), welche strangabwärts der Transmembrandomänen (Tm) im Carboxyterminus lokalisiert ist. B: Schematische Darstellung der für das Bacteriomatch®II System hergestellten, rekombinanten mTRPM3-Fragmente. Alle abgebildeten Fragmente sind in beiden Plasmiden (pTRG und pBTL) vorhanden. In den Klammern ist die Nummer der Aminosäurereste angegeben.

5.1.1. INTERAKTIONEN INNERHALB DER AMINOTERMINI

Für meine Untersuchungen habe ich ausgehend von den Aminotermini der verwendeten TRPM3-Varianten drei rekombinante Fragmente hergestellt: α N1, β N1 und N-Term 2. Die Spleißvarianten TRPM3_α1 und TRPM3_β1 weisen am absoluten Aminoterminus eine unterschiedliche Aminosäuresequenz auf; ab Aminosäurerest 62 (α1, Exon 3) sind sie identisch. Die Fragmente α N1 und β N1 enthalten somit neben den ersten, Spleißform-spezifischen Aminosäureresten weitere, in beiden Varianten identische, Aminosäurereste. Das Fragment N-Term 2 beinhaltet die restlichen, identischen Aminosäurereste (Abbildung 6).

Die Analyse der Interaktionen der beiden N-Term-Fragmente α N1 und β N1 zeigte in zwei von drei durchgeführten Experimenten eine schwache Selbstinteraktion von β N1, während das korrespondierende Fragment von TRPM3_α1 (α N1) keine homotypische Interaktion zeigte (Tabelle 2). Eine Selbstinteraktion von N-Term 2 konnte aufgrund einer zu schwachen Positivkontrolle nicht sicher untersucht werden. Dies ist wahrscheinlich durch eine unzureichende Expression des Fusionsproteins zu erklären (nicht in den Tabellen gezeigt).

Es wurden keine heterotypischen Interaktionen zwischen den beiden N-Term-Fragmenten (α N1 und β N1) detektiert. Weder α N1 noch β N1 zeigten Interaktionen mit dem gemeinsamen Rest des Aminoterminus (Fragment N-Term 2).

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1-349	α N1	1-346	α N1	-
	α N1		β N1	-
	β N1		α N1	-
	β N1		β N1	-,+, +
	α N1	347-871	N-Term 2	-
	N-Term 2		α N1	-
	β N1		N-Term 2	-
	N-Term 2		β N1	-
	alle Konstrukte		pTRG	-
	pBTL		alle Konstrukte	-
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P	+++

Tabelle 2: Interaktionen innerhalb der Aminotermini von TRPM3_ α 1 und TRPM3_ β 1. pBTL und pTRG sind Bait- und Target-Plasmid, welche die aufgeführten Fragmente enthalten. Die Interaktionsstärke wurde anhand der Kolonienzahl auf den Selektionsplatten (5mM 3AT-Agar, s. Methoden) definiert: 1-200 Kolonie pro Platte +, >200 Kolonien ++, >1000 Kolonien +++. pBT-LGF2 und pTRG-Gal11P sind die Positivkontrolle.

5.1.2. INTERAKTIONEN ZWISCHEN AMINO- UND CARBOXYTERMINI

INTERAKTIONEN DER FRAGMENTE α N1 UND β N1 MIT DEM CARBOXYTERMINUS

Wie bereits erwähnt besitzen die Aminotermini von M3_ α 1 und M3_ β 1 an ihrem absoluten Ende etwa 60 verschiedene Aminosäurereste. Die Carboxytermini sind identisch (Abbildung 6).

Zum Vergleich der Interaktionen der beiden Aminotermini mit dem gemeinsamen Carboxyterminus wurde der in beiden Varianten identische Carboxyterminus (Fragment C-Term) in zwei kürzere Fragmente unterteilt (C-Term 1 und C-Term 2). Nachfolgend wurden die Interaktionen dieser drei C-Term-Fragmente mit den beiden N-Term-Fragmenten (α N1 und β N1) untersucht. Hierbei wurden keine eindeutigen Interaktionen detektiert. Lediglich zwischen den Fragmenten β N1 und C-Term 2 wurde einmalig eine schwache Interaktion gesehen, welche in dem reziproken Experiment jedoch nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3).

pBTL		pTRG		Interaktion	
AS	Name	AS	Name		
1-349	α N1	1131-1721	C-Term	-	
		1131-1339	C-Term 1	-	
		1325-1721	C-Term 2	-	
	C-Term	α N1			-
					-
	C-Term 2			-	
1-346	β N1		C-Term	-	
			C-Term 1	-	
			C-Term 2	-	
	C-Term	β N1			-
					-
	C-Term 2			+	
	alle Konstrukte		pTRG	-	
	pBTL		alle Konstrukte	-	
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P	+++	

Tabelle 3: Interaktionen der Fragmente α N1 und β N1 mit dem Carboxyterminus.

INTERAKTIONEN DES FRAGMENTES N-TERM 2 MIT DEM CARBOXYTERMINUS

Tabelle 4 verdeutlicht, dass auch das Fragment N-Term 2 keine Interaktionen mit den verschiedenen Fragmenten des Carboxyterminus zeigt.

pBTL		pTRG		Interaktion	
AS	Name	AS	Name		
347-871	N-Term 2	1131-1721	C-Term	-	
		1131-1339	C-Term 1	-	
		1325-1721	C-Term 2	-	
	C-Term 1	N-Term 2			-
					-
	C-Term 2			-	
	alle Konstrukte		pTRG	-	
	pBTL		alle Konstrukte	-	
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P	+++	

Tabelle 4: Interaktionen des Fragments N-Term 2 mit dem Carboxyterminus.

5.1.3. INTERAKTIONEN DES VERKÜRZTEN CARBOXYTERMINUS VON TRPM3_β3'H

INTERAKTIONEN DER KORRESPONDIERENDEN C-TERM-FRAGMENTE C-TERM 1 UND C-TERM 1-H MIT DEM β-AMINOTERMINUS

Betrachtet man TRPM3_β1 und TRPM3_β3'H, so fällt auf, dass der Carboxyterminus von TRPM3_β3'H etwa 350 Aminosäuren kürzer ist als der von TRPM3_β1 und zudem in seinen sechs terminalen Aminosäuren von Letzterem abweicht. Beide weisen den β-Aminoterminus auf (Abbildung 6). Um die Interaktionen der beiden Carboxytermini mit dem gemeinsamen Aminoterminus zu vergleichen, wurden von den Carboxytermini zwei korrespondierende Fragmente kloniert (C-Term1-H von TRPM3_β3'H, C-Term 1 von TRPM3_β1). In einigen Experimenten zeigten sich schwach positive Interaktionen zwischen dem C-Term-Fragment von TRPM3_β3'H (C-Term 1-H) und beiden Fragmenten des β-Aminoterminus (β N1 und N-Term 2). Die Ergebnisse konnten jedoch nicht mit reziproken Bait- und Targetvektoren bestätigt werden (Tabelle 5).

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1-346	β N1	1131-1325	C-Term 1-H	-,+,+
	β N1	1131-1339	C-Term 1	-
	C-Term 1-H		β N1	-,,-
	C-Term 1		β N1	-
347-871	N-Term 2		C-Term 1-H	+
	N-Term 2		C-Term 1	-
	C-Term 1		N-Term 2	-
	alle Konstrukte		pTRG	-
	pBTL		alle Konstrukte	-
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P	+++

Tabelle 5: Interaktionen des verkürzten Carboxyterminus von TRPM3_β3'H (C-Term 1-H). Grau unterlegt sind zum Vergleich die bereits gezeigten Interaktionsstudien mit dem zu C-Term 1-H korrespondierenden Fragment C-Term 1 (siehe Tabellen 3 und 4).

INTERAKTIONEN VON C-TERM 1-H MIT α N1

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich zeigte sich zwei Mal eine schwache Interaktion zwischen dem verkürzten C-Term-Fragment von TRPM3_β3'H (C-Term 1-H) und dem Fragment β N1. Das zu β N1 korrespondierende Fragment α N1 zeigte hingegen keinerlei Interaktionen mit C-Term 1-H (Tabelle 6).

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1-349	α N1 C-Term 1-H	1131-1325	C-Term 1-H α N1	- -
	alle Konstrukte pBTL pBT-LGF		pTRG alle Konstrukte pTRG-Gal11P	- - +++

Tabelle 6: Vergleich der Interaktionen von C-Term 1-H mit α N1 und β N1.

5.1.4. INTERAKTIONEN INNERHALB DER CARBOXYTERMINI

In weiteren Untersuchungen wurden Interaktionen innerhalb der drei Fragmente des gemeinsamen Carboxyterminus von TRPM3 $_{\alpha 1}$ und TRPM3 $_{\beta 1}$ untersucht (C-Term, C-Term 1, C-Term 2). Hierbei zeigte sich in zwei Experimenten eine schwach positive Interaktion zwischen dem Volllängen-C-Term (C-Term) und dem Fragment C-Term 1, welche im reziproken Experiment nicht bestätigt werden konnte. Zudem konnten wir eine starke Selbstinteraktion des Fragments C-Term 1 detektieren. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Untersuchungen, welche keine oder nur schwache, nicht reziprok nachvollziehbare Interaktionen zeigten, war hier die Kolonienzahl vergleichbar mit der Positivkontrolle (Tabelle 7).

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1131-1721	C-Term	1325-1721	C-Term 1	+,+
1131-1339	C-Term 1		C-Term	-
	C-Term		C-Term 2	-
	C-Term 2		C-Term 1	-
	C-Term 1		C-Term 2	-
	C-Term		C-Term	-, -
	C-Term 1		C-Term 1	+++ , +++
	C-Term 2		C-Term 2	-
	alle Konstrukte pBTL pBT-LGF		pTRG alle Konstrukte pTRG-Gal11P	- - +++

Tabelle 7: Interaktionen innerhalb der Carboxytermini.

In weiteren Experimenten wurden nun Interaktionen zwischen diesen drei Fragmenten des Carboxyterminus von TRPM3_α1 bzw. TRPM3_β1 und dem verkürzten C-Term-Fragment von M3_β3'H (C-Term 1-H) untersucht (Tabelle 8). Die hierbei detektierten, schwachen Interaktionen der beiden Fragmente C-Term und C-Term 2 mit C-Term 1-H konnten in reziproken Experimenten nicht mehr gesehen werden.

Auffällig war jedoch eine ausgesprochen starke Selbstinteraktion des Fragments C-Term 1-H. Die Kolonienzahl war vergleichbar mit der oben beschriebenen Selbstinteraktion von C-Term 1 (siehe Tabelle 7). Wie bereits erläutert sind die beiden korrespondierenden C-Term-Fragmente C-Term 1 und C-Term 1-H nahezu identisch; sie unterscheiden sich lediglich in den sechs terminalen Aminosäureresten. Um den Einfluss dieser sechs Aminosäurereste auf eine heterotypische Interaktion zu testen, haben wir die Interaktion zwischen den Fragmenten C-Term 1 und C-Term 1-H untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese heterotypische Interaktion vergleichbar stark war wie die oben beschriebenen Selbstinteraktionen der beiden Fragmente. Des Weiteren konnte das Ergebnis in gleicher Stärke mit reziproken Bait- und Targetvektor-Konstrukten reproduziert werden. Somit schienen die sechs terminalen Aminosäurereste des Fragments C-Term 1-H eine heterotypische Interaktion nicht zu beeinträchtigen.

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1131-1721	C-Term	1131-1325	C-Term 1-H	+,+,+
	C-Term 1-H		C-Term	-
1325-1721	C-Term 2		C-Term 1-H	+
	C-Term 1-H		C-Term 2	-
1131-1339	C-Term 1		C-Term 1-H	+++,+++
	C-Term 1-H		C-Term 1	+++
	C-Term 1-H		C-Term 1-H	+++
	alle Konstrukte pBTL		pTRG	-
	pBT-LGF		alle Konstrukte	-
			pTRG-Gal11P	+++

Tabelle 8: Interaktionen innerhalb der Carboxytermini.

5.1.5. ZERSTÖRUNG DER PUTATIVEN COILED-COIL-REGION VON TRPM3

Betrachtet man die Struktur der beiden stark interagierenden Fragmente, so fällt auf, dass beide als gemeinsames Strukturmotiv die putative Coiled-Coil-Region von TRPM3 beinhalten (Abbildung 6). Die Proteinsequenz von mTRPM3 wurde mittels des Programms COILS (ch.embnet.org) analysiert. Dieser Algorithmus vergleicht die Sequenz des zu untersuchenden Proteins mit einer Datenbank bekannter, zweisträngiger, paralleler Coiled-Coil-Strukturen und berechnet auf dieser Grundlage die Wahrscheinlichkeit, mit der sich in dem Protein Coiled-Coil-Regionen ausbilden.

Zur Identifizierung der putativen Coiled-Coil-Region von mTRPM3 wurden die von Lupas formulierten Kriterien angewendet (Lupas et al., 1991): es sollten lediglich Berechnungen für 28 Aminosäurereste umfassende Sequenzabschnitte berücksichtigt werden und die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur sollte mindestens 50 % betragen. Das Ergebnis einer zweiten Analyse mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d der Coiled-Coil-Struktur sollte nicht von dem Ersten abweichen.

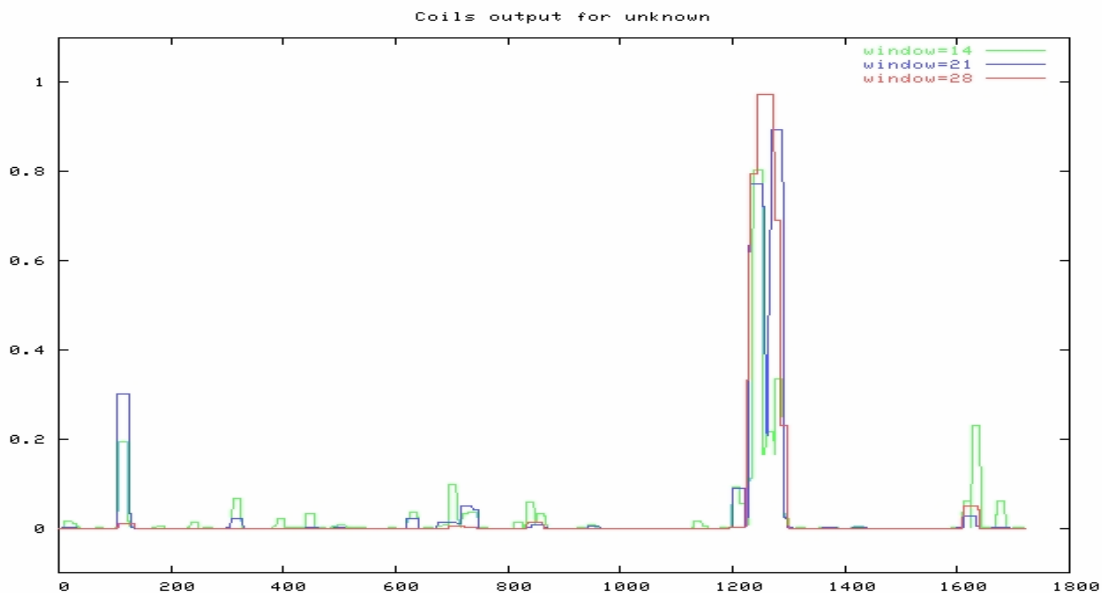


Abbildung 7: Berechnung der Wahrscheinlichkeit von Coiled-Coil-Domänen in mTRPM3 mit dem Algorithmus COILS. Das Programm gleicht die Proteinsequenz gegen eine Datenbank mit bekannten Coiled-Coil-Sequenzen ab; hierbei werden jeweils drei verschieden lange Sequenzabschnitte („Fenster“ mit je 14, 21 oder 28 Aminosäureresten) berücksichtigt. grün, Fenster 14; blau, Fenster 21; rot, Fenster 28. x-Achse: Aminosäurereste von TRPM3, y-Achse: Wahrscheinlichkeit der Coiled-Coil-Bildung, angegeben von 0 (=0 %) bis 1 (=100 %).

Putative Coiled-Coil-Regionen scheinen essentiell für die Homomultimerisierung von TRPM2 und TRPM8 zu sein (Erler et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Die mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems detektierten Interaktionen der die Coiled-Coil-Region aufweisenden TRPM3-Fragmente könnten darauf hindeuten, dass die Coiled-Coil-Region auch an der Multimerisierung von TRPM3 beteiligt sein könnte. Um dieser Frage nachzugehen, sollte die mittels des Algorithmus COILS identifizierte, putative Coiled-Coil-Region von TRPM3 durch eine helixbrechende Punktmutation zerstört werden. Im Folgenden sollten die Auswirkungen dieser Mutation auf die Interaktionsfähigkeit der entsprechenden Fragmente untersucht werden.

Um die Struktur der Coiled-Coil-Region zu zerstören, wurde eine strukturell wichtige Aminosäure gezielt mutiert. Hierzu eignen sich insbesondere die meist hydrophoben Aminosäurereste a und d des charakteristischen Heptadenmotivs der Coiled-Coil-Domäne (siehe 2.2.2.).

Abbildung 8 verdeutlicht, dass die helixbrechende Punktmutation L1270P im Bereich der identifizierten Coiled-Coil-Region von mTRPM3 die Wahrscheinlichkeit einer vier Heptaden umfassenden Coiled-Coil-Struktur nahezu vollständig zerstören würde. Allerdings bestünde noch eine Wahrscheinlichkeit von über 50% für die Ausbildung einer drei Heptaden umfassenden Coiled-Coil-Region.

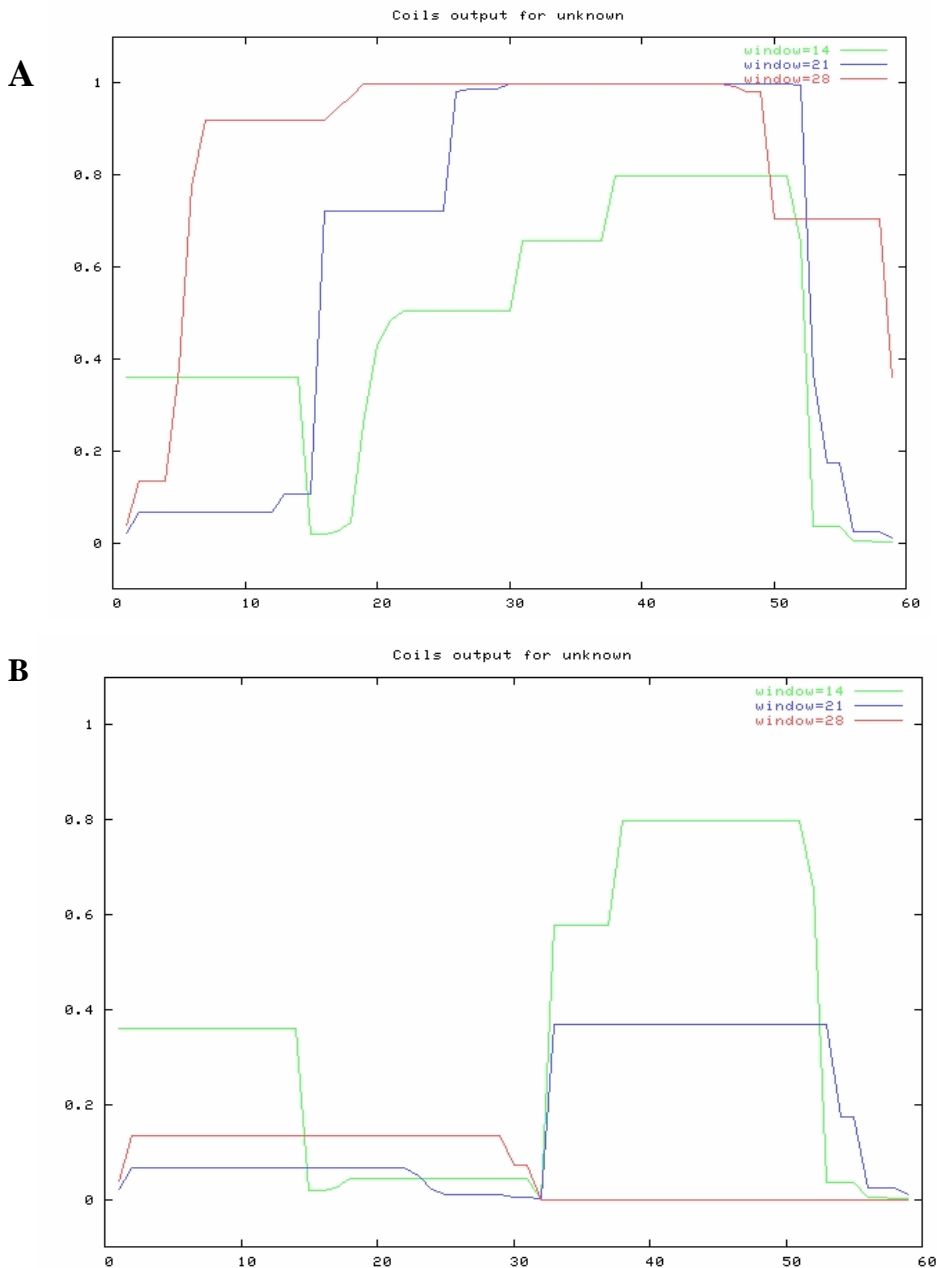


Abbildung 8: Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung einer zwei (grün, window 14), drei (blau, window 21) und vier (rot, window 28) Heptaden umfassenden, putativen Coiled-Coil-Region in der Aminosäureregion 1239-1297 von mTRPM3 (Programm „Coils“). **A:** Annähernd 100%ige Wahrscheinlichkeit einer Vier-Heptaden Coiled-Coil-Region in Wildtyp-mTRPM3.

B: die geplante Punktmutation L1270P würde die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer vier-Heptaden Coiled-Coil-Region nahezu vollständig zerstören und die einer drei-Heptaden umfassenden Coiled-Coil-Struktur um etwa die Hälfte reduzieren (1270L/P).

Die Punktmutation L1270P wurde mittels Quickchange PCR (siehe 4.1.11.) in das Fragment C-Term 1 eingefügt, welches sich in dem Bait-Vektor (pBTL) befand. Nun wurde das Interaktionsverhalten dieses mutierten Konstrukts (C-Term 1 PM) vergleichend zu dem Wildtyp-Fragment (C-Term 1) untersucht. Das gezielt mutierte Fragment C-Term 1 PM konnte in den nachfolgenden Experimenten weder mit dem Fragment C-Term 1 noch mit C-Term 1-H interagieren. Zur Verdeutlichung werden noch einmal die vorher gefundene Selbstinteraktion des Fragments C-Term 1 und die Interaktion von C-Term 1 mit C-Term 1-H gezeigt (Tabelle 9).

Somit konnten sowohl die starke Selbstinteraktionen von C-Term 1 als auch die Interaktion zwischen C-Term 1 und C-Term 1-H durch Einfügen der Punktmutation L1270P in die Coiled-Coil-Region des Fragments C-Term 1 vollständig zerstört werden.

pBTL		pTRG		Interaktion
AS	Name	AS	Name	
1131-1339	C-Term 1	1131-1325	C-Term 1	+++
	C-Term 1		C-Term 1-H	+++
1131-1339	C-Term 1 PM		C-Term 1	-
	C-Term 1 PM		C-Term 1-H	-
	alle Konstrukte		pTRG	-
	pBTL		alle Konstrukte	-
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P	+++

Tabelle 9: Zerstörung der starken Selbstinteraktion des Fragments C-Term 1 und der Interaktion des Fragments C-Term 1 mit C-Term 1-H (grau unterlegt, vgl. Tabellen 7 und 8) durch Einfügen der Punktmutation L1270P in das Fragment C-Term 1 (C-Term 1 PM).

5.2. TRPM3 KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems konnte die putative Coiled-Coil-Region von TRPM3 als starke Interaktionsdomäne identifiziert werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Zerstörung dieses Strukturmotivs durch die helixbrechende Punktmutation L1270P die vorher ausgeprägte Interaktionsfähigkeit dieser Region beeinträchtigte. Um die Auswirkung der Mutation auf die Selbstinteraktion des Volllängenproteins TRPM3 zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt Ko-Immunopräzipitationen aus HEK 293-tsA-Zellen durchgeführt.

5.2.1. KLONIERUNG DES TRPM3-KONSTRUKTS ZUR KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Die oben beschriebene, helixbrechende Punktmutation L1270P wurde in die putative Coiled-Coil-Region von TRPM3_{α2} eingefügt. Der Grund für die Verwendung von TRPM3_{α2} war die im Vergleich zu TRPM3_{α1} bessere Eignung für funktionelle Untersuchungen wie Fura II- oder Patch-clamp-Analysen. Zunächst wurde mittels der Restriktionsendonuklease EcoRV aus dem Volllängen-Protein TRPM3_{α2} ein 1500 Basenpaare umfassendes Fragment herausgeschnitten, welches die Coiled-Coil-Region aufwies. Dieses Fragment wurde danach in den ebenfalls mit EcoRV präparierten Vektor pBluescript inseriert. In einem weiteren Schritt wurde die Punktmutation L1270P mittels Quickchange PCR (siehe 4.1.11.) in die putative Coiled-Coil-Region eingefügt. Nach Präparation und Sequenzanalyse wurde das mutierte Fragment wiederum mit EcoRV aus dem Vektor pBluescript herausgeschnitten und in das mit EcoRV präparierte Volllängen-TRPM3_{α2} inseriert. Nachdem die korrekte Orientierung überprüft war, erfolgte die Präparation der DNS, welche nun in eukaryotische Zellen transformiert werden konnte (Abbildung 9).

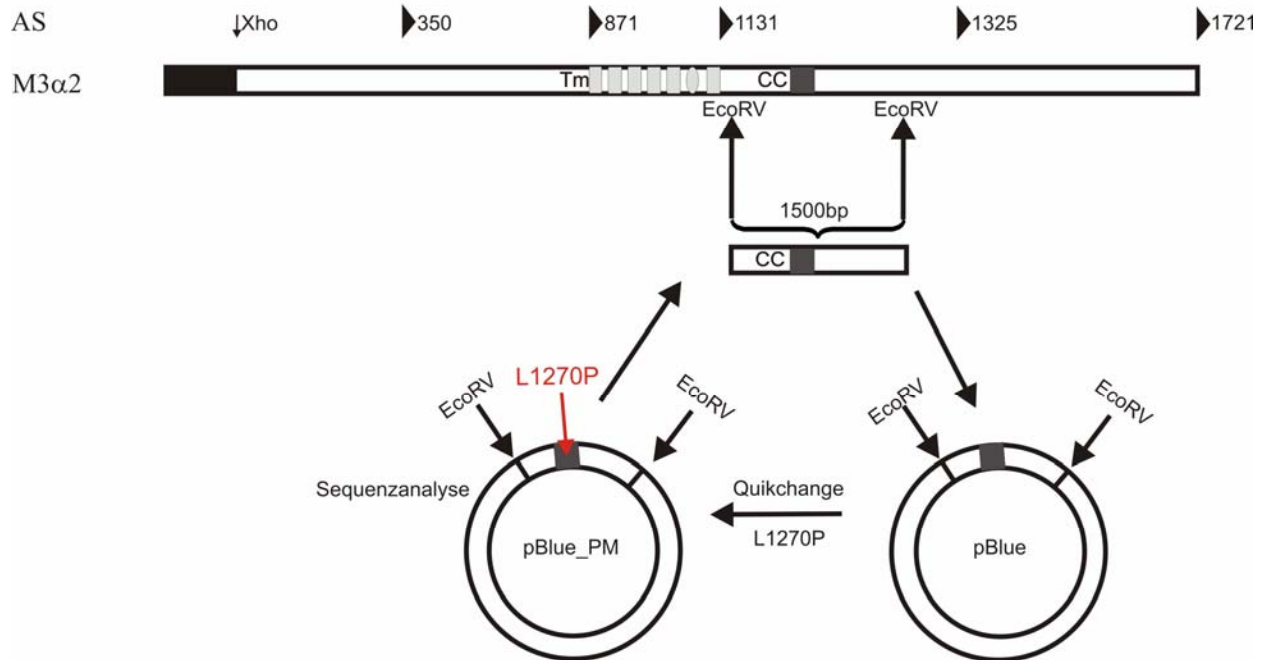


Abbildung 9: Klonierung der TRPM3_α2-Punktmutante für die Ko-Immunpräzipitation. Das 1500 Basenpaare umfassende Fragment mit der Coiled-Coil-Region wurde an den endogenen EcoRV-Schnittstellen aus TRPM3_α2 herausgeschnitten und in den mit EcoRV präparierten Vektor pBlue kloniert. Nach Einfügen der Punktmutation L1270P und nachfolgender Sequenzanalyse wurde das mutierte Fragment wieder in das präparierte TRPM3_α2-Konstrukt inseriert.

5.2.2. ERGEBNISSE DER KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Mittels einer Ko-Immunopräzipitation sollten nun die Auswirkungen der eingefügten Mutation untersucht werden. Hierbei wurden die Interaktionen des Myc-markierten Wildtyps TRPM3_α2 bzw. der Myc-markierten Mutante (L1270P) TRPM3_α2 mit einem HA-TRPM3_α1-Fusionsprotein untersucht. Wir wählten TRPM3_α1 als Interaktionspartner da uns kein HA-TRPM3_α2-Fusionsprotein zur Verfügung stand. Zudem war bereits gezeigt (siehe aber auch Abbildung 10), dass die beiden Wildtyp-Proteine TRPM3_α2 und TRPM3_α1, welche sich lediglich in 12 Aminosäureresten im Bereich der Porenregion unterscheiden, miteinander interagieren können.

Zur Durchführung des Experiments wurden modifizierte HEK293-Zellen mit den zu untersuchenden cDNS-Konstrukten kotransfiziert. Lysate der transfizierten Zellen wurden mit dem Antikörper Anti-HA versetzt. Durch die Bindung des Fc-Fragments des Anti-HA-Antikörpers an Protein G-Sepharose wurde das HA-markierte TRPM3_α1 zusammen mit etwaig assoziierten Interaktionspartnern (Wildtyp bzw. Punktmutante von TRPM3_α2) präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine denaturiert, auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Durch Detektion mit einem Anti-Myc-Antikörper wurde festgestellt, ob der Myc-markierte Wildtyp bzw. die Myc-markierte Mutante von TRPM3_α2 mit TRPM3_α1 kopräzipitierten. Wie erwartet (Abbildung 10A) ließ sich eine Kopräzipitation des Wildtyps TRPM3_α2 mit TRPM3_α1 nachweisen. Unerwarteter Weise kopräzipitierte auch die Mutante TRPM3_α2. Interessanterweise zeigte die Punktmutante im Überstand eine zusätzliche Bande im Western Blot (siehe Pfeil, Abbildung 10A). Dies könnte eventuell auf ein verändertes Muster sekundärer Proteinmodifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung) hindeuten. Dieses modifizierte Protein interagierte jedoch wesentlich schlechter mit dem HA-TRPM3_α1-Fusionsprotein. Die Blots wurden gestrippt und mit einem Anti-HA Antikörper inkubiert um die Expression und Bindung des HA-markierten Proteins TRPM3_α1 an Protein G Sepharose zu kontrollieren (Abbildung 10B).

Die Interaktion der beiden Volllänge-proteine TRPM3_α1 und TRPM3_α2 in der Ko-Immunpräzipitation ließ sich somit durch Einfügen der helixbrechenden Punktmutation L1270P in die Coiled-Coil-Region von TRPM3_α2 nicht aufheben.

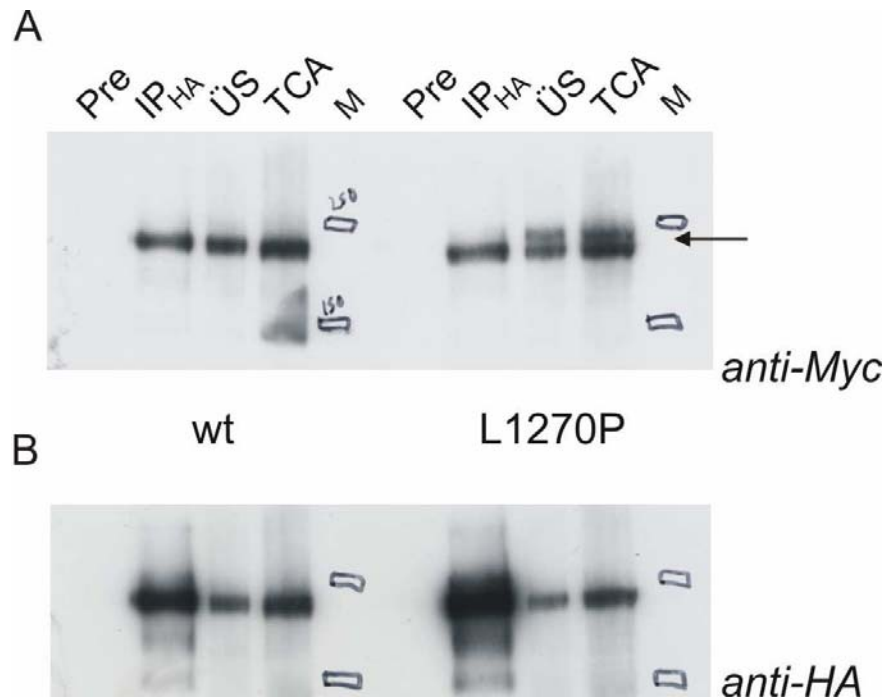


Abbildung 10: Untersuchung der Interaktion der Myc-Fusionsproteine des Wildtyps (wt) bzw. der Punktmutante (L1270P) von TRPM3_α2 mit einem HA-TRPM3_α1-Fusionsprotein durch Ko-Immunpräzipitation **A:** nach Kotransfektion der Myc-TRPM3_α2-Fusionsproteine (wt/L1270P) und dem HA-TRPM3_α1-Fusionsprotein in die Zelllinie HEK293-TSA201 konnten beide Myc-TRPM3_α2-Fusionsproteine nach Präzipitation mit dem Anti-HA Antikörper mit dem Anti-myc-Antikörper detektiert werden. Somit kopräzipitierten sowohl der Wildtyp (wt) als auch die Punktmutante (L1270P) von TRPM3_α2 mit TRPM3_α1. **B:** Inkubation der Blots mit Anti-HA-Antikörper zur Kontrolle der Expression und der Bindung des HA-markierten Proteins TRPM3_α1 an Protein G Sepharose. ÜS: 20 µl Überstand der Immunpräzipitation, TCA: 50 µl Lysat mit Trichloressigsäure gefällt und resuspendiert.

6. DISKUSSION

6.1. ALTERNATIVES SPLEIßEN IN DER TRP-FAMILIE

Neben der Heteromultimerisierung einzelner Ionenkanal-Untereinheiten stellt die posttranskriptionale Modifizierung der mRNA einen weiteren Mechanismus zur Vergrößerung der funktionellen Diversität der TRP-Kanäle dar. Für viele Mitglieder der TRP-Familie sind mehrere Varianten bekannt, welche durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts entstehen. Möglicherweise könnten bestimmte Proteineigenschaften durch das Auftreten neuer Varianten verändert werden, was beispielsweise eine bessere Anpassung entsprechender Kanäle an unterschiedliche Bedingungen zur Folge haben könnte. Aus diesem Grund stellt die Kenntnis der Varianten eine Grundvoraussetzung für das Verständnis der Kanalfunktionen dar.

Für einen Großteil der Mitglieder der TRPM-Familie wurden Spleißvarianten beschrieben (Lis et al., 2005). Die genauen Auswirkungen einzelner Spleißereignisse auf die Funktion des Kanals sind jedoch nur in wenigen Fällen bekannt. Ein Beispiel ist die Erbkrankheit „Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie“, welche durch Fehler beim Spleißen des TRPM6-Transkripts bedingt sein kann (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Des Weiteren scheint eine aminoterminal verkürzte TRPM4-Variante die Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in T-Lymphozyten zu verändern (Launay et al., 2004).

TRPM3 weist innerhalb der TRP-Familie die größte Anzahl an Spleißvarianten auf. Bisher wurden 11 TRM3-Varianten beschrieben (siehe 2.2.2.): TRPM3_α1-5 (Oberwinkler et al., 2005), hTRPM3₁₃₂₅ (Grimm et al., 2003) und mTRPM3_a-f (Lee et al., 2003). Lediglich vier dieser Spleißvarianten wurden funktionell untersucht: TRPM3_α1, TRPM3_α2, TRPM3_a und hTRPM3₁₃₂₅. Nur für ein TRPM3-Spleißereignis kennt man die genauen Auswirkungen auf funktionelle Eigenschaften des Kanals: alternatives Spleißen innerhalb der Porenregion verändert die Ionenselektivität von TRPM3, wobei die Variante mit der kürzeren Porenregion (TRPM3_α2) eine deutlich höhere Permeabilität für divalente Kationen aufweist als die mit der längeren Porenregion (TRPM3_α1) (Oberwinkler et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit habe ich mittels eines Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems inter- und intramolekulare Protein-Interaktionen verschiedener TRPM3-Spleißvarianten untersucht. Ziel meiner Untersuchungen war zunächst, Spleißform-spezifische Interaktionsdomänen zu finden, welche eine Basis für die Entdeckung funktioneller Unterschiede von TRPM3-Varianten darstellen könnten.

6.2. INTERAKTIONSTUDIEN MIT DEM BACTERIOMATCH[®] II SYSTEM

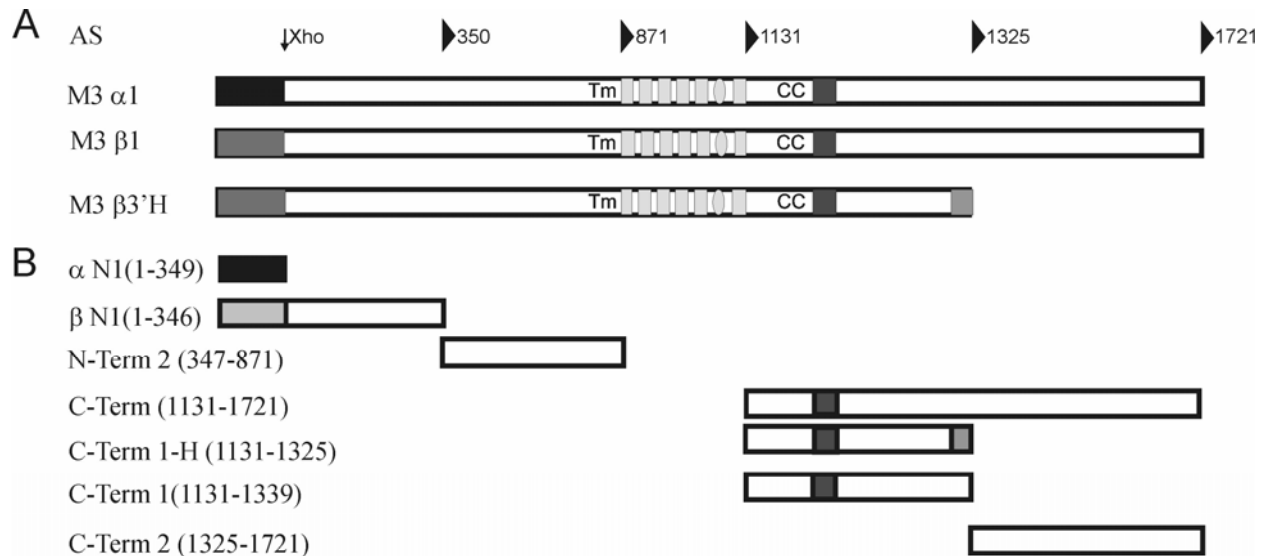


Abbildung 11: Übersicht über die verwendeten Spleißvarianten und die hergestellten rekombinanten Proteinfragmente von TRPM3.

In meiner Arbeit habe ich mit drei TRPM3-Spleißvarianten gearbeitet, TRPM3_{α1}, TRPM3_{β1} und TRPM3_{β3'H}. Zum besseren Verständnis sind die verwendeten cDNAs und die rekombinanten Fragmente hier noch einmal schematisch dargestellt (Abbildung 11).

Der Vergleich der Interaktionen innerhalb der Aminotermini von TRPM3_α und TRPM3_β (Fragmente α N1 und β N1) zeigte keine relevanten Ergebnisse (Tabelle 2; 5.1.1.). β N1 zeigte zwar im Gegensatz zu α N1 einige Male eine Selbstinteraktion, diese war jedoch nicht konsistent reproduzierbar und sehr schwach. Dies könnte jedoch eventuell ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente sein. Auch das homotypische Interaktionsverhalten des Fragments N-Term 2 könnte weiterführend untersucht werden, da sich aufgrund unzureichend starker Positivkontrollen diesbezüglich keine Aussage treffen ließ. Zudem habe ich die Interaktionen der N-Term-Fragmente α N1 und β N1 mit dem bei TRPM3_α und TRPM3_β identischen Carboxyterminus untersucht, wobei ich ausgehend von dem Carboxyterminus drei Fragmente hergestellt habe (C-Term, C-Term 1, C-Term 2). Es wurden keine relevanten Unterschiede in der Interaktionsstärke der beiden Aminotermini dem gemeinsamen Carboxyterminus gefunden.

Auch das in beiden Aminotermini identische Fragment N-Term 2 zeigte keine Interaktionen (Tabellen 3 und 4; 5.1.2.).

In weiteren Experimenten sollte das Interaktionsverhalten der Carboxytermini von TRPM3_β3'H und TRPM3_β mit dem gemeinsamen β-Aminoterminus untersucht werden. Hierzu habe ich die Interaktion der beiden korrespondierenden carboxyterminalen Fragmente (C-Term1-H von TRPM3_β3'H, C-Term 1 von TRPM3_α bzw. TRPM3_β) mit den Fragmenten des β-Aminoterminus (β N1 und N-Term 2) verglichen. Bei diesen Untersuchungen konnte ich schwache Interaktionen zwischen dem verkürzten Carboxyterminus von TRPM3_β3'H (Fragment C-Term 1-H) im Target-Plasmid und beiden N-Term-Fragmenten im Bait-Plasmid finden. Diese Interaktionen konnten jedoch mit getauschten Bait- und Targetplasmiden nicht beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu interagierte das korrespondierende C-Term-Fragment C-Term 1 mit keinem der beiden N-Term-Fragmente (Tabelle 5; 5.1.3.). Diese Ergebnisse könnten auf einen Spleißform-spezifischen Unterschied in der Interaktion der beiden Carboxytermini mit dem β-Aminoterminus hindeuten, weshalb weiterführende Untersuchungen mit einer anderen Methode sicherlich interessant wären. Mit dem zu β N1 korrespondierenden Fragment des α-Aminoterminus (α N1) interagierte der verkürzte Carboxyterminus (Fragment C-Term 1-H) nicht (Tabelle 6; 5.1.3.).

Im Folgenden wurden Interaktionen innerhalb der Carboxytermini (C-Term, C-Term 1, C-Term 1-H, C-Term 2) untersucht. Hierbei konnten interessanterweise starke Selbstinteraktionen der beiden korrespondierenden Fragmente C-Term 1 und C-Term 1-H detektiert werden. Diese waren in ihrer Stärke mit den jeweiligen Positivkontrollen vergleichbar und auch mit reziproken Bait- und Targetvektor-Konstrukten reproduzierbar. Dies galt ebenso für die nachfolgend untersuchte Interaktion der beiden Konstrukte C-Term 1 und C-Term 1-H. Die 6 unterschiedlichen Aminosäurereste am carboxyterminalen Ende der beiden Fragmente schienen hierbei keine Spleißform-spezifischen Interaktionseigenschaften zu bedingen (Tabellen 7 und 8; 5.1.4.).

Als gemeinsames Strukturelement besitzen die stark interagierenden Fragmente C-Term 1 und C-Term 1-H die carboxyterminale, putative Coiled-Coil-Region von TRPM3. Das Fragment C-Term 1 ist ein Teil des Fragments C-Term (siehe Abbildung 11). Es wäre somit zu erwarten, dass die stark interagierenden, verkürzten Fragmente ebenfalls mit dem Fragment des Vollängen-Carboxyterminus (C-Term) interagieren würden. Dies war jedoch nicht der Fall. Zwar sah ich in einigen Experimenten Interaktionen zwischen den Fragmenten C-Term 1 bzw. C-Term 1-H im Target-Plasmid und C-Term im Baitplasmid, diese waren jedoch sehr schwach und mit reziproken Bait- und Targetvektoren nicht reproduzierbar (siehe Tabellen 7 und 8; 5.1.4.) Dies könnte auf einer Maskierung der Interaktionsregion aufgrund der Größe des Fragments C-Term beruhen. Zudem ist es möglich, dass das lange Fusionsprotein nicht ausreichend synthetisiert wurde oder dass für die Interaktion sekundäre Proteinmodifikationen nötig sind, zu welchen E. coli-Bakterien nicht in der Lage sind.

Mittels meiner Untersuchungen gelang es mir nicht, bei den TRPM3-Varianten eindeutige Spleißform-spezifische Interaktionsdomänen finden. Ich konnte jedoch bei allen untersuchten TRPM3-Varianten eine starke Interaktionsregion identifizieren, welche die carboxyterminale putative Coiled-Coil-Region von TRPM3 enthielt. Meine weiteren Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Rolle dieses ubiquitären Strukturmotivs bei der Zusammenlagerung funktioneller TRPM3-Kanäle.

6.3. MULTIMERISIERUNG VON TRP-KANÄLEN

Bei nahezu allen Ionenkanälen lagern sich einzelne Untereinheiten zu multimeren Proteinkomplexen zusammen und bilden so eine ionenleitende Pore. Für diesen Prozess der Multimerisierung muss die Primärsequenz des Proteins Determinanten aufweisen, welche die Zusammenlagerung steuern und festlegen, ob homomere oder heteromere Kanalkomplexe gebildet werden können.

Man geht davon aus, dass TRP-Kanäle analog den spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch Zusammenlagerung vier einzelner Untereinheiten einen funktionellen Kanal bilden. Eine Multimerisierung konnte bisher unter anderem für die Mitglieder TRPV1, TRPV2 und TRPV5 und TRPV6 gezeigt werden (Erlor et al., 2004; Hoenderop et al., 2003; Jahnel et al., 2001; Kedei et al., 2001). Es wurde zudem gezeigt, dass die nahen Verwandten TRPM6 und TRPM7 Heteromultimere bilden können (Chubanov et al., 2004). Verschiedene Mutationen des TRPM6-Gens, welche diese Heteromerisierung beeinträchtigen, liegen der Erbkrankheit „Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie“ zugrunde (Chubanov et al., 2004; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Der Prozess der Heteromultimerisierung könnte ähnlich wie der des alternativen Spleißens der Vergrößerung der funktionellen Diversität von TRP-Kanälen dienen.

Da sich die verschiedenen Mitglieder der TRP-Familie hinsichtlich ihrer zytoplasmatischen Proteinmotive stark unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Tetramerisierungssignale ebenfalls unterschiedlich sind. Es ist somit unwahrscheinlich, dass dem Prozess der Multimerisierung von TRP-Kanälen ein einzig geltender Mechanismus zugrunde liegt.

Verschiedene Struktur motive spielen eine Schlüsselfunktion bei der Multimerisierung von TRP-Kanälen. Aminoternale Ankyrin repeats scheinen für die Multimerisierung von TRPV4 und TRPV5/6 Kanälen essentiell zu sein (Arniges et al., 2006; Chang et al., 2004; Erlor et al., 2004). Coiled-Coil-Regionen spielen ebenfalls häufig eine Rolle bei der Multimerisierung. Wie bereits erwähnt enthalten die in meinen Experimenten stark interagierenden TRPM3-Proteinfragmente dieses Strukturmotiv.

6.3.1. COILED-COIL-REGIONEN

So genannte Coiled-Coil-Regionen sind innerhalb der TRP-Familie ein häufig zu findendes Strukturmotiv (siehe auch 2.2.2.). Sie scheinen bei der Multimerisierung verschiedener spannungsabhängiger Kationenkanäle wie den EAG (*ether-a-go-go*)-Kaliumkanälen (Jenke et al., 2003), den KCNQ-Kaliumkanälen (Schwake et al., 2006) und den CNG (*cyclic nucleotide-gated*)-Kanälen (Zhong et al., 2003; Zhong et al., 2002) eine wichtige Rolle zu spielen.

Betrachtet man die Proteinsequenzen der TRPM-Familie mit dem Programm COILS (Lupas et al., 1991), so stellt man fest, dass alle TRPM-Proteine Coiled-Coil-Regionen aufweisen (Erler et al., 2006), (Abbildung 12).

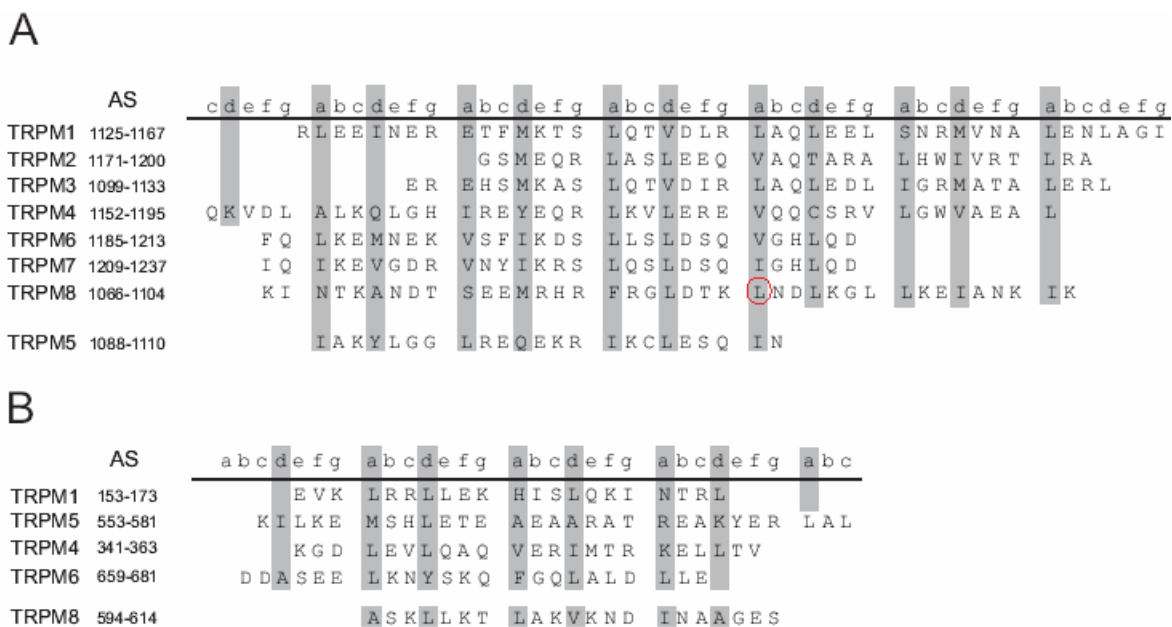


Abbildung 12: Übersicht über Coiled-Coil-Regionen (CC) von hTRPM. A. Mittels des Programms COILS (Lupas et al., 1991) konnte bei 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d bei den meisten Mitgliedern der TRPM-Gruppe mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50% eine vier Heptaden umfassende, carboxyterminale Coiled-Coil-Region gefunden werden. Für TRPM5 konnte lediglich eine drei Heptaden umfassende Coiled-Coil-Region im Carboxyterminus nachgewiesen werden. B. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeiten zur Ausbildung aminoterminaler Coiled-Coil-Regionen, so fällt auf, dass TRPM5 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vier Heptaden umfassende Coiled-Coil-Region aufweist während andere Mitglieder lediglich drei Heptaden umfassende, aminoterminaler Coiled-Coil-Regionen ausbilden (Erler et al., 2006).

Zu Beginn meiner Arbeit gab es wenig publizierte Erkenntnisse über die Rolle der Coiled-Coil-Domänen bei der Multimerisierung von TRPM-Kanälen. Es war bekannt, dass Deletionen putativer Coiled-Coil-Regionen von TRPM4 und von TRPV1 einen Verlust der homotypischen Interaktionsfähigkeit der Untereinheiten zur Folge haben (Garcia-Sanz et al., 2004; Launay et al., 2004). Zudem lagen erste Ergebnisse einer später veröffentlichten Arbeit (Erler et al., 2006) vor, welche auf eine essentielle Beteiligung der Coiled-Coil-Region bei der Multimerisierung von TRPM8 hindeuteten.

Verschiedene Arbeiten haben später gezeigt, dass Coiled-Coil-Regionen eine Schlüsselrolle bei der Multimerisierung einzelner Mitglieder der TRPM-Familie spielen. Sowohl die Deletion der Coiled-Coil-Region von TRPM2 als auch das Einfügen gezielter Punktmutationen im Bereich der strukturell wichtigen Aminosäurereste a und d innerhalb dieser Proteindomäne beeinträchtigt die Interaktion der Untereinheiten und die funktionelle Aktivität des Kanals (Mei et al., 2006). Auch für die Multimerisierung von TRPM8 ist die Coiled-Coil-Region essentiell. Deletion und Mutation der Coiled-Coil-Region von TRPM8 führen zum Verlust der Kanalaktivität (Erler et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Die Arbeit von Tsuruda et al. liefert zudem Hinweise dafür, dass die Coiled-Coil-Region bei der Multimerisierung von TRPM3 eine Rolle spielen könnte. Es wurden allerdings lediglich kurze Fusionsproteine auf ihre Fähigkeit hin untersucht, tetramere Proteinkomplexe zu bilden.

6.3.2. ZERSTÖRUNG DER COILED-COIL-REGION VON TRPM3

Vor beschriebenem Hintergrund und aufgrund der Ergebnisse der Interaktionsstudien lag es nahe, anzunehmen, dass die Coiled-Coil-Region als charakteristisches Strukturelement der TRPM-Proteine die Multimerisierungsdomäne dieser TRP-Unterfamilie darstellen könnte. In weiteren Experimenten wollte ich daher untersuchen, welche Rolle die Interaktionen der die Coiled-Coil-Region beinhaltenden Fragmente für die Multimerisierung der TRPM3-Kanalkomplexe spielen könnten.

Um dies zu erreichen, habe ich die helixbrechende Punktmutation L1270P mittels Quickchange-PCR in die putative Coiled-Coil-Region des Fragments C-Term 1 eingefügt (C-Term 1 PM). Im Folgenden konnten mit dem mutierten Fragment keine Interaktionen mehr nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9; 5.1.5.). Durch Einführen der helixbrechenden Punktmutation konnte somit sowohl die starke Selbstinteraktion des Fragments C-Term 1 als auch dessen Interaktion mit dem Fragment C-Term 1-H vollständig zerstört werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die putative Coiled-Coil-Region die Multimerisierungsdomäne des Proteins TRPM3 darstellen könnte.

6.4. KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Bei Experimenten mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems werden Interaktionen von Proteinfragmenten untersucht. Auf das Verhalten der Gesamtproteine kann mittels dieser Versuche somit nicht unbedingt geschlossen werden. Daher wollte ich mittels einer weiteren Methode untersuchen, welche Auswirkungen die Zerstörung der putativen Coiled-Coil-Region von TRPM3 auf die Multimerisierung des Gesamtproteins TRPM3 hat. Zu diesem Zweck habe ich die oben beschriebene, helixbrechende Punktmutation L1270P in die Coiled-Coil-Region des Volllängenproteins TRPM3 eingefügt. Mittels einer Ko-Immunopräzipitation aus modifizierten HEK293-Zellen habe ich einerseits die Selbstinteraktion von TRPM3-Wildtyp-Untereinheiten und andererseits die Interaktion von Untereinheiten der TRPM3-Punktmutante mit Untereinheiten des Wildtyps untersucht. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 10) zeigten, dass sowohl der Wildtyp als auch die Punktmutante ähnlich stark mit TRPM3 interagieren konnten. Somit konnte die Interaktionsfähigkeit des Volllängen-TRPM3-Proteins in diesem Experiment nicht durch Einfügen der helixbrechenden Punktmutation L1270P in die Coiled-Coil-Region aufgehoben werden.

Die Diskrepanz zu den mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems erhaltenen Ergebnissen könnte darauf beruhen, dass die eingefügte Mutation in dem Volllängenprotein im Gegensatz zu der Mutation in dem kurzen Bait-Fusionsprotein nicht ausreichte, um die Struktur der Coiled-Coil-Region ausreichend stark zu verändern. Wie bereits erwähnt berechnet der Algorithmus COILS die Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur. Abb. 8 (5.1.5.) verdeutlicht, dass die von mir eingefügte Mutation L1270P keine vollständige sondern lediglich eine partielle Zerstörung der Coiled-Coil-Struktur von TRPM3 bewirkte. Daher könnte es interessant sein, eine zweite helixbrechende Punktmutation in die Coiled-Coil-Region einzufügen.

Eine weitere Erklärung wäre, dass der Prozess der Multimerisierung des Proteins TRPM3 im Gegensatz zu den Proteinen TRPM8 und TRPM2 nicht alleine durch die Coiled-Coil-Region gesteuert wird, sondern dass noch weitere Proteindomänen an diesem Prozess beteiligt sind. Dies könnte die Tatsache erklären, dass bei Experimenten mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems, in welchem lediglich Proteinfragmente und nicht Volllängenproteine untersucht werden können, die Deletion der putativen Coiled-Coil-Region die Interaktionsfähigkeit völlig zerstörte, während bei den Ko-Immunpräzipitationen keine Änderung der Interaktionsstärke detektiert werden konnte. Die Tatsache, dass bei den Interaktionsstudien keine weitere potenzielle Multimerisierungsdomäne identifiziert wurde, könnte an der Größe der untersuchten Fragmente liegen. Eventuell wurden Interaktionen durch Faltungsprozesse großer Fragmente sterisch behindert oder aber die langen Fusionsproteine wurden unzureichend exprimiert. Dafür spricht auch, dass zwar die beiden Fragmente C-Term 1 und C-Term 1-H, nicht aber der gesamte C-Term Selbstinteraktionen zeigten, obwohl all diese Fragmente die putative Coiled-Coil-Region aufweisen. Da C-Term 1 in C-Term enthalten ist, hätte man zudem eine stärkere Interaktion dieser beiden Fragmente

erwartet. Da das N-Term-Fragment N-Term 2 sehr groß ist könnte eine weitere, aminoterminaler Interaktionsdomäne übersehen worden sein. Ähnliche Beobachtungen wurden schon bei vorhergehenden Untersuchungen mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems gemacht. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass eine weitere potenzielle Multimerisierungsstelle aufgrund ihrer Lokalisation mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems nicht gefunden werden konnte, beispielsweise da sie sich innerhalb der Transmembrandomänen befindet. Somit wären weiterführende Interaktionsstudien mit kürzeren rekombinanten Fragmenten oder auch zusätzliche Ko-Immünpräzipitationen mit TRPM3-Deletionsmutanten sicherlich interessant.

Mittels des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems habe ich eine starke, nicht Spleißform-spezifische Interaktionsregion gefunden, welche die Coiled-Coil-Region als charakteristisches Strukturmotiv beinhaltet. Durch Einfügen einer einzigen, gezielten Punktmutation in die putative Coiled-Coil-Region konnte ich die vorher starken Interaktionen der entsprechenden Proteinfragmente vollständig zerstören. Diese Ergebnisse ließen auf eine Funktion dieses gut untersuchten Proteinmotivs bei der Multimerisierung von TRPM3 schließen. Die nachfolgend durchgeführte Ko-Immünpräzipitation konnte diese Annahme zwar nicht bestätigen, weiterführende Experimente könnten jedoch sicherlich helfen, die Rolle der Coiled-Coil-Region bei der Multimerisierung von TRPM3 genauer zu klären. Interessant wäre es beispielsweise, die putative Coiled-Coil-Region durch Einfügen einer weiteren helixbrechenden Punktmutation vollständig zu zerstören.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF and Tymianski M (2003) A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* **115**(7):863-877.
2. Abe J, Hosokawa H, Okazawa M, Kandachi M, Sawada Y, Yamanaka K, Matsumura K and Kobayashi S (2005) TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res* **136**(1-2):91-98.
3. Altarescu G, Sun M, Moore DF, Smith JA, Wiggs EA, Solomon BI, Patronas NJ, Frei KP, Gupta S, Kaneski CR, Quarrell OW, Slaugenhaupt SA, Goldin E and Schiffmann R (2002) The neurogenetics of mucopolidosis type IV. *Neurology* **59**(3):306-313.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3):403-410.
5. Arndt KM, Pelletier JN, Muller KM, Pluckthun A and Alber T (2002) Comparison of in vivo selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure* **10**(9):1235-1248.
6. Arniges M, Fernandez-Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M and Valverde MA (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem* **281**(3):1580-1586.
7. Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, Mauroy B and Prevarskaya N (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**(2):367-382.
8. Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6):1513-1523.
9. Bollimuntha S, Singh BB, Shavali S, Sharma SK and Ebadi M (2005) TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **280**(3):2132-2140.
10. Burkhard P, Stetefeld J and Strelkov SV (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**(2):82-88.
11. Cahalan MD (2001) Cell biology. Channels as enzymes. *Nature* **411**(6837):542-543.
12. Chang Q, Gyftogianni E, van de Graaf SF, Hoefs S, Weidema FA, Bindels RJ and Hoenderop JG (2004) Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J Biol Chem* **279**(52):54304-54311.
13. Chubanov V, Mederos y Schnitzler M, Waring J, Plank A and Gudermann T (2005) Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**(4):334-341.
14. Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, Konrad M and Gudermann T (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.

15. Chung CT, Niemela SL and Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7):2172-2175.
16. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**(6966):517-524.
17. Cosens DJ and Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**(5216):285-287.
18. Dove SL, Joung JK and Hochschild A (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**(6625):627-630.
19. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M and McCarthy JJ (2001) Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* **19**(2):568-576.
20. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI and Shyjan AW (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**(7):1515-1520.
21. Elizondo MR, Arduini BL, Paulsen J, MacDonald EL, Sabel JL, Henion PD, Cornell RA and Parichy DM (2005) Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for *trpm7*. *Curr Biol* **15**(7):667-671.
22. Engelke DR, Krikos A, Bruck ME and Ginsburg D (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **191**(2):396-400.
23. Erler I (2007) TRPV6 und TRPM8: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen; Dissertation der Universität des Saarlandes URN: urn:nbn:de:bsz:291-scidok-10221
24. Erler I, Al-Ansary DMM, Wissenbach U, Wagner TFJ, Flockerzi V and Niemeyer BA (2006) Trafficking and Assembly of the Cold-sensitive TRPM8 Channel. *J Biol Chem* **281**(50):38396-38404.
25. Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V and Niemeyer BA (2004) Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* **279**(33):34456-34463.
26. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V and Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**(49):7858-7861.
27. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE and McNulty S (2006) Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* **26**(3):159-178.
28. Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G and Ferrer-Montiel A (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* **24**(23):5307-5314.
29. Grimm C, Kraft R, Schultz G and Harteneck C (2005) Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 [corrected] by D-erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol* **67**(3):798-805.
30. Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G and Harteneck C (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* **278**(24):21493-21501.

31. Hardie RC and Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**(4):643-651.
32. Hill K, Tigue NJ, Kelsell RE, Benham CD, McNulty S, Schaefer M and Randall AD (2006) Characterisation of recombinant rat TRPM2 and a TRPM2-like conductance in cultured rat striatal neurones. *Neuropharmacology* **50**(1):89-97.
33. Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B and Bindels RJ (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J* **22**(4):776-785.
34. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T and Montell C (2003) TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* **13**(13):1153-1158.
35. Holmes DS and Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**(1):193-197.
36. Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J and Hucho F (2001) Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* **268**(21):5489-5496.
37. Jenke M, Sanchez A, Monje F, Stuhmer W, Weseloh RM and Pardo LA (2003) C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *Embo J* **22**(3):395-403.
38. Jin X, Touhey J and Gaudet R (2006) Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* **281**(35):25006-25010.
39. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ and Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**(30):28613-28619.
40. Kiselyov K, Soyombo A and Muallem S (2007) TRPpathies. *J Physiol* **578**(Pt 3):641-653.
41. Kraft R, Grimm C, Große K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G and Harteneck C (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(1):C129-137.
42. Kunert-Keil C, Bisping F, Kruger J and Brinkmeier H (2006) Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* **7**:159.
43. Launay P, Cheng H, Srivatsan S, Penner R, Fleig A and Kinet JP (2004) TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* **306**(5700):1374-1377.
44. Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R and Kinet JP (2002) TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* **109**(3):397-407.
45. Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC and Blannar MA (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* **278**(23):20890-20897.

46. Lis A, Wissenbach U and Philipp SE (2005) Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**(4):315-324.
47. Lupas AN and Gruber M (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* **70**:37-78.
48. Lupas A (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**(10):375-382.
49. Lupas A, Van Dyke M and Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**(5010):1162-1164.
50. McCleverty CJ, Koesema E, Patapoutian A, Lesley SA and Kreusch A (2006) Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci* **15**(9):2201-2206.
51. McKemy DD, Neuhausser WM and Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**(6876):52-58.
52. Mei Z-Z, Xia R, Beech DJ and Jiang L-H (2006) Intracellular Coiled-coil Domain Engaged in Subunit Interaction and Assembly of Melastatin-related Transient Receptor Potential Channel 2. *J Biol Chem* **281**(50):38748-38756.
53. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**(272):re3.
54. Montell C, Birnbaumer L and Flockerzi V (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**(5):595-598.
55. Montell C and Rubin GM (1989) Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**(4):1313-1323.
56. Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350.
57. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-273.
58. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM and Fleig A (2001) LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**(6837):590-595.
59. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F and Shimizu N (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* **54**(1):124-131.
60. Nealen ML, Gold MS, Thut PD and Caterina MJ (2003) TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* **90**(1):515-520.
61. Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U and Flockerzi V (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **278**(33):30813-30820.
62. Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V and Philipp SE (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* **280**(23):22540-22548.

63. Pedersen SF, Owsianik G and Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**(3-4):233-252.
64. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**(5):705-715.
65. Perez CA, Margolskee RF, Kinnamon SC and Ogura T (2003) Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium* **33**(5-6):541-549.
66. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP and Scharenberg AM (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**(6837):595-599.
67. Qamar S, Vadivelu M and Sandford R (2007) TRP channels and kidney disease: lessons from polycystic kidney disease. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 1):124-128.
68. Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I and Logothetis DE (2005) PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* **8**(5):626-634.
69. Runnels LW, Yue L and Clapham DE (2001) TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**(5506):1043-1047.
70. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12):5463-5467.
71. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H and Furuichi K (2001) Immuncyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science* **293**(5533):1327-1330.
72. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW and Konrad M (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* **31**(2):166-170.
73. Schwake M, Athanasiadu D, Beimgraben C, Blanz J, Beck C, Jentsch TJ, Saftig P and Friedrich T (2006) Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *J Neurosci* **26**(14):3757-3766.
74. Tong Q, Zhang W, Conrad K, Mostoller K, Cheung JY, Peterson BZ and Miller BA (2006) Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca²⁺ sensor calmodulin. *J Biol Chem* **281**(14):9076-9085.
75. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S and Laus R (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* **61**(9):3760-3769.
76. Tsuruda PR, Julius D and Minor JDL (2006) Coiled Coils Direct Assembly of a Cold-Activated TRP Channel. *Neuron* **51**(2):201-212.

77. Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V and Freichel M (2007) Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol* **8**(3):312-320.
78. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V and Nilius B (2004a) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**(7001):748-754.
79. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ and Hoenderop JG (2004b) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* **279**(1):19-25.
80. Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochoowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R and Sheffield VC (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* **31**(2):171-174.
81. Woolfson DN (2005) The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv Protein Chem* **70**:79-112.
82. Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC and Kuriyan J (2001) Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell* **7**(5):1047-1057.
83. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS and Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**(3):293-301.
84. Zhong H, Lai J and Yau KW (2003) Selective heteromeric assembly of cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9):5509-5513.
85. Zhong H, Molday LL, Molday RS and Yau KW (2002) The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature* **420**(6912):193-198.

8. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Dr. Barbara Niemeyer-Hoth bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Dissertation sowie für ihre große Geduld.

Dr. Isabelle Erler danke ich für den netten Empfang, die wochenlange Einführung und die vielen, geduldigen Erklärungen. In besonderem Maße danke ich Sabrina Ploog, die in schwierigen Zeiten auch außerhalb des Laboralltags immer für mich da war und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch an Ulrich Kriebs für die Unterstützung und die ermunternden Worte.

PD Dr. Stephan Philipp, Dr. Johannes Oberwinkler, PD Dr. Ulrich Wissenbach und PD Dr. Dr. Matthias Boedding danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung.

Für die schöne Zeit im Labor und die zahllosen Ratschläge danke ich Karin Wolske. Vielen Dank auch an Melanie Portz und Katja Schuster für das Korrekturlesen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Martin Simon-Thomas und bei Heidi Löhr. Vielen Dank an Inge Vehar und Christa Seelinger für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Ich danke meiner Mutter, meiner Schwester Michelle und meinen Großeltern für das geduldige Zuhören und die liebevolle Unterstützung.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Freund Christian und meinen Freunden Kerstin, Katrin, Steffi, Tine, Anne, Farsin, Christina und Jens aussprechen. Ohne deren Verständnis und Unterstützung wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

9. LEBENSLAUF

JANINE PÖSS

Universität des Saarlandes
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Gebäude 46
66421 Homburg

PERSÖNLICHE INFORMATION

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 22.5.1981

Geburtsort: Saarbrücken

SCHULAUSSBILDUNG

1987-1991 Grundschole Riegelsberg

1991-2000 Deutsch-Französisches Gymnasium Saarbrücken

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

Seit 10/2000 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

10/2002 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)

09/2002-08/2003 Studium der Humanmedizin an der Università degli studi di Perugia (Italien) im Rahmen des ERASMUS-Programms

03/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

10/2007 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO)

KLINISCHE AUSBILDUNG

08/2003 Famulatur Pathologie, Kantonsspital St.Gallen, Schweiz, Prof. Dr. U. Schmid

07/2003 Famulatur Innere Medizin, Università degli studi di Perugia, Italien, Prof. G. Nenci

07/2005 Famulatur Innere Medizin (Notaufnahme), Hôpital Saint Roch, Nizza, Frankreich, Prof. F. Bertrand

03/2005 Famulatur, Praxis für Anästhesiologie und Orthopädie, Saarbrücken, Dr. med. E. Schönhaber

- 02/2006- 01/2007 Praktisches Jahr
- Innere Medizin:
- Kantonsspital Laufen, Schweiz, Dr. med. M. Bianchetti
- Chirurgie:
- Universitätsklinikum Homburg/Saar, Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Prof. Dr. T. Pohleman
 - Toronto General Hospital/Toronto East General Hospital, Kanada. Herzchirurgie, Dr. Brister; Allgemeinchirurgie, Dr. Mackenzie
- Anästhesie:
- Universitätsklinikum Homburg/Saar, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Prof. Dr. R. Larsen

PROMOTION

- Seit 2004 „TRPM3: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen“
- Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
und Toxikologie der Universität des Saarlandes
- Betreuer: Dr. Niemeyer-Hoth/ Prof. Flockerzi

WEITERE TÄTIGKEITEN

- SS 2005 und 2007 Betreuerin des Praktikums Physiologie für Mediziner
- WS 2005/2006 Betreuerin von Studenten im Kurs der makroskopischen Anatomie
- Seit 2005 Zweifache Beitragsautorin bei einem mehrbändigen medizinischen Lehrbuchprojekt (Erscheinungstermin 2007) des Springer Verlags.
- 10/2005 Mitautorin des Beitrages „Sensitivity of children to EMF exposure“, erschienen in der „Edition Wissenschaft“ der Forschungsgemeinschaft Funk e.V.

SPRACHKENNTNISSE

- Englisch: Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
- Französisch: Fließend in Wort und Schrift
- Italienisch: Gute Kenntnisse in Wort und Schrift