

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

**Untersuchungen zur Funktion der Coiled-Coil-Domäne des
Steroid gesteuerten TRPM3-Ionenkanals**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes*

**Gilda Schmidt
Homburg
2012**

Betreuer: Priv. Doz. Dr. Stephan Philipp

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| | Summary | 2 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Calcium als Botenstoff der Zelle..... | 3 |
| 2.2 | Die TRP-Kanalfamilie..... | 3 |
| 2.3 | Struktur von TRP-Kanälen | 7 |
| 2.4 | TRPM3 | 10 |
| 2.5 | Zielsetzung der Arbeit | 13 |
| 3 | Material und Methoden | 14 |
| 3.1 | Chemikalien und Gerätschaften..... | 14 |
| 3.2 | Plasmidvektor | 14 |
| 3.3 | Oligodesoxyribonukleotide | 15 |
| 3.4 | Antikörper | 16 |
| 3.5 | Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i> | 16 |
| 3.5.1 | Bakterienstämme und Medien | 16 |
| 3.5.2 | Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 17 |
| 3.5.3 | Transformation kompetenter <i>E.coli</i> | 17 |
| 3.5.4 | Anlage von <i>E.coli</i> -Stammkulturen | 18 |
| 3.6 | Präparation, Modifikation und Analyse von DNA..... | 18 |
| 3.6.1 | Analytische Schnellpräparation von Plasmid-DNA | 18 |
| 3.6.2 | Plasmidpräparation durch Anionenaustausch-Chromatografie..... | 19 |
| 3.6.3 | Mengen- und Reinheitsbestimmung von DNA..... | 20 |
| 3.6.4 | Präzipitation von DNA | 20 |
| 3.6.5 | Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese | 20 |
| 3.6.6 | Elektroelution | 21 |
| 3.6.7 | DNA-Sequenzierung | 21 |
| 3.6.8 | Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen..... | 22 |
| 3.6.9 | Dephosphorylierung der DNA durch alkalische Phosphatase | 22 |
| 3.6.10 | Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren | 22 |
| 3.6.11 | Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 23 |
| 3.6.12 | Ortsspezifische Mutagenese..... | 24 |
| 3.7 | Proteinchemische Methoden..... | 24 |
| 3.7.1 | Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryontischen Zellen..... | 24 |
| 3.7.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 25 |
| 3.7.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 25 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.7.4 | Western-Blot..... | 26 |
| 3.7.5 | Biotinylierung von Proteinen an der Zelloberfläche | 27 |
| 3.8 | Kultivierung und Transfektion eukaryotischer Zellen | 28 |
| 3.8.1 | Kultivierung von Zelllinien | 28 |
| 3.8.2 | Transfektion eukaryotischer Zellen | 29 |
| 3.9 | Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mit Hilfe des ratiometrischen Calciumindikatorfarbstoffes Fura-2AM | 30 |
| 4 | Ergebnisse | 32 |
| 4.1 | Amino- und Carboxyterminus sind für die Bildung funktionstüchtiger TRPM3-Ionenkanäle wesentlich..... | 32 |
| 4.2 | TRPM3 besitzt eine Coiled-Coil-Domäne im C-Terminus..... | 35 |
| 4.3 | Strategien zur Analyse der funktionellen Bedeutung der Coiled-Coil-Region des TRPM3-Proteins..... | 36 |
| 4.3.1 | Strategie 1: Deletion der Coiled-Coil-Region durch schrittweise Verkürzung des C-Terminus | 37 |
| 4.3.2 | Strategie 2: Deletion der Coiled-Coil-Domäne durch gezielte Mutagenese essentieller Aminosäurereste | 39 |
| 4.4 | Herstellung und Expression von TRM3-Mutanten | 44 |
| 4.4.1 | Herstellung C-terminaler Deletionsmutanten von TRPM3 α 2 | 44 |
| 4.4.2 | Expressionsanalyse C-terminaler Deletionsmutanten von TRPM3 α 2 | 46 |
| 4.4.3 | Herstellung einer Punktmutanten 3LnP und Analyse ihrer Expression..... | 47 |
| 4.5 | Funktionelle Analyse von TRPM3-Mutanten | 48 |
| 4.5.1 | Funktionelle Analyse von TRPM3 α 2-Deletionsmutanten | 48 |
| 4.5.2 | Funktionelle Analyse der Punktmutanten 3LnP | 51 |
| 4.5.3 | Gegenwart der 3LnP Mutante an der Zelloberfläche | 53 |
| 5 | Diskussion | 54 |
| 5.1 | Beeinflussung des TRPM3-Kanals durch die TRP-Domäne..... | 54 |
| 5.2 | Identifizierung der Coiled-Coil-Domäne im TRPM3-Protein..... | 55 |
| 5.3 | Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne für TRPM3-Ionenkanäle..... | 56 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 58 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanalproteine aus Säugern | 4 |
| Abb. 2: Topologie von Proteinen der TRP-Familie | 7 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung eines tetrameren TRP-Kanalkomplexes..... | 8 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung eines parallelen, dimeren Coiled-Coil..... | 10 |
| Abb. 5: Schematische Darstellung von TRPM3-Spleißvarianten und deren Porenregion.... | 12 |
| Abb. 6: Zirkuläre Karte des Vektors pCAGGSM2/IRES-GFP | 14 |
| Abb. 7: Berechnung der Maximalamplituden in Fura-2-Messungen | 31 |
| Abb. 8: Expression von C- und N-terminal trunkierten TRPM3-Proteinen in HEK-tsA201-Zellen | 32 |
| Abb. 9: C-terminal und N-terminal verkürzte TRPM3-Proteine zeigen nach Pregnenolonsulfat-Stimulation kein Ca^{2+} -Signal..... | 34 |
| Abb.10: Prognose von Coiled-Coil-Regionen im TRPM3 α 2-Protein mittels „Coils“..... | 36 |
| Abb.11: Durch sukzessive C-terminale Verkürzung von TRPM3 α 2 geht die Coiled-Coil-Region verloren..... | 38 |
| Abb.12: Der Austausch von Leucinresten zu Prolin in den Heptaden-Positionen a3, d6, d8 von TRPM3 α 2 führt zur Zerstörung der Coiled-Coil-Domäne..... | 44 |
| Abb.13: Klonierung C-terminaler Deletionsmutanten C1277-C1217..... | 45 |
| Abb.14: Analyse der Expression C-terminaler Deletionsmutanten | 46 |
| Abb.15: Analyse der Expression von TRPM3 α 2 und der Mutanten TRPM3 α 2-3LnP..... | 47 |
| Abb.16: Beteiligung der Coiled-Coil-Domäne am Ca^{2+} -Einstrom..... | 50 |
| Abb.17: Signifikante Reduktion des Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Signals in der untersuchten Mutante 3LnP im Vergleich zum Wildtyp-Protein TRPM3 α 2..... | 52 |
| Abb.18: Biotinylierung der Proteine TRPM3 α 2 und 3LnP an der Zelloberfläche..... | 53 |
| Abb.19: Beteiligung der TRP-Domäne an der Modulation von TRPM3-Ionenkanälen..... | 55 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Eigenschaften von TRP-Proteinen aus Säugern..... | 6 |
| Tab. 2: Für Sequenzierungen verwendete Oligodesoxyribonukleotide..... | 15 |
| Tab. 3: Oligodesoxyribonukleotide, die für die Polymerasekettenreaktion verwendet wurden | 15 |
| Tab. 4: Verwendete Antikörper | 16 |
| Tab. 5: Verwendete Restriktionsnukleasen..... | 22 |
| Tab. 6: Verwendete Zelllinien | 29 |
| Tab. 7: Für Fura-Messungen verwendete Pufferlösungen | 31 |
| Tab. 8: Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Domäne bei einem einzelnen Austausch in den Heptaden-Positionen a1 bis d8 durch die Aminosäure Prolin | 39 |
| Tab. 9: Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Struktur bei gezieltem Austausch von zwei Aminosäureresten in den Heptaden-Positionen a1 bis d8 durch die Aminosäure Prolin | 40 |
| Tab. 10: Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Struktur nach gezieltem Austausch von L1258 und zwei weiteren Aminosäuren in den Heptaden- Positionen a1 bis d8 durch Prolin..... | 42 |

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten und Größen

| | |
|----------------|---|
| bp | Basenpaare |
| cm | Zentimeter |
| ds | doppelsträngig |
| d | Tag |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| kb | Kilobasen |
| kD | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| mA | Milliampere |
| mM | Millimolar |
| M | Molar |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| min | Minute |
| mV | Millivolt |
| rpm | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| sec | Sekunde |
| T _m | mittlere Schmelztemperatur |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| % (v/v) | Volumenprozent (ml/100ml) |
| % (w/v) | Gewichtsprozent (g/100ml) |

Sonstige Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AS | Aminosäure |
| AK | Antikörper |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | Copy DNA |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CNG-Kanäle | cyclisch-Nukleotid-gesteuerte Kanäle |
| COS | Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40, Fibroblasten-Zelllinie, |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| DAG | Diacylglycerol |
| dATP | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat |

| | |
|------------|--|
| dGTP | 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| dTTP | 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | 2'-Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamin-tetraessigsäure |
| EPSC | Excitatory postsynaptic current |
| FCS | Fötales Kälberserum (fetal calf serum) |
| HEK293 | Human embryonal kidney cells |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactosylpyranosid |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| PBS | Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PMCA | Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| PregS | Pregnenolonsulfat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SERCA | Ca ²⁺ -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums |
| TBS | Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TBST | TBS mit Tween 10 |
| TEMED | N, N, N, N-Tetramethyl-ethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid |
| TRP | Transient receptor potential (transientes Rezeptorpotential) |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaureat |

Symbole für Aminosäuren

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| D | Asparaginsäure |
| E | Glutaminsäure |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| P | Prolin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |

1 Zusammenfassung

Transient-Rezeptor-Potential-M3-Proteine (TRPM3) bilden Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen. Sie werden u. a. in Hinterwurzel- und Trigemininalganglien und in β -Zellen des Pankreas exprimiert und bilden dort Schmerzrezeptoren noxischer Temperaturen oder tragen zur Freisetzung von Insulin bei. Nach dem gegenwärtigen Modell besitzen sie sechs Transmembrandomänen, die die Plasmamembran durchqueren und Amino- und Carboxy-Termini sind im Cytosol der Zelle lokalisiert. Nach Assemblierung von vermutlich vier TRPM3-Proteinuntereinheiten bildet der Bereich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne die ionenleitende Pore des Kanals.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich mittels bildgebender Verfahren die Bedeutung des Amino- und Carboxy-Terminus von TRPM3 für TRPM3-vermittelte Ca^{2+} -Signale untersucht und zeige, dass beide Proteinabschnitte essentiell für die Funktionstüchtigkeit des Kanals sind. Mit Hilfe einer computergestützten Analyse der TRPM3-Aminosäuresequenz konnte ich eine Coiled-Coil-Domäne im C-Terminus von TRPM3 identifizieren, die an entsprechender Position auch in verwandten TRPM-Proteinen vorkommt und dort wesentlich zur Assemblierung der Proteinuntereinheiten beiträgt. Die Bedeutung dieser Coiled-Coil-Domäne für die Funktionstüchtigkeit von TRPM3-Ionenkanälen wurde sowohl nach schrittweiser Verkürzung als auch nach gezieltem Austausch einzelner für die Coiled-Coil-Struktur essentieller Aminosäurereste untersucht. In beiden Fällen kann trotz vollständigem Verlust der Coiled-Coil-Struktur ein TRPM3-vermitteltes Ca^{2+} -Signal nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass im Unterschied zu anderen TRPM-Proteinen TRPM3-Proteine auch unabhängig von der Coiled-Coil-Region funktionelle, Ca^{2+} -permeable Kanäle bilden.

Summary

Transient receptor potential-melastatin3-proteins (TRPM3) build Ca^{2+} permeable cation channels localized in the plasmamembrane of eucaryotic cells. They are expressed i. a. in neurons from dorsal root and trigeminal ganglia and in pancreatic β cells and are implicated as thermosensitive nociceptor channels in the detection of noxious heat or contribute to the secretion of insulin. According to the current model TRPM3 channels exhibit six transmembrane domains which cross the plasma membrane and amino- and carboxy termini are supposed to be located in the cytosol. Presumably four TRPM3 subunits assemble to build one channel complex in which the ion conducting pore is formed by a loop between the fifth and the sixth transmembrane domain.

In this work I analyzed the importance of the N- and C-terminal domains of TRPM3 via Ca^{2+} -imaging methods. I show that both protein regions are essential for a proper function in TRPM3 ion channels. By computational analysis of the TRPM3 amino acid sequence I could identify a coiled-coil domain in the carboxy terminus of TRPM3 comparable to other members of the TRPM family. They possess a coiled-coil domain at a corresponding position which is crucial for the assembly of channel subunits. The impact of the coiled-coil domain on the function of TRPM3 ion channels was analyzed by successive truncation of this domain as well as after site directed mutation of amino acid residues important for the coiled-coil structure. Using both methods I demonstrate that the complete deletion of the coiled-coil domain in TRPM3 did not imply a loss of functional responsiveness. The results demonstrate that in contrast to other members of the TRPM family TRPM3 proteins are able to form Ca^{2+} permeable cation channels independent of the coiled-coil domain.

2 Einleitung

2.1 Calcium als Botenstoff der Zelle

Im Zellinneren ist die Calciumkonzentration circa 20.000-fach geringer als im Extrazellulärraum. Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) und im Endoplasmatischen Retikulum (SERCA) stellen unter Energieverbrauch diesen Konzentrationsgradienten her. Er ist Voraussetzung für einen kontrollierten Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle, die eine schnelle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration erlauben und so eine Vielzahl zellulärer Funktionen steuern. Zum Beispiel werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle durch die Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Sie initiieren die Kontraktion von Herz- und Skelettmuskel sowie die Freisetzung von Neurotransmittern in der Synapse von Nervenzellen. Liganden-gesteuerte Rezeptor-Ionenkanäle werden hingegen durch extrazelluläre Bindung eines Agonisten aktiviert. So führt die Bindung des Neurotransmitters Glutamat an ionotrope Glutamatrezeptoren zur Öffnung solcher Kanäle in der Postsynapse und in dessen Folge zur Weiterleitung eines Aktionspotentials. Rezeptor-abhängige Kationenkanäle schließlich werden durch intrazelluläre Botenstoffen aktiviert, welche ihrerseits erst nach Stimulation membranständiger Rezeptoren gebildet werden. So bewirkt im Säugerauge die Absorption eines Photons durch Rhodopsin die Aktivierung des G-Proteins Transducin und nachfolgend die Veränderung des intrazellulären cGMPs, welches cyclisch-Nukleotid-gesteuerte Kanäle (CNG-Kanäle) reguliert.

2.2 Die TRP-Kanalfamilie

Auch im Komplexauge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bewirkt die Stimulation G-Protein gekoppelter Photorezeptoren die Öffnung von Kationenkanälen in der Plasmamembran. Nach Stimulation der Phospholipase C öffnen sich Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle) und führen zu einer langdauernden Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Die Funktionstüchtigkeit des TRP-Kanalproteins ist in der TRP-Mutante gestört. TRP-Fliegen zeigen einen nur transienten Anstieg des Membranpotentials und der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Nach kurzzeitiger Wahrnehmung eines Lichtreizes sind diese Fliegen blind (Montell und Rubin, 1989).

In Säugern sind 28 Proteine mit Sequenzhomologie zum *Drosophila*-TRP-Protein bekannt. (Wu et al., 2010). Sie bilden die TRP-Proteinfamilie, die in sechs Subfamilien unterteilt wird (Abb. 1). Die TRPC-Proteine (classical oder canonical TRP) sind mit dem *Drosophila* TRP-Kanal am nächsten verwandt. Die anderen TRP-Subfamilien wurden nach dem zuerst identifizierten Vertreter benannt (Montell et al., 2002b): TRPV nach dem Vanilloid-Rezeptor TRPV1 und TRPM nach dem auch als Melastatin bezeichneten TRPM1. Darüber hinaus werden die Mucopolipine (TRPML), Polycystine (TRPP) und das Ankyrin-Transmembran-Protein (TRPA1) zur Familie der TRP-Kationenkanäle gezählt.

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die einzelnen TRP-Kanäle erheblich in ihrer Ionenpermeabilität und Aktivierungsmechanismen. Die Existenz von TRP-Kanälen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt, dass der Ursprung der TRP-Kanäle der Entstehung der Metazoa vorausgeht und TRP-Kanäle wurden in zahlreichen höheren Organismen einschließlich *Caenorhabditis elegans*, Zebrafisch, Maus und Mensch nachgewiesen.

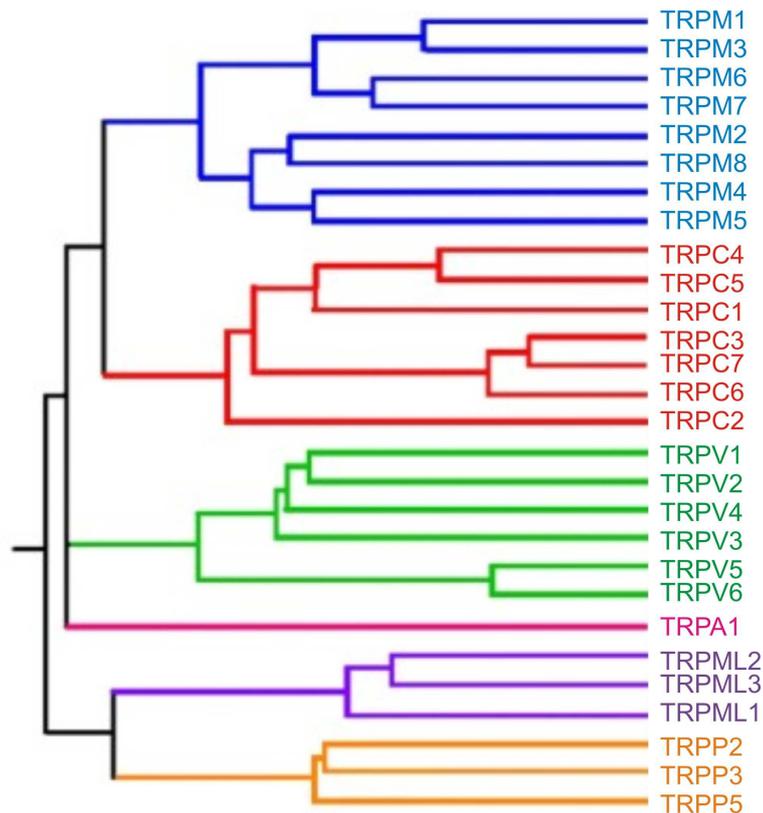


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanalproteine aus Säugern (modifiziert nach Gudermann und Flockerzi, 2005)

Die Einteilung der TRP-Kanäle erfolgt anders als bei vielen anderen Ionenkanälen nicht aufgrund ihrer Liganden, ihrer biophysikalischen Eigenschaften oder ihrer biologischen Funktion sondern ausschließlich aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz. Die Homologie einzelner Mitglieder unterschiedlicher Subfamilien beträgt weniger als 20%. Entsprechend unterschiedlich sind auch die Eigenschaften der TRP-Proteinen aus Säugern (Tab. 1; Montell, 2005). Nur wenige spezifische Agonisten oder Antagonisten von TRP-Kanälen sind bislang bekannt.

Die Selektivität einzelner TRP-Kanäle für bestimmte Kationen variiert beträchtlich (Tab. 1). Die meisten TRP-Kanäle sind mehr oder minder permeabel für Ca^{2+} -Ionen, mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5, welche nur monovalente Ionen ins Zellinnere lassen. (Launay et al., 2002; Hofmann et al., 2003)

Die TRP-Kanäle spielen auch eine zentrale Rolle in der Sinnesphysiologie. Sie sind wichtig sowohl für die Wahrnehmung von Temperatur, Berührung, Schmerz als auch für den Geruchs-, Gehör- und Geschmackssinn (Caterina et al., 2000, Montell et al., 2002a; Clapham, 2003).

Mutationen in TRP-Kanälen sind Ursache verschiedener Erkrankungen (Kiselyov et al., 2007): So ist die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) in ca. 20% der Fälle mit einer Mutation im TRPP2-Gen assoziiert (Montell, 2005; Hsu et al., 2007). Der Erbkrankheit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie liegen verschiedene Mutationen im TRPM6-Gen zugrunde (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Bei der lysosomalen Speicherkrankheit Mucopolidose Typ IV konnten nonsense oder missense Mutationen in einem Gen nachgewiesen werden, welches für TRPML1 kodiert (Bassi et al., 2000; Altarescu et al., 2002). Schließlich konnten bei der autosomal dominant vererbten Glomerulosklerose Mutationen im TRPC6 Gen identifiziert werden (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005).

Im Prostatacarcinom werden TRPV6- und TRPM8-Kanäle überexprimiert (Tsavaler et al., 2001; Wissenbach et al., 2001; Fixemer et al., 2003) und ihre Überexpression korreliert mit der Progressionstendenz des Carcinoms (Fuessel et al., 2003; Wissenbach et al., 2004; Zhang und Barritt, 2006). Demgegenüber wird für TRPM1 eine Rolle als Tumorsuppressor-Gen diskutiert und der Verlust von TRPM1-mRNA in metastasierendem Melanom ist ein wichtiger Vorhersagefaktor für die Progression des Hautkrebses (Duncan et al., 2001).

Tab. 1: Eigenschaften von TRP-Proteinen aus Säugern (modifiziert und erweitert nach Montell, 2005)

| Subfamilie | Name | Zahl der Aminosäurereste in Mensch (h) und Maus (m) | Selektivität P _{Ca} : P _{Na} | Aktivierung | Gewebe mit höchster Expression | Biologische Bedeutung/ assoziierte Erkrankungen |
|------------|------|---|---|--|--|--|
| TRPC | 1 | 793 (h) 809 (m) | Nicht selektiv | Speicher-reguliert ? | Herz, Hirn, Hoden, | Notwendig für EPSC in Purkinje-Zellen |
| | 2 | Pseudo-Gen (h) 1172 (m) | 2,7 | Speicher-reguliert ? DAG | Vomeronasales Organ, Hoden | Akrosomen-Reaktion, Pheromon-Wahrnehmung |
| | 3 | 848 (h) 836 (m) | 1,6 | Speicher-reguliert ? DAG, Exozytose | Hirn | Modulation des Wachstums von Neuriten |
| | 4 | 977 (h) 974 (m) | 7 | Speicher-reguliert ? | Hirn, Endothel, Nebenniere, Retina, Hoden | Vasorelaxation, Neurotransmitter-Freisetzung |
| | 5 | 973 (h) 975 (m) | 9,5 | Speicher-reguliert ? Exozytose | Hirn | Modulation des Wachstums von Neuriten |
| | 6 | 931 (h) 930 (m) | 5 | DAG | Lunge, Hirn | Fokal segmentale Glomerulosklerose, Plättchenaggregation |
| | 7 | 862 (h) 862 (m) | 5 | Speicher-reguliert ? DAG | Auge, Herz, Lunge | ? |
| TRPV | 1 | 839 (h) 839 (h) | 9,6 (Vanilloide) 3,8 (Hitze) | T>43°C, Vanilloide Anandamide, H ⁺ | Hinterwurzelganglien, Trigeminus Nerven, Harnblase | Sensorik von Hitze |
| | 2 | 764 (h) 756 (m) | 3 | T>52°C, Exozytose | Hinterwurzelganglien, Trigeminus Nerven, Rückenmark, Hirn, Milz, | Sensorik von Hitze |
| | 3 | 791 (h) 791 (m) | 2,6 | T > 30°C | Hinterwurzelganglien, Zunge, Keratinozyten, Trigeminusnerv, Rückenmark, Hirn | Sensorik von Wärme (30-39°C) |
| | 4 | 871 (h) 871 (m) | 6 | T>27°C, Zellvolumen, Phorbol ester | Hinterwurzelganglien, Niere, Lunge, Milz, Hoden, Leber, Herz, Keratinozyten, | Osmosensor, Sensorik von Wärme (27°C) |
| | 5 | 729 (h) 723 (m) | >100 | Niedrige [Ca ²⁺] _i , Hyperpolarisation | Niere, Pankreas, Plazenta Zwölffingerdarm, Dünndarm, , | Ca ²⁺ - Aufnahme in der Niere |
| | 6 | 725 (h) 727 (m) | >100 | Niedrige [Ca ²⁺] _i | Dünndarm, Pankreas, Plazenta, Prostatakarzinom | Ca ²⁺ - Homöostase, Differenzierung von Keratinozyten |
| TRPM | 1 | 1533 (h) 542 (m) | ? | ? | Auge, Melanozyten | Reizleitung Retina |
| | 2 | 1503 (h) 1507 (m) | ~0,3 | ADP-Ribose, NAD, H ₂ O ₂ | Hirn | Redox-Sensor |
| | 3 | 988 (h) 1721 (m) | ? | Nifedipin, D- Erythrosphingosin, Pregnenolonsulfat | Plexus choroideus, Niere, Ovar, Spinalganglien, Retina | Sensorik von Wärme, Schmerz, Insulinfreisetzung |
| | 4 | 1214 (h) 1213 (m) | Monovalente Kationen | [Ca ²⁺] _i | Prostata, Darm, Herz, Niere | Allergie, Immunantwort |
| | 5 | 1165 (h) 1158 (m) | Monovalente Kationen | [Ca ²⁺] _i | Dünndarm, Leber, Lunge, Geschmack-Rezeptor-Zellen | Geschmackssinn |
| | 6 | 2022 (h) 2028 (m) | Divalente Kationen (Mg ²⁺ und Ca ²⁺) | Hemmung durch Mg ²⁺ | Niere, Dünndarm | Mg ²⁺ -Absorption, Hypomagnesiämie |
| | 7 | 1864 (h) 1863 (m) | Divalente Kationen (Mg ²⁺ und Ca ²⁺) | Phosphorylierung Mg ²⁺ -ATP | ubiquitär | Zellentwicklung |
| | 8 | 1104 (h) 1104 (m) | 3,3 | Menthol, Icilin, Kälte (23°-28°C) | Hinterwurzelganglien, Prostata | Sensorik von Kälte (23°-28°) |
| TRPA | 1 | 1119 (h) 1125 (m) | 0,8 | Kälte, Icilin, Cannabinoide, Senföl | Hinterwurzelganglien Haarzellen | Sensorik von Kälte < 17°C, Hören |
| TRPP | 2 | 968 (h) 966 (m) | Nicht selektiv | Interaktion mit Polycystin 1, | Niere | Polyzystische Nierenerkrankung |
| | 3 | 805 (h) 760 (m) | 4,3 | Ca ²⁺ ? | Niere, Herz | ? |
| | 5 | 609 (h) 621 (m) | ? | ? | Hoden, Herz | ? |
| TRPML | 1 | 580 (h) 580 (m) | Nicht selektiv | pH, Ca ²⁺ | Hirn, Herz, Skelettmuskel | Mucopolidose Typ IV |
| | 2 | 566 (h) 566 (m) | ? | ? | ? | ? |
| | 3 | 553 (h) 553 (m) | ? | ? | Haarzellen in der Cochlea | Hören |

2.3 Struktur von TRP-Kanälen

Die Identifizierung der verschiedenen TRP-cDNA-Sequenzen ermöglichte eine erste Vorhersage der Sekundärstruktur der codierten Proteine. Nach dem gegenwärtigen Modell weisen alle TRP-Proteine cytosolische Amino- und Carboxy-Termini (N- und C-Termini) auf, sowie sechs Transmembrandomänen, die die Plasmamembran durchqueren (Abb. 2).

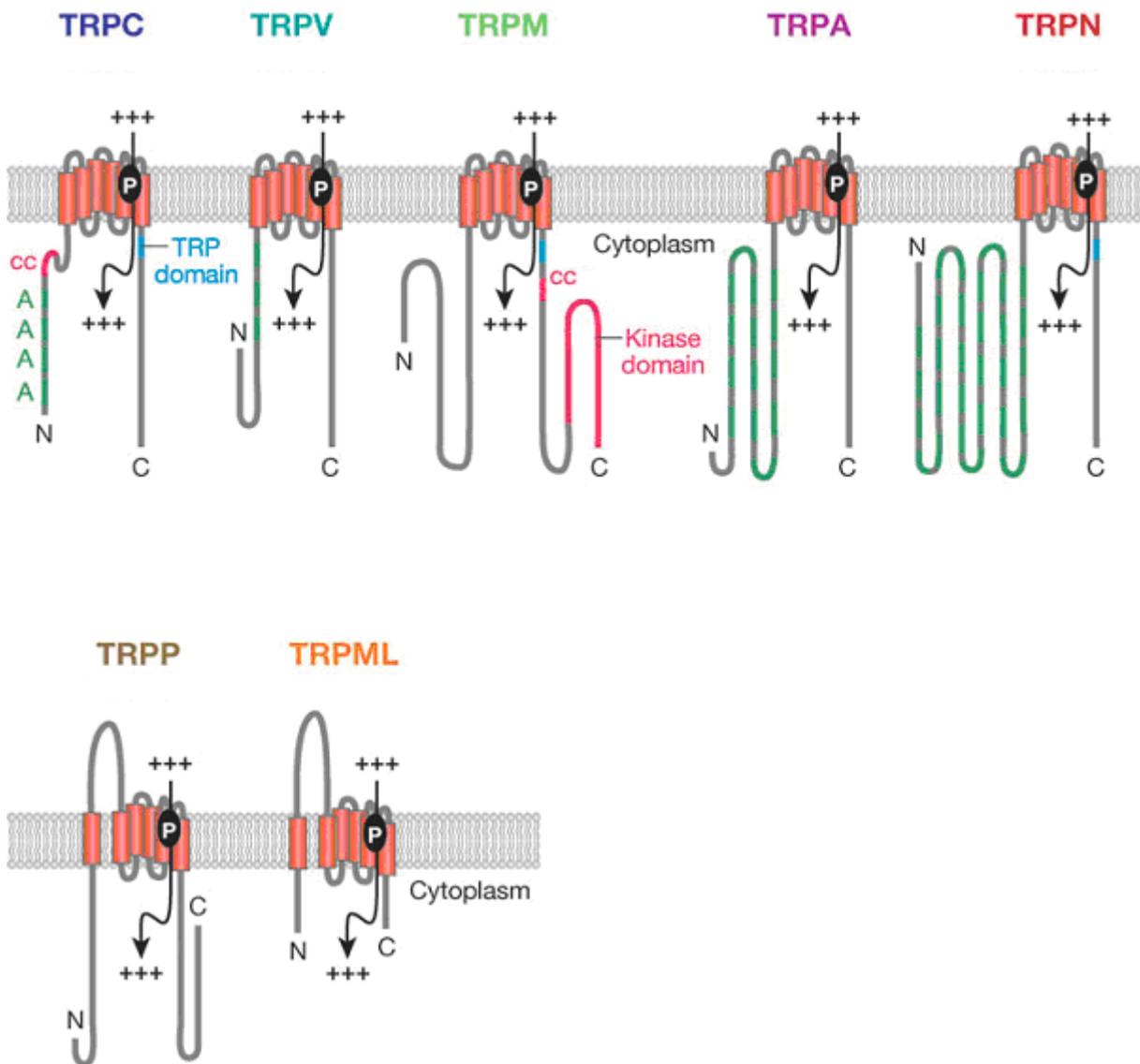


Abb. 2: Topologie von Proteinen der TRP-Familie

Schematische Darstellung von TRP-Proteinen (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML). TRPN ist bislang in Säugern nicht identifiziert worden. A (Ankyrin-Repeats), CC (Coil-Coiled-Region), P (ionenleitende Pore). Die TRP-Domäne ist blau und die Kinase-Domäne, die für TRPM2/TRPM6/TRPM7 charakteristisch ist, ist rot markiert (modifiziert nach Venkatachalam und Montell, 2007)

Vermutlich wird die ionenleitende Pore des Kanals von vier TRP-Proteinuntereinheiten gebildet (Abb. 3), wobei sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere beschrieben wurden (Hoenderop et al., 2003).

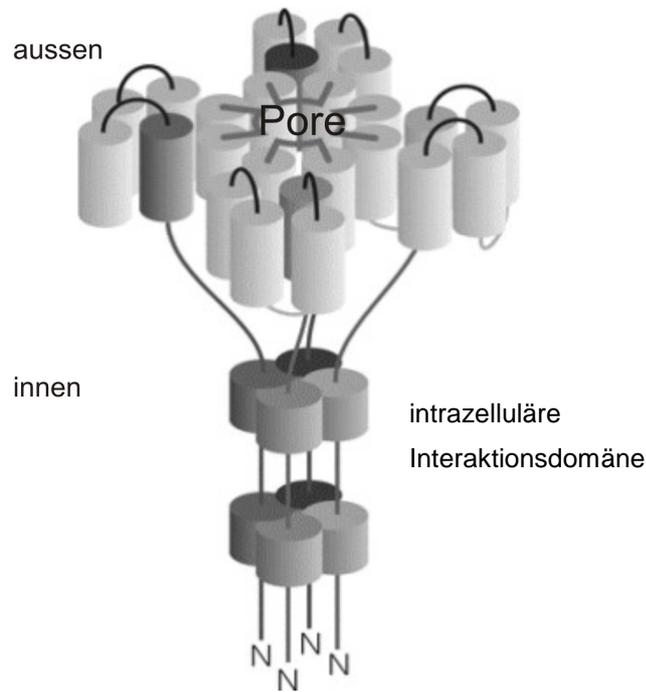


Abb. 3: Schematische Darstellung eines tetrameren TRP-Kanalkomplexes (modifiziert nach Eler et al., 2004)

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von TRPC1 (Barrera et al., 2007), TRPP2 (Kobori et al., 2009) und TRPM8 (Stewart et al., 2010) bestätigten die tetramere Struktur von TRP-Ionenkanälen. Durch Immunpräzipitation und Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers verschiedener TRP-Proteine konnte gezeigt werden, dass jedoch nur nah verwandte TRP-Proteine einer Subfamilie (Abb. 1) zu Interaktionen in der Lage sind (Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002). So können zum Beispiel nur TRPC1/TRPC4/TRPC5 oder TRPC3/TRPC6/TRPC7 gemeinsam ionenleitende Poren bilden. Durch Heteromultimerization können die biophysikalischen Eigenschaften und somit die biologischen Funktionen von Kanälen moduliert werden (Xu et al., 1997; Venkatachalam und Montell, 2007). So kann zum Beispiel die Zusammenlagerung unterschiedlicher TRPV5/TRPV6-Untereinheiten eine unterschiedliche Selektivität der Kanalkomplexe für mono- und divalente Kationen zur Folge haben (Hoenderop et al., 2003). Heteromere TRPC-Kanalkomplexe, aus TRPC1, TRPC4 und TRPC5 Untereinheiten bestehend, konnten in embryonalen Gehirnzellen der Ratte nachgewiesen werden (Strubing et al., 2003). Ebenso wurde eine Zusammenlagerung von TRPC1 mit TRPC3/6/7-Untereinheiten festgestellt. Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne einer jeden TRP-Kanaluntereinheit befindet sich eine hydrophobe Region, welche vermutlich die ionenleitende Pore des Kanals bildet. Durch gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren (AS) von TRPV5 und TRPV6 in dieser Domäne sowie durch Analyse unterschiedlicher TRPM3-Spleißvarianten, die sich nur in diesem Bereich unterscheiden, konnten solche Sequenzabschnitte identifiziert werden, welche die Selektivität der Kanäle wesentlich

beeinflussen und daher die ionenleitende Pore des Kanals bilden (Voets et al., 2004, Oberwinkler et al., 2005). Charakteristisches Merkmal von TRPC-, TRPN- und TRPM-Proteinen ist die TRP-Domäne. Aus 23-25 Aminosäuren bestehend, schließt sie sich der sechsten Transmembrandomäne an (Montell, 2005). Die genaue Funktion dieser Region ist noch nicht bekannt. Vermutlich spielt sie eine Rolle als Interaktionsstelle mit dem Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat (PIP₂) (Rohacs et al., 2005).

Die Kanalproteine TRPM2, TRPM6 und TRPM7 sind durch eine carboxyterminale Domäne mit enzymatischer Aktivität gekennzeichnet, die anderen Mitglieder der TRPM-Subfamilie fehlt. Diese Proteine werden daher auch „Chanzymes“ bezeichnet (Cahalan, 2001). Die Enzymdomäne von TRPM2 weist eine Nukleosid-Diphosphat-Pyrophosphatase-Aktivität auf (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001), während der Carboxyterminus von TRPM6 und TRPM7 durch eine α -Kinase-Aktivität (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001) gekennzeichnet ist.

Am N-Terminus der TRPC-, TRPV-, TRPN- und TRPA1-Kanälen sind mehrere „Ankyrin-Repeats“ beschrieben worden. Jeder der einzelnen Ankyrin-Repeats besteht aus einer 33 Aminosäure langen Sequenz und enthält zwei antiparallel angeordnete α -Helices (Mohler et al., 2002). Man vermutet, dass die Ankyrin-Domänen bei verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (Mohler et al., 2002). Für TRPV6-Proteine konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen wesentlich für die homomere Assemblierung von TRPV6-Kanaluntereinheiten sind (Erler et al., 2004). Bei den TRPM-Kanälen fehlen diese Ankyrin-ähnlichen Sequenzwiederholungen. Einige TRPM-Kanäle wie TRPM2 und TRPM8 weisen hingegen ebenso wie TRPC-Kanäle eine charakteristische Region, die Coiled-Coil-Domäne auf, die ebenfalls mit der Assemblierung der Kanaluntereinheiten in Verbindung gebracht wird (Abb. 3) (Erler et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006).

Alpha-Keratin war das erste Protein in welchem die Coiled-Coil-Domäne experimentell identifiziert wurde (Burkhard et al., 2001; Arndt et al., 2002). Diese Domäne kann jedoch auch mit Hilfe eines spezifischen Algorithmus „COILS“ prognostiziert werden (Lupas et al., 1991). Ein Coiled-Coil ist eine stabile, lineare Domäne, die aus mindestens zwei Einzelhelices besteht. In der Regel sind dies α -Helices. Diese Einzelhelices sind entweder parallel oder antiparallel angeordnet und umeinander zu einer Mehrfachhelix (Supercoil) gewunden (Abb. 4). Charakteristisch für Coiled-Coils ist das sogenannte Heptadenmuster, bei dem hydrophobe Aminosäurereste an Position a und d eines sieben Aminosäuren umfassenden Abschnitts stehen (Watson und Crick, 1953; Burkhard et al., 2001; Mason und Arndt, 2004) (Abb. 4a). Die hydrophobe Wechselwirkung dieser Aminosäuren stabilisiert die Coiled-Coil-Struktur (Burkhard et al., 2001; Arndt et al., 2002). Die restlichen, polaren oder geladenen Aminosäurereste können an intra- oder interhelikalen Interaktionen beteiligt sein und so zur Spezifität und Stabilität des Supercoils beitragen. Die Interaktionen, die von den

Aminosäurereste e und g („electrostatic edge positions“) gebildet werden, sind für die Spezifität der Coiled-Coil-Region von besonderer Bedeutung.

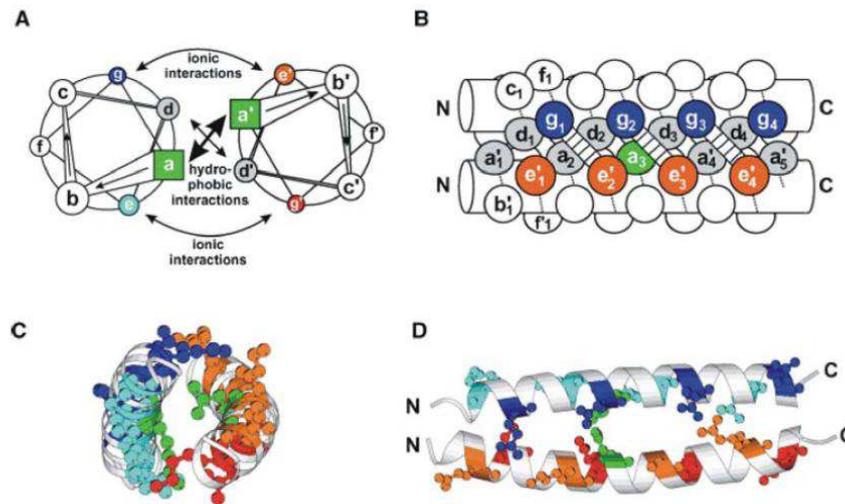


Abb. 4: Schematische Darstellung eines parallelen, dimeren Coiled-Coil (nach Mason und Arndt, 2004)

- A** Querschnitt durch ein Coiled-Coil-Dimer. Die hydrophoben Aminosäurereste der Positionen a und g bilden eine Interaktionsfläche, die hydrophilen Reste e und g können ebenfalls interagieren.
- B** Seitenansicht eines Coiled-Coil-Dimers. Die Zylinder stellen das Helixgerüst dar, die Kreise die Seitenketten der Aminosäurereste.
- C,D** Bändermodell des Coiled-Coil-Dimers im Querschnitt (C) und in der Seitenansicht (D)

Alle sieben Aminosäurereste a bis g sollen gemeinsam für die Stabilität und Aufrechterhaltung des Coiled-Coil-Motivs verantwortlich sein (Mason et al., 2007). Gleiche oder unterschiedliche Einzelhelices können sich zu homo- oder heteromeren Strukturen zusammenlagern, die di-, tri-, tetra- oder auch pentamere Coiled-Coils bilden und auf diese Weise auch unterschiedliche Proteine verknüpfen können.

2.4 TRPM3

Wie alle TRP-Kanäle besitzt TRPM3 vermutlich sechs Transmembrandomänen mit einem intrazellulären N- und C-Terminus und eine TRP-Domäne (Abb. 2). Ankyrin-Repeats fehlen. Eine etwa 700 Aminosäuren lange TRPM-Homologieregion – typisch für TRPM-Proteine – ist im N-Terminus von TRPM3 lokalisiert (Clapham et al., 2003; Fleig und Penner, 2004). Weiterhin enthält TRPM3 im N-Terminus sechs Bindungsstellen für das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin (Frühwald J., 2010), die vermutlich wesentlich für die Ca^{2+} -abhängige Regulation des Ca^{2+} -permeablen Kanals sind.

Der Kanal wird in Niere, Gehirn, Retina, Hoden, Rückenmark und Eierstock exprimiert (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). TRPM3-Kanäle kommen auch in kontraktile und proliferierenden Zellen der glatten Gefäßmuskulatur vor und spielen

dort eine wichtige Rolle bei der Kanalmodulation (Naylor et al., 2010). Eine starke Expression von TRPM3 in der menschlichen Hypophyse konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Fonfria et al., 2006) und auch andere Gehirnregionen wie Basalganglien und Kleinhirn exprimieren TRPM3-Proteine (Kunert-Keil et al., 2006). In-situ-Hybridisierungs-Experimente und Northern Blots zeigten eine erhöhte Expression im Plexus choroideus des Gehirns (Oberwinkler et al., 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass TRPM3-Proteine an der Regulation der Kationenhomöostase im Liquor beteiligt sind.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde die Expression von TRPM3 in Oligodendrozyten in vivo und in vitro nachgewiesen (Hoffmann et al., 2010) und TRPM3 soll dort als Ca^{2+} -permeabler, Sphingosin-aktivierter Kanal an der Oligodendrozyten-Differenzierung und ZNS-Myelinisierung beteiligt sein. Transkripte von TRPM3 wurden in thorakalen und lumbalen Spinalganglien adulter Mäuse und auch in embryonalen Spinalganglien detektiert (Staaf et al., 2010). Die Expressionsstärke unterscheidet sich dabei je nach Alter der Maus. Vermutet werden nicht nur altersabhängige Unterschiede sondern auch speziesspezifische Unterschiede der Expression von TRPM3.

In der menschlichen Niere werden TRPM3-Transkripte exprimiert, was darauf hindeutet, dass TRPM3-Kanäle eine Rolle bei der renalen Calcium-Homöostase spielen. In der Niere der Maus hingegen sind TRPM3-Transkripte nicht nachweisbar (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Grimm et al., 2005; Oberwinkler et al., 2005).

Das Gen des humanen TRPM3 ist auf Chromosom 9 lokalisiert und enthält das längste Intron auf diesem Chromosom (Humphray et al., 2004). In der Maus liegt das TRPM3 Gen auf Chromosom 19 (Oberwinkler et al., 2005). Verschiedene Spleißvarianten des Kanals aus Mensch und Maus wurden bisher identifiziert (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2005; Oberwinkler et al., 2005; Mannebach, 2008) (Abb. 5).

Sechs unterschiedliche Varianten von TRPM3 (hTRPM3a-f) aus der menschlichen Niere wurden 2003 von Lee und Mitarbeitern (Lee et al., 2003) kloniert. Diese unterschieden sich durch die Gegenwart kleiner Abschnitte einer Länge von 10 bis 25 Aminosäureresten im Aminoterminus des Proteins. Die Variante hTRPM3a soll durch eine Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher sowie durch Stimulation von Muscarinrezeptoren aktiviert werden (Lee et al., 2003). Eine C-terminal verkürzte Variante aus Mensch hTRPM3₁₃₂₅ weist am N-Terminus eine zusätzliche Sequenz von 153 Aminosäuren auf und kann durch hypotone Lösungen (200mOsm/Liter) oder einem Anschwellen der Zelle aktiviert werden (Grimm et al., 2003). Auch eine Aktivierung des hTRPM3₁₃₂₅-Kanals durch Sphingolipide wie D-Erythrosphingosin wurde vorgeschlagen (Grimm et al., 2005).

2005 gelang es fünf neue Spleißvarianten TRPM3 α 1-5 in der Maus zu identifizieren (Oberwinkler et al., 2005). Die Proteine sind zwischen 1699 und 1721 Aminosäuren lang (Abb. 5). Während die in der Maus identifizierten Proteine am C-Terminus mit hTRPM3a-f

korrespondieren, findet man bei Mausvarianten einen um 155 Aminosäuren verlängerten N-Terminus, der hTRPM3₁₃₂₅ ähnelt.

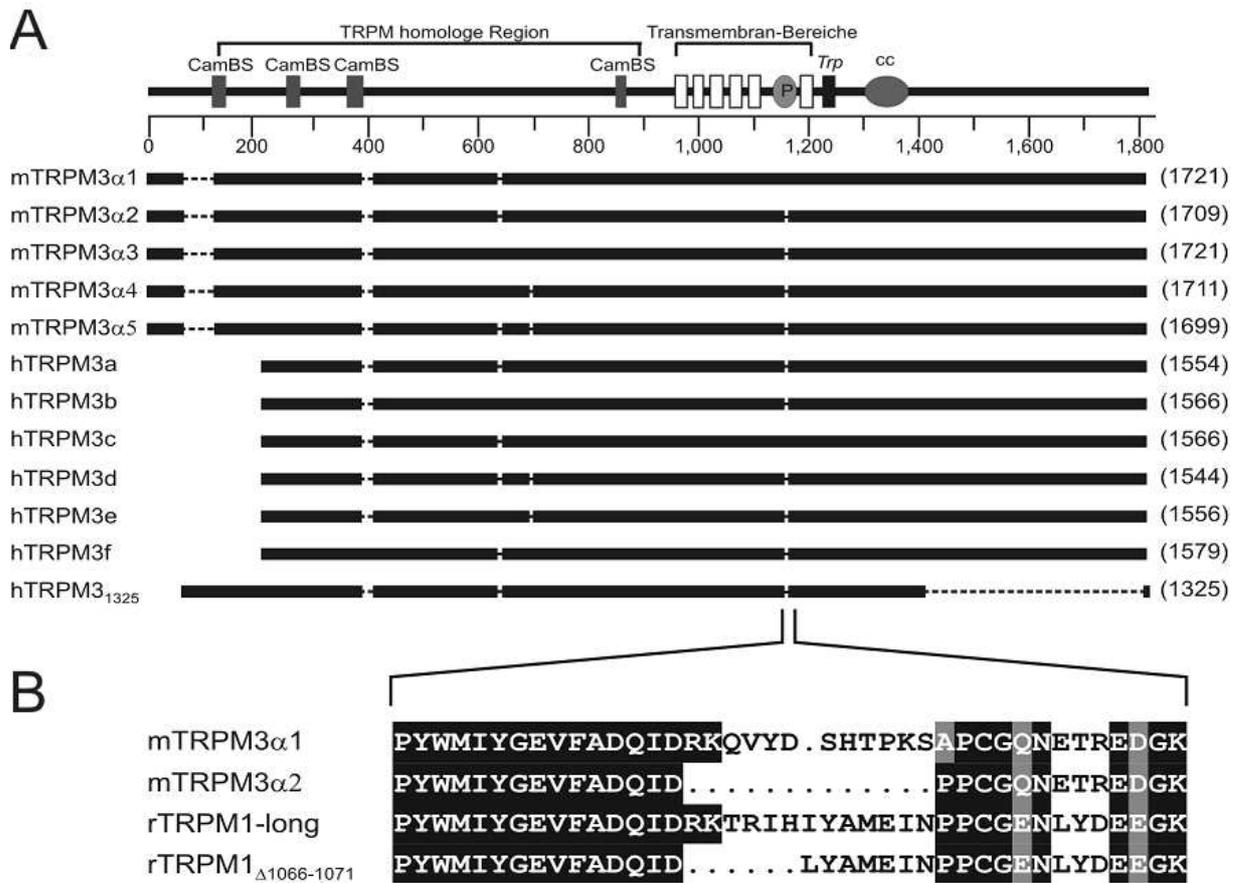


Abb. 5: Schematische Darstellung von TRPM3-Spleißvarianten und deren Porenregion (modifiziert nach Oberwinkler und Phillipp, 2007)

A Schematische Darstellung der TRPM3-Varianten (*schwarze Balken*). Der *obere Balken* zeigt eine lineare Darstellung der generellen Organisation der TRPM3-Domänen. Putative Calmodulin-Bindungsstellen (*CamBS*), die TRPM homologe Region, die Transmembranregion inklusive der Kanalpore (*P*), das TRP-Motif (*TRP*) und eine Coiled-Coil Region (*cc*) sind angezeigt. Die Varianten (*schwarze Balken*) sind relativ zu ihrer Größe skaliert und die Zahl der Aminosäuren steht in Klammern. Interne Protein-Domänen, die durch alternatives Spleißen entfernt wurden, werden als gepunktete Linie gezeigt.

B Darstellung der Porenregionen von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 verglichen mit den korrespondierenden Sequenzen von TRPM1-Varianten (Lis et al., 2005). Identische Aminosäuren sind als *schwarze*, konservierte als *graue* Kästchen dargestellt.

Patch-clamp-Experimente und Fura-2-Messungen zeigten, dass die Varianten TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Oberwinkler et al., 2005). TRPM3 α 2 ist um 12 Aminosäuren kürzer als TRPM3 α 1 und zusätzlich ist in TRPM3 α 2 die Aminosäure Prolin durch Alanin ersetzt. Während TRPM3 α 2 für divalente Kationen permeabel ist, sind die von TRPM3 α 1 gebildeten Kanäle für divalente Kationen nahezu undurchlässig und lassen vorrangig Na⁺ in die Zelle einströmen. Zudem werden TRPM3 α 2-Kanäle durch extrazelluläre Na⁺-Ionen inhibiert, eine Eigenschaft, die bislang nur für Kaliumkanäle beschrieben wurde (Wischmeyer et al., 1995; Numaguchi et al., 2000).

TRPM3 α 2-Kanäle lassen sich durch Pregnenolonsulfat, dem wasserlöslichen Schwefelsäureester des Hormons Pregnenolon, sowie dem Antagonisten spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle Nifedipin aktivieren (Wagner et al., 2008) und fungieren in β -Zellen des Pankreas als ionotrope Steroidrezeptoren, die nach Stimulation die Glukose-induzierte Insulinausschüttung verstärken. Untersuchungen mit Hilfe eines in der Porenregion bindenden Anti-TRPM3-Antikörpers (Naylor et al., 2008) legen zudem nahe, dass Cholesterol ein Inhibitor für TRPM3-Kanälen in Gefäßmuskelzellen ist (Naylor et al., 2010). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRPM3 ein temperaturkontrollierter Kanal ist und in Hinterwurzel- und Trigeminalganglien der Maus als Thermosensor noxischer Hitze fungiert (Vriens et al., 2011).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene TRPC-, TRPV- und TRPM-Proteine enthalten Coiled-Coil-Regionen im Amino- und Carboxyterminus, die für die Bildung von funktionstüchtigen Kanalproteinen wichtig sind (Jenke et al., 2003; Montell, 2005; Erler et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006; Phelps und Gaudet, 2007). Die Gegenwart und Bedeutung von Coiled-Coil-Domänen im TRPM3-Protein ist jedoch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb 1. Coiled-Coil-Domänen auch im TRPM3-Protein zu identifizieren und 2. deren mögliche Bedeutung für die Funktion von TRPM3-Ionenkanälen aufzuklären. Dazu sollte das Vorkommen von Coiled-Coil-Domänen in TRPM3-Proteinen zunächst *in silico* untersucht und dann experimentell nach zielgerichteter Mutagenese verifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Gerätschaften

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt, D), VWR (Darmstadt, D), Boehringer Ingelheim (Ingelheim, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (Deisenhofen, D) bezogen.

Hitzestabile Lösungen, Medien und Plastikgefäße wurden 20 min bei 1,2 bar in feuchter Hitze bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Reagenzien wurden mit Hilfe eines 22 µm Filters steril filtriert.

3.2 Plasmidvektor

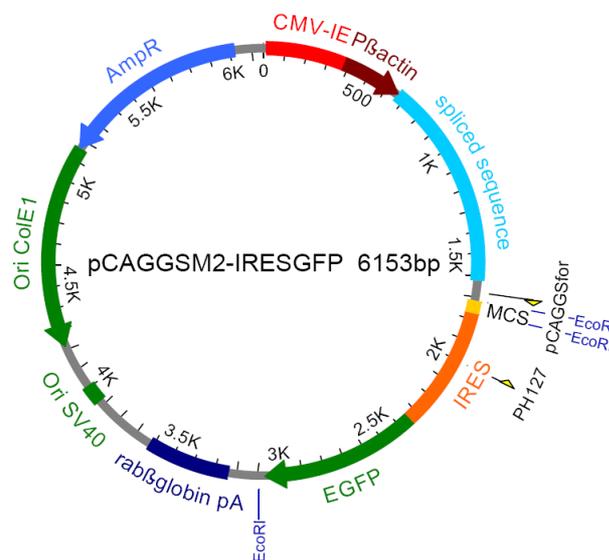


Abb. 6: Zirkuläre Karte des Vektors pCAGGSM2/IRES-GFP

Die Länge des Plasmids ist angegeben. Dargestellt sind: Replikationsursprünge aus dem ColE1-Plasmid (**Ori ColE1**) und dem Affenvirus SV40 (**SV40 ori**); multiple Klonierungsstelle (**MCS**); Bindungsstellen der Primer pCAGGSfor und PH127; Enhancersequenz aus dem Cytomegalievirus (**CMV-IE**); Promotersequenz aus dem β -Aktin-Gen des Huhns (**P β -actin**); eine nach **P β -actin**-abhängiger Expression gespleißte Sequenz (**spliced sequence**); Polyadenylierungssignal aus dem β -Globin-Gen des Kaninchens (**rab β -globin pA**); interne Ribosomenbindestelle (**IRES**); codierende Sequenzen für β -Lactamase (**AmpR**) und grün fluoreszierendes Protein (**EGFP**). Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuclease **EcoRI**, welche die multiple Klonierungsstelle flankieren, sind angegeben.

Der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor pCAGGSM2/IRES-GFP (Warnat et al., 1999) besteht aus 6153 Basenpaaren und basiert auf dem Plasmid pCAGGS (Niwa et al., 1991). Ein aus dem Huhn stammender β -Aktinpromotor reguliert die Expression der nachgeschalteten Ziel-cDNA. In pCAGGSM2/IRES-GFP ist strangabwärts eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) lokalisiert, die aus dem Encephalomyokarditis-Virus stammt. Diese zweite Ribosomenbindungsstelle ermöglicht die Translation einer strangabwärts gelegenen cDNA, die das grün fluoreszierende Reporterprotein GFP kodiert. Durch gleichzeitige Expression der Ziel-cDNA und der GFP-cDNA von demselben Transkript wird

die Expression des Zielproteins mit Hilfe der grünen Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins optisch sichtbar gemacht.

3.3 Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) in lyophilisierter Form geliefert (Tab. 2 und 3). Das Lyophilisat wurde in einer Konzentration von 100 pmol/μl in sterilem H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 2: Für Sequenzierungen verwendete Oligodesoxyribonukleotide

| Name | Nukleotidsequenz 5'>3' aus cDNA TRPM3 Maus | T _m (°C) |
|-------|---|---------------------|
| PH395 | CCTGGCTGTTGAAGCTGCTC | 64 |
| PH399 | CTGTGGACAGAATGAGACCCG | 66 |
| PH400 | GATCGCTTCAATTCGTCCAACG | 66 |
| PH402 | GAGCCACCTTCCCTGGAGGT | 64 |
| PH403 | CACATGCTGGAAGATCATGGTC | 66 |
| PH550 | GTTGTGCTTGCTTTCAAAGCTATGA | 70 |

Tab. 3: Oligodesoxyribonukleotide, die für die Polymerasekettenreaktion verwendet wurden

| Name | Nukleotidsequenz 5'>3' | T _m (°C) |
|-------|--|---------------------|
| PH399 | CTGTGGACAGAATGAGACCCG | 66 |
| PH710 | <u>T</u> CAATCGTTGGACGAATTGAAGCG | 62 |
| PH711 | <u>T</u> CACATGGACATGTTCTCCACCC | 62 |
| PH712 | <u>T</u> CATGAAGCCTTCATGGAATGTTCTC | 66 |
| PH713 | <u>T</u> CAGATGAGGTCCTCTAGCTGTG | 62 |
| PH714 | <u>T</u> CACCGCTCCAGACCAGTCAGG | 64 |
| PH715 | GAGAACATGTCCATGAGGCC <u>CG</u> GAGGAAGTTAATGAGAGAG | 84 |
| PH716 | CTCTCTCATTA <u>ACTTCCTCCG</u> GCCTCATGGACATGTTCTC | 84 |

Nukleotidsequenz aus cDNA TRPM3 Maus

Zu TRPM3 nicht homologe Sequenzabschnitte sind unterstrichen.

Die mittlere Schmelztemperatur der Oligodesoxynukleotide PH399, sowie PH710-714 wurde nach folgender Formel näherungsweise berechnet (ohne Berechnung der 5'terminal fehlgepaarten Basen):

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

Die Schmelztemperatur zur zielgerichteten Punktmutagenese verwendeten Oligonukleotide PH 715 und PH 716 errechnete sich wie folgt:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarung}$$

(N= Länge der Oligodesoxyribonukleotide in Basen)

3.4 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet (Tab. 4)

Tab. 4: Verwendete Antikörper

| Name | Verdünnung für Western Blot | Erkennung von | Herkunft/Hersteller |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------|---|
| AK 695 | 1:200 | TRPM3 QEKEPEEPEKPTKEK | Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum |
| Anti Myc-AK | 1:1000 | c-Myc | Maushybridom Klon 9E10, Roche |
| Anti-Calnexin | 1:2000 | Calnexin | Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum |
| mAB 9F6-G8 affi | 1:200 | TRPM3 ERAESNKIRSRTS | Affinitätsgereinigtes Rattenhybridom |

3.5 Kultivierung und Transformation von *E. coli*

3.5.1 Bakterienstämme und Medien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *E.coli*-Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) für die Vermehrung und Klonierung von Plasmid-DNA verwendet. Er ist von dem *E.coli*-Stamm K12 abgeleitet.

XL1-Blue Genotyp supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46thi, relA1,
lac⁻, F⁻ [proAB⁺lac^qZΔM15 Tn10 (tet^r)]

Die Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium oder auf Festmedium kultiviert. Zur Herstellung von Festmedium wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren bei 121°C und 1 bar für 20 Minuten und dem Abkühlen auf 50°C wurden zur Herstellung von Ampicillin-Selektionsmedien (LB-amp) 50 µg/ml Ampicillin (Sigma) dazugegeben. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium in Petrischalen (Ø 10 cm) à ca. 25 ml verteilt.

LB (Luria-Bertani)-Medium, pH 7,5

| Substanz | Endkonzentration |
|------------------|------------------|
| Caseinhydrolysat | 1 % (w/v) |
| NaCl | 1 % (w/v) |
| Hefeextrakt | 0,5 % (w/v) |

3.5.2 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

(Chung et al., 1989)

Zunächst wurden 5ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Ein Milliliter dieser Vorkultur wurde verwendet um 100 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu beimpfen und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD 600nm) von 0,35-0,4 zu inkubieren. Die Zellen wurden in einem sterilen Zentrifugenbecher bei 4 °C und 4500 x g für 15 Minuten sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml kaltem 1xTSS-Puffer resuspendiert, schnellst möglich in eisgekühlten Aliquots zu je 300 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

TSS-Puffer

| | |
|---------|--------------------|
| 10% | PEG 3350 |
| 50mM | Mg ₂ Cl |
| 5% | DMSO |
| ad 50ml | LB-Medium |

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz der Zellen wurde ein Aliquot des Plasmids pUC18 transformiert (Kap. 3.5.3) und in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) auf LB-amp-Agarplatten verteilt.

Am folgenden Tag wurde die Zahl der erhaltenen Bakterienkolonien bestimmt und anhand folgender Formel die Transformationskompetenz berechnet

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

| | |
|----------------|---|
| n | ausgezählte Kolonienzahl |
| F | Verdünnungsfaktor |
| V _G | Gesamtvolumen des Transformationsansatzes |
| V _x | ausplattiertes Volumen |
| m | Menge des eingesetzten Plasmids [µg] |

3.5.3 Transformation kompetenter *E.coli*

Die tiefgefrorenen, kompetenten Zellen (Kap. 3.5.2) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Danach folgten 30 min Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C sowie 2 min Abkühlung auf Eis. Im Anschluss wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Je 200 µl der Kultur wurden auf Agarplatten mittels Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.4 Anlage von *E.coli*-Stammkulturen

Zur Anlage von Stammkulturen wurden 1,5 ml Übernachtskultur 10 min in der Tischzentrifuge bei 3500 rpm sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Bakterienlagermedium resuspendiert und bei -20°C gelagert.

| | | |
|-----------------------------|--------|--|
| Bakterienlagermedium | 0,7 % | K_2HPO_4 |
| | 0,3 % | KH_2PO_4 |
| | 0,05 % | $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ |
| | 0,01 % | MgSO_4 |
| | 50 % | Glycerin |

autoklaviert; Lagerung bei 4°C

3.6 Präparation, Modifikation und Analyse von DNA

3.6.1 Analytische Schnellpräparation von Plasmid-DNA

(Minipräparation, Holmes und Quigley, 1981)

5 ml LB-amp-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Übernachtskultur sedimentiert (3500 rpm, Biofuge pico; Heraeus), in 200 μl STET-Puffer/Lysozym (100 ng/ml) resuspendiert und 30 sec auf 100°C erhitzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Tischzentrifuge s.o.) wurde das Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 200 μl Isopropanol präzipitiert und in der Tischzentrifuge (30 min, 13000rpm) sedimentiert. Nach Waschen mit 500 μl 70% (v/v) Ethanol (10 min, 13000 rpm) und anschließendem Trocknen (Raumtemperatur, 30 min) wurde die DNA in 50 μl RNaseA-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgelöst. Für Restriktionsanalysen (Kap. 3.6.8) wurden 5 μl der DNA-Lösung verwendet.

| | | | |
|---------------------|------|---------|--------------------------|
| STETL-Puffer | 8 | % (w/v) | Saccharose |
| | 5 | % (w/v) | Triton X-100 |
| | 50 | mM | TRIS-HCl, pH8,0 |
| | 50 | mM | EDTA pH8,0 |
| | 0,01 | %(w/v) | Lysozym (frisch zugeben) |

| | | | |
|----------------------------|----|---------|-----------------|
| RNase A-Stocklösung | 1 | % (w/v) | RNase A |
| | 10 | mM | TRIS-HCl, pH7,5 |
| | 15 | mM | NaCl |

15min bei 100°C inkubieren und abkühlen lassen

3.6.2 Plasmidpräparation durch Anionenaustausch-Chromatografie

(Maxipräparation)

Die Maxipräparation dient der Gewinnung von Plasmid-DNA mit Ausbeuten größer als 100 µg. Hierfür wurde ein Präparationssystem (Kit) der Firma Quiagen (Hilden) verwendet. Die Methode beruht auf alkalischer Lyse der Zellen (Holmes und Quigley, 1981) und nachfolgender Reinigung durch Anionenaustausch-Chromatographie. Im ersten Schritt wurden 400 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur eines rekombinanten E.coli-Klons beimpft und 12-16 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 6000 x g sedimentiert und in 10 ml 4°C kaltem P1-Puffer resuspendiert. Dann folgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 10 ml alkalischer P2-Lösung. Nach 5 min wurde die Lösung mit 10 ml 3M Kaliumacetat (P3) neutralisiert. Bevor denaturierte Proteine durch 30 min Zentrifugation bei 15000 x g (4°C) sedimentiert wurden, erfolgte eine 20 min Inkubation auf Eis. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen werden, bevor die Elution der an das Anionenaustauscherharz gebundenen DNA mit 15 ml QF-Puffer erfolgte. Die DNA im Eluat wurde nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und sedimentiert (30 min bei 15000 x g, 4°C). Das Sediment wurde in 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem H₂O gelöst.

Die Ausbeute und Reinheit der DNA wurden mittels Photometrie (Kap. 3.6.3) und Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.6.5) analysiert.

| | | | | | | | |
|------------|------|-------|----------------------|-----------|-----|----|--------------|
| P1 | 50 | mM | Tris-HCl | P2 | 200 | mM | NaOH |
| | 10 | mM | EDTA | | 1 | % | SDS |
| | 100 | µg/ml | RNAse A | | | | |
| P3 | 3,0 | M | Kaliumacetat, pH 5,5 | | | | |
| QBT | 750 | mM | NaCl | QC | 1 | mM | NaCl |
| | 50 | mM | MOPS, pH 7,0 | | 50 | mM | MOPS, pH 7,0 |
| | 15 | % | Isopropanol | | 15 | % | Isopropanol |
| | 0,15 | % | Triton X-100 | | | | |
| QF | 1,25 | M | NaCl | | | | |
| | 50 | m | Tris-Cl, pH 8,5 | | | | |
| | 15 | % | Isopropanol | | | | |

Plasmide zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurden mit Hilfe des Endofree-Maxi-Plasmid-Kits der Firma Qiagen nach dem oben beschriebenen Prinzip gewonnen. Dabei wurden Endotoxin-freien Lösungen und Puffern verwendet und alle verwendeten Utensilien wurden soweit möglich- drei Stunden bei 200°C gebacken.

3.6.3 Mengen- und Reinheitsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe eines Photometers die Absorption nach Anregung mit Licht verschiedener Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm gemessen. Ein Maß für die Reinheit des Präparats ist der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm, der zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

DNA (>100 bp) $\text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 50 = \mu\text{g/ml}$

RNA $\text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 40 = \mu\text{g/ml}$

Es wurde ein GeneQuant II-Photometer (Amersham Pharmacia) verwendet.

3.6.4 Präzipitation von DNA

Wässrige DNA-Lösungen wurden auf eine Salzkonzentration von 250 mM NaCl oder 300 mM Natriumacetat eingestellt und nach Zugabe von zweieinhalb Volumina 100% Ethanol 30 min bei 15000 x g sedimentiert. Das Präzipitat wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem H₂O aufgenommen. RNA wurde durch Zugabe von 300 mM Kaliumacetat (pH 4,5) oder 1 M Ammoniumacetat sowie zweieinhalb Volumina 100% Ethanol präzipitiert und mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen.

| | | | |
|------------------|------|----------|--------|
| TE-Puffer | 10mM | Tris/HCl | pH 8,0 |
| | 1mM | EDTA | pH 7,5 |

3.6.5 Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Agarose-Gelelektrophorese wurden Flachbettgele der Größe 20 cm x16 cm, 10cm x11cm, 11 cm x 6 cm bzw. 6 cm x 5,5cm (Minigele) benutzt. DNA-Fragmente mit Kettenlängen von 0,5-8 kb wurden in 0,8% (w/v) Agarosegelen, DNA-Fragmente mit Kettenlängen von 0,1-1 kb in 2% (w/v) Gelen getrennt. Für präparative Gele wurde SeaKem GTG-Agarose (Biozym Scientific GmbH; Oldendorf) für analytische Gele NEO-Agarose (Roth; Karlsruhe) verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer gelöst, auf 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in Gelträger gegossen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA wurde mit 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V - 150 V. Zur Bestimmung der

Größe der Nukleinsäure-Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard (1 kb-Ladder; 0,075-12.2 kb; Invitrogen) in eine Tasche des Gels appliziert. Die Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

| | | | |
|---------------------------|------|---------|----------------|
| 10 x TBE | 108 | g/l | TRIS-HCl |
| | 55 | g/l | Borsäure |
| | 9,3 | g/l | EDTA pH 8,0 |
| 6 x Auftragspuffer | 15 | % (w/v) | Ficoll |
| | 0,25 | % (w/v) | Bromphenolblau |
| | 0,25 | % (w/v) | Xylencyanol |

3.6.6 Elektroelution

Dialyseschläuche (23 mm Breite; Sigma-Aldrich; Taufkirchen) für die Elektroelution wurden in 6-8 cm lange Stücke geschnitten, in 10 mM EDTA autoklaviert, mit sterilem H₂O gespült und bei 4°C in 100% Ethanol gelagert.

Die gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente (Kap. 3.6.5) wurden unter einer UV-Beleuchtung zügig aus dem Gel ausgeschnitten und in einen in sterilem 1xTBE- Puffer rehydratisierten Dialyseschlauch überführt. Nach Zugabe von 350 µl sterilem 1xTBE- Puffer wurde der Schlauch ohne Luftpfeinschlüsse mit Klammern verschlossen und in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Im Kühlraum wurde die DNA bei 4°C-6°C und 135 mA innerhalb von 45 min aus dem Gel eluiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und präzipitiert (Kap. 3.6.4).

3.6.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Sanger-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Systems (PE Applied Biosystems; Foster City/CA) und einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurden in einem 12 µl Gesamtvolumen 500 ng DNA, 1 µl sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer (10 pmol/µl) (Tab. 2) sowie 1,5 µl Big Dye-Mix gemischt.

Der Reaktionszyklus sah folgendermaßen aus:

| | | |
|------|--------------|-------------|
| 95°C | 5 min | } 35 Zyklen |
| 95°C | 30 sec | |
| 55°C | 2 min 30 sec | |
| 15°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

Die Reaktionsprodukte wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex™ G50-Matrix (Amersham Pharmacia; Piscataway/New Jersey) gereinigt. Dazu wurde eine 96-Loch Multiscreen HV-Filtrationsplatte (Durapore-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser) mit Sephadex™ G50 befüllt. Zum Äquilibrieren der Matrix wurden 300 µl H₂O (HPLC-grade) pro Loch zugegeben. Nach mindestens 3 h Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde 5 min bei 910 x g in einer Mikrotiterplatten-Zentrifuge zentrifugiert und einmal mit 150 µl H₂O (HPLC-grade) gewaschen. Die Sequenzreaktion wurde auf die äquilibrierte Matrix pipettiert und in PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) mit 8 µl vorgelegtem Formamid 5 min bei 910 x g zentrifugiert. Die so gereinigten, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden im Sequenzierungsautomaten mittels Kapillarelektrophorese getrennt und mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert.

3.6.8 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsendonukleasen und Puffer der Firma New England Biolabs (NEB; Schwalbach) verwendet. DNA wurde in einer Endkonzentration zwischen 50 und 500 ng/µl eingesetzt und unter den geeigneten Pufferbedingungen (Tab. 5) bei 37°C mit 1-10 Einheiten (U) Enzym pro µg DNA hydrolysiert. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde die Vollständigkeit der Spaltung überprüft.

Tab. 5: Verwendete Restriktionsnukleasen

| Restriktionsenzym | Erkennungssequenz | Puffer(NEB) |
|-------------------|-------------------|---------------|
| Bsp EI | T/CCGGA | III |
| Eco RI | G/AATTC | Eco RI-Puffer |
| Eco RV | GAT/ATC | III |
| Nhe I | G/CTAGC | II |

3.6.9 Dephosphorylierung der DNA durch alkalische Phosphatase

Um eine Selbstligation von Vektor-DNA zu vermeiden, wurden 5'-Phosphatreste, die bei der Restriktion entstanden waren, vor der Ligationsreaktion mit Hilfe einer Phosphatase aus Garnelen (Shrimp-Alkaline-Phosphatase, NEB, Frankfurt, D) entfernt. 26µl geschnittene Plasmid-DNA wurde mit 3 µl Puffer und 1 Einheit (U) Phosphatase in einem Endvolumen von 30 µl 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Hitzeinaktivierung 10 Minuten bei 65 °C und die Aufreinigung der DNA durch GTG-Agarose-Gelelektrophorese oder Fällung mit NaCl/Ethanol.

3.6.10 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in dem vom Hersteller (NEB; Schwalbach) gelieferten Puffer durchgeführt. 50-200 ng Vektor-DNA wurde zum Fragment in einem molaren Verhältnis von

1:3 mit 1 Unit Ligase 12-14 Stunden bei 16°C in einem Gesamtvolumen von 15 µl inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation (Kap. 3.5.3) verwendet.

3.6.11 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz *in vitro* (Saiki et al., 1988). Ausgehend von einer DNA-Matrize werden mit Hilfe komplementärer, gegensinnig orientierter Oligodesoxyribonukleotiden (Primer), Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) sowie einer thermostabilen DNA-Polymerase gezielt einzelne Sequenzabschnitte vermehrt.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA bei 94°C. Im Anschluss an die Denaturierung hybridisieren die Primer an die Einzelstränge (Annealing). Nach dem Annealing findet bei 72°C die Kettenverlängerung (Elongation) in Gegenwart freier Desoxyribonukleotid-triphosphate (dNTP) durch die Polymerase statt. Durch die 20- bis 50-fache Wiederholung dieses Zyklus können bestimmte durch die Lage der Primer festgelegten DNA-Bereiche, exponentiell vermehrt werden. Die verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Amplifikation von TRPM3-cDNA-Fragmenten die Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes; Espoo/Finnland) verwendet. Diese Polymerase ist durch eine besonders hohe Lesegenauigkeit (Fidelity) gekennzeichnet, so dass die Gefahr der Einführung PCR-abhängiger Nukleotidaustausche minimiert wird.

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

| | | |
|-------|----|------------------------------------|
| 1 | µl | Matrizen-DNS (Plasmid-DNS 10ng/µl) |
| 0,5 | µl | Phusion-Polymerase, (2U/µl) |
| 1,0 | µl | dNTP (10 mM), |
| 10 | µl | 5 x Phusion-Puffer HF |
| 1,5 | µl | Primer 1 (10 pmol/µl) |
| 1,5 | µl | Primer 2 (10 pmol/µl) |
| ad 50 | µl | H ₂ O |

Die PCR wurde und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

| | | | |
|---------------|------|--------|-------------|
| Denaturierung | 98°C | 30 sec | } 25 Zyklen |
| Denaturierung | 98°C | 10 sec | |
| Annealing | 58°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 30 sec | |
| | 4°C | ∞ | |

3.6.12 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Mutagenese von Aminosäuren in der Coiled-Coil-Domäne von TRPM3 wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene angewandt. Als Matrize diente dabei ein doppelsträngiger Plasmidvektor mit dem zu mutierenden Insert. Zwei zueinander komplementäre Oligonukleotidprimer PH715 und PH716, die die gewünschte Mutation enthielten (Tab. 3), wurden im unten beschriebenen PCR-Zyklus verwendet, um mutierte, ringförmig geschlossene DNA zu gewinnen. Die Matrizen DNA wurde anschließend mit *Dpn* I hydrolysiert. Diese Endonuklease (ATC-3') ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA. Sie hydrolysiert somit die aus *E.coli* präparierte Plasmid DNA nicht jedoch die durch PCR generierten Produkte.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur ortsspezifischen Mutagenese die Phusion-Polymerase eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 25 µl Template, jeweils 1,5 µl Primer (10 pmol/µl), 1 µl dNTPs, 10 µl 5x Phusion-Puffer und 1 µl Phusion-Polymerase zugegeben und folgender Reaktionszyklus durchgeführt:

| | | |
|------|---------------------------|-------------|
| 95°C | 30 sec | } 16 Zyklen |
| 95°C | 30 sec | |
| 55°C | 1 min | |
| 72°C | 1 min/kb der Plasmidlänge | |
| 4°C | ∞ | |

Die *Dpn* I verdauten PCR-Produkte wurden gefällt und in 10 µl sterilem H₂O aufgenommen. Anschließend wurden 3 µl der gefällten DNA mittels Elektroporation in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Die mutierten Klone wurden durch Sequenzierung (Kap. 3.6.7) analysiert.

3.7 Proteinchemische Methoden

3.7.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryontischen Zellen

Zellen aus 4-5 Kulturschälchen (Ø 3 cm, 70-90% konfluent) wurden einmal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 1 x Trypsin/EDTA gelöst, in einem Röhrchen gesammelt und 5 min mit 800-1000 rpm (150-200 g) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100-200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und 30 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von Protease-Inhibitoren und durch permanente Kühlung des Lysates wurde einer Degradation der Proteine entgegen gewirkt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 3.7.2) wurde das Lysat mit einem Volumen 2 x Lämmli-Puffer gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

| | | | |
|---|---------------|---------|--|
| RIPA-Puffer | 150 | mM | CaCl ₂ |
| | 50 | mM | TRIS-HCl pH8,0 |
| | 1 | % (v/v) | Nonidet P40 |
| | 0,5 | % | Natriumdesoxycholsäure |
| | 0,1 | % (w/v) | SDS |
| Proteaseinhibitoren (frisch vor Gebrauch zu RIPA-Puffer zugeben) | Leupeptin | 1 | µg/ml |
| | Phenanthrolin | 1 | mM |
| | Antipain | 1 | µg/ml |
| | PMSF | 0,1 | mM |
| | Benzamidin | 1 | mM |
| | Pepstatin A | 1 | mM |
| | Jodacetamid | 1 | mM |
| | Aprotinin | 0,3 | µM |
| 2x Lämmli-Puffer | 50 | mM | TRIS-HCl, pH 6,8 |
| | 4 | M | Harnstoff |
| | 1 | % (w/v) | SDS |
| | 15 | % (v/v) | Glycerin |
| | 0,005 | % (w/v) | Bromphenolblau |
| | 2 | % (v/v) | β-Mercaptoethanol (frisch vor Gebrauch zugeben) |

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der BCA-Methode (Smith et al., 1985) und dem BCA-Protein Assay Kit (Pierce, Rockford/IL) bestimmt. Dabei wird Cu²⁺ in alkalischem Milieu durch die Oxidation von Peptidgruppen zu Cu⁺ reduziert und bildet mit 2,2-Bis-chinolin-4-carbonsäure (BCA) einen wasserlöslichen Komplex, der ein Absorptionsmaximum von 562 nm aufweist. Von einem RIPA-Proteinlysate wurde eine 1:100, 1:200 und 1:400 Verdünnung in einem Volumen von 50 µl hergestellt. Zu den Verdünnungen wurden 300 µl BCA-Reagenz gegeben und 30 min bei 60°C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden 300 µl in eine 96-Loch-Platte pipettiert und die optische Dichte bei 540 nm bestimmt (Photometer Tecan Sunrise; Tecan Trading AG, Schweiz). Eine parallel hergestellte Eichgerade mit 0, 10, 20, 50, 100, 200 und 500 µg/ml BSA erlaubte die Berechnung der Proteinkonzentration.

3.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Dabei wurden die Proteine in Anwesenheit eines Überschusses

des Detergens Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische SDS bindet stark an hydrophobe Regionen der Proteine und durchbricht nicht-kovalente Bindungen. Die Proteine werden entfaltet und ihre Eigenladung wird weitgehend maskiert, so dass negativ geladene Komplexe entstehen. Diese Komplexe zeigen ein fast proportionales Verhältnis von Ladung und Größe des Proteins. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Polyacrylamid-Gel ist somit nur von deren Molekülmasse abhängig. Die Proteine werden an der Grenze zwischen dem großporigen Sammelgel und dem kleinporigen Trenngel fokussiert; ihre Trennung erfolgt dann im kleinporigen Trenngel.

Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde dem Proteinauftragspuffer kurz vor Verwendung β -Mercaptoethanol zugegeben. Die Proteinlysate wurden in die Taschen eines Vertikalgeles appliziert. Proteine wurden in 1 x SDS-Elektrophoresepuffer bei einer angelegten Spannung von 100-150 V getrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsstandard (Kaleidoscop prestained standards; 6,9-210,2 kD; BioRad, Hercules/CA) in eine benachbarte Probenauftragstasche appliziert.

| | | | |
|--------------------------------------|-------|---------|--|
| Sammelgel (4%) | 125 | mM | TRIS-HCl, pH 6,8 |
| | 0,1 | % (w/v) | SDS |
| | 4 | %(v/v) | Acrylamid (40% Acrylamid: Bisacrylamid 29:1) |
| | 0,075 | % (w/v) | APS |
| | 0,15 | % (v/v) | TEMED |
| Trenngel (6,5 %) | 375 | mM | TRIS-HCl pH8,8 |
| | 0,1 | % (w/v) | SDS |
| | 6,5 | %(v/v) | Acrylamid (40% Acrylamid: Bisacrylamid 29:1) |
| | 0,075 | % (w/v) | APS |
| | 0,15 | %(v/v) | TEMED |
| 10 x SDS-Elektrophoresepuffer | 250 | mM | TRIS-HCl pH8,3 |
| | 1,92 | M | Glycin |
| | 1 | % (w/v) | SDS |

3.7.4 Western-Blot

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, so dass sie im Anschluss mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden konnten. Auf ein in Blottingpuffer getränktes Schwammtuch wurden zwei Lagen Whatman 3M-Papier (Whatman, Fisher Scientific), dann das Proteingel, eine auf Gelgröße zugeschnittene Membran, zwei

Lagen Whatman 3M-Papier und abschließend ein Schwammtuch luftblasenfrei aufgelegt, in eine Kunststoffkassette gelegt und in eine Blottingapparatur eingespannt. Die Blottingapparatur (Biorad; Hercules/CA) wurde mit Puffer gefüllt. Zum Transfer der Proteine auf die Membran wurde ein Strom von 350 mA für 90 min bei 4°C angelegt.

| | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Blotting-Puffer | 200 ml | Methanol |
| | 100 ml | 10 x SDS-Elektrophoresepuffer |
| | ad 1 l H ₂ O | |

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens 1 h in 5% Magermilchpulver/TBS inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% BSA/TBS über Nacht bei 4°C. Nachdem überschüssiger Antikörper durch 3 x 10 min Waschen mit TBS/10%Tween 20 entfernt worden war, folgte 1 h Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in 5% Magermilchpulver/TBS bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten für 10 min mit TBS/10%Tween wurde die Peroxidaseaktivität durch Chemilumineszenz mit Hilfe des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus; (Perkin Elmer, Waltham/Massachusetts) und einer CCD-Kamera (Fuji BAS 3000) sichtbar gemacht.

| | | |
|-----------------|--------|----------------|
| 10 x TBS | 500 mM | TRIS-HCl pH7,5 |
| | 1,5 M | NaCl |

3.7.5 Biotinylierung von Proteinen an der Zelloberfläche

Um Proteine an der Zelloberfläche zu markieren, wurden *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Biotinester verwendet. Diese reagieren effizient mit primären Aminogruppen und bilden stabile Amidbindungen. Die negativ geladene Form Sulfo-NHS-LC-Biotin kann nicht in die Zelle eindringen und reagiert daher selektiv mit an der Zelloberfläche exponierten Proteinen. Markierte Proteine können dann von unmarkierten Proteinen mit Hilfe immobilisierten Avidins getrennt werden. HEK-tsA201-Zellen wurden in einer 75 cm² Kulturflasche bis zu einer Zelldichte von 70-90 % kultiviert und transfiziert (Kap. 3.8.2). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBSB-Puffer gewaschen und für 30 min bei 4°C in 10 ml EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (0,5 mg / ml PBSB); Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBSB / 0,1 % BSA (pH 8,0) gestoppt. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Zellen in 10 ml PBS / 2 mM EDTA aufgenommen und für 5 min bei 1000 g und 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden in 500 µl Lysepuffer gelöst, durch mehrmaliges Aufziehen in 22G und 27G-Kanülen geschert (BD Microlance 3, Becton Dickinson, Heidelberg) und für 15 min bei 4°C geschüttelt (1400 rpm). Zelltrümmer wurden bei max. 10.000 x g und 4°C sedimentiert, der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt (Kap. 3.7.1). Zur Reinigung biotinylierter Proteine wurde zunächst 200 µl Avidin-Agarose (ImmunoPure Immobilized Avidin; Pierce) dreimal mit 1 ml Lysepuffer äquilibriert und anschließend mit 450 µg Proteinextrakt für 2 h auf dem Schüttler (1400 rpm) bei 4°C inkubiert. Dann wurden Avidin-Agarose-gebundene Proteine 2 min bei 2000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert, viermal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, in 60 µl 2 x Proteinauftragspuffer aufgenommen und im Westernblot analysiert (Kap. 3.7.4).

| | | | | |
|------------|---------------|-----|----|---|
| PBS | pH 7,4 | 137 | mM | NaCl |
| | | 2,7 | mM | KCl |
| | | 1,5 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| | | 8 | mM | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O |

| | | | | |
|-------------|---------------|-----|----|---|
| PBSB | pH 8,0 | 137 | mM | NaCl |
| | | 2,7 | mM | KCl |
| | | 1,5 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| | | 8 | mM | NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O |
| | | 1 | mM | MgCl ₂ |
| | | 0,5 | mM | CaCl ₂ |

| | | | |
|-------------------|-----|--------|----------------------------------|
| Lysepuffer | PBS | pH 7,4 | |
| | 1 | % | Triton |
| | 1 | mM | EDTA |
| | | | Proteaseinhibitoren (Kap. 3.7.1) |

| | | | |
|--------------------|------|--------|--------|
| Waschpuffer | PBS | pH 7,4 | |
| | 1 | % | Triton |
| | 1 | mM | EDTA |
| | 0,25 | M | NaCl |

3.8 Kultivierung und Transfektion eukaryotischer Zellen

3.8.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (Tab. 6) wurden bei 5% CO₂, 37°C und einer gesättigten Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert und 2-3-mal pro Woche passagiert.

Die Zellen wurden entweder in 75 cm² Kulturflaschen mit 10-15 ml Medium oder in Kulturschälchen (Ø 3 cm) mit 2 ml Medium kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden sie mit PBS

gewaschen, mit 30-40 μl 1 x Trypsin/EDTA pro cm^2 von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst und in einer geeigneten Verdünnung in ein frisches Kulturgefäß überführt.

Tab. 6: Verwendete Zelllinien

| Zell-Linie mit Referenz | Herkunft | Kulturmedium |
|--|--|--|
| HEK293 ATCC CRL 1573 | Menschliche Fibroblasten aus der embryonalen Niere, transformiert mit DNA des menschlichen Adenovirus Typ 5, adhären. | Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen) und 10% fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen) |
| HEK-tsA 201 von Dr. Christoph Fahlke zur Verfügung gestellt | Menschliche Fibroblasten-Zelllinie aus der embryonalen Niere (s.o) stabil transfiziert mit dem large T-Antigen des SV 40-Virus | Dulbecco`s Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco), (FCS, Invitrogen) und 1% Glumax |
| COS-7 ATCC CRL 1651 | Nierenzellen der grünen Meerkatze | (D-MEM, Gibco), (FCS, Invitrogen) |

| | | | |
|-------------|------|-----|---------------------------|
| PBS: | 0,2 | g/l | KCl |
| | 0,2 | g/l | KH_2PO_4 |
| | 8,0 | g/l | NaCl |
| | 1,15 | g/l | Na_2HPO_4 |

1x Trypsin-EDTA : 5 ml 10x Trypsin-EDTA (# T4424, Sigma)
(0,05% w/v) (5,0 g/l Trypsin; 2,0 g/l EDTA; 8,5 g/l NaCl)
 ad 50 ml mit PBS
 Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.8.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektionen wurden in Kulturschälchen (\varnothing 3 cm) durchgeführt. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion in einer Zelldichte von 60-70% ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Pro Schale wurden 100 μl Optimem-Medium (Invitrogen) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 6 μl FuGene-6 Reagenz (Roche; Mannheim) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation wurden 2 μg DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) addiert, weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf die Zellen tropfenweise appliziert.

3.9 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe des ratiometrischen Calciumindikatorfarbstoffes Fura-2AM

Zur funktionellen Analyse von TRPM3-Ionenkanälen wurde der ratiometrische Calciumindikatorfarbstoff Fura-2AM (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser Acetoxymethyl (AM)-Ester ist in der Lage Zellmembranen zu passieren und nach Abspaltung der Acetoxymethylgruppe durch zelleigene Esterasen wird Fura-2 in der Zelle zurückgehalten. Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator (Grynkiewicz et al., 1985). Licht der Wellenlänge 340 nm regt die Ca^{2+} -gebundene Form an, während die Anregungswellenlänge der Ca^{2+} -freien Form bei 380 nm liegt. In beiden Fällen wird Licht der Wellenlänge 510 nm emittiert. Durch Bildung des Quotienten der Fluoreszenzemission nach Exzitation mit Licht der Wellenlängen 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}) lässt sich die Ca^{2+} -Konzentration, unabhängig von Zellgröße und Fura-2-Konzentration, bestimmen.

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (\varnothing 2,4 cm) kultiviert und einmal mit 1,5 ml Puffer Ringerlösung 2Ca oder Ringerlösung 1Ca (vgl. Tab. 7) gewaschen und dann 30-60 min mit 5 μM Fura-2AM in einem Volumen von 1,5 ml Puffer Ringerlösung 2Ca oder Ringerlösung 1Ca im Dunkeln bei Raumtemperatur geladen. Im Anschluss wurden die Zellen erneut einmal mit Puffer Ringerlösung 2Ca oder Ringerlösung 1Ca gewaschen, bevor das Deckgläschen in eine Perfusionskammer eingespannt und die Messung begonnen wurde.

Während der Messung wurden die Zellen mit Puffer in einer Flussrate von ~ 1 ml/min umspült. Pregnenolonsulfat (#P162; Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 30 μM in Puffer Ringerlösung 2Ca / Ringerlösung 1Ca durch Ultraschallbehandlung gelöst.

Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines 20 x Fluor Objektivs (Carl Zeiss AG, Göttingen) durchgeführt, und mit einer CCD-Kamera (TILLVision-Systems, Tillphotonics; Grafelding) verfolgt.

Alle grafischen Darstellungen und Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northhampton/USA). Zur Errechnung der Konfidenzintervalle wurde ein Anova one way Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$). Die Fehlerbalken in allen Darstellungen zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Zum Vergleich der Ca^{2+} -Antworten verschiedener Gruppen wurden die innerhalb jeder Gruppe gemittelten Maximalantworten (F_{340}/F_{380}) nach Stimulation ermittelt (Abb. 7): Diese wurde auf eine Kontrollgruppe (100%) normiert und in Prozent angegeben.

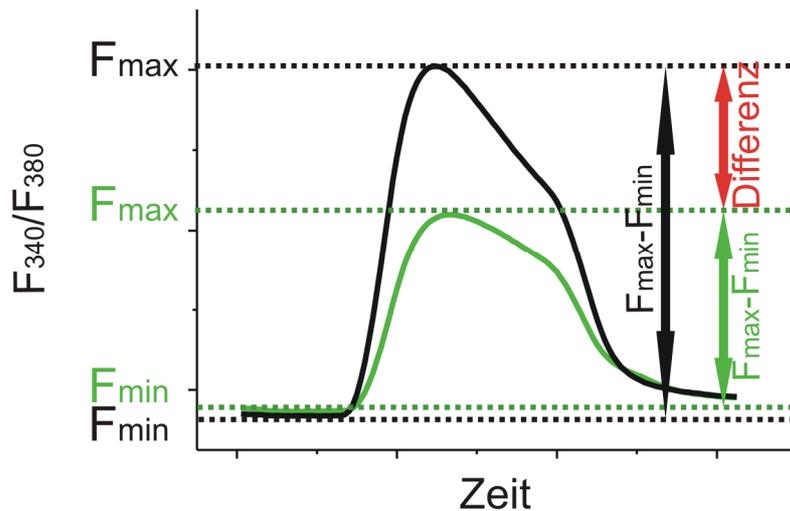


Abb. 7: Berechnung der Maximalamplituden in Fura-2-Messungen

Gemittelte Ca^{2+} -Antworten in zwei Gruppen (grün und schwarz). Der grüne/schwarze Pfeil zeigt die Maximalantworten ($\Delta F_{340}/F_{380}$) beider Messungen, welche sich aus der Differenz F_{\max} minus F_{\min} errechnet. Der rote Pfeil zeigt die Differenz des Ca^{2+} Signals in beiden Messungen.

Tab. 7: Für Fura-Messungen verwendete Pufferlösungen

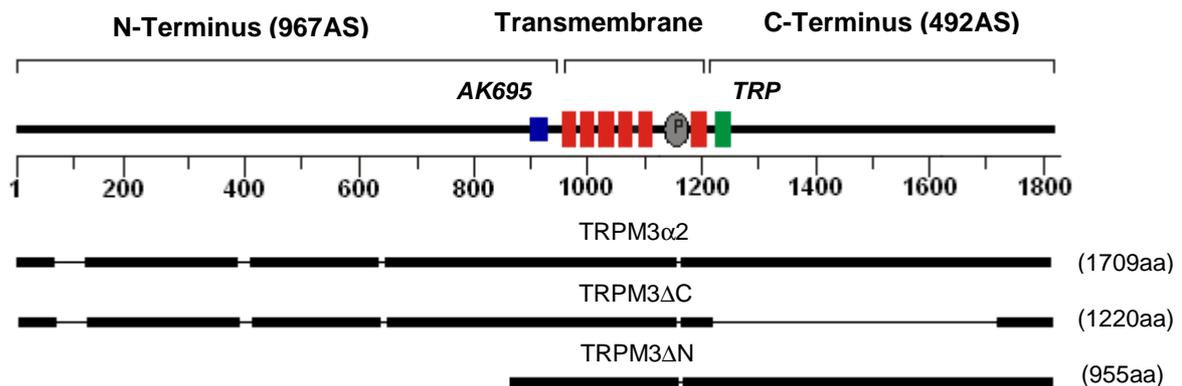
| Substanz | Ringerlösung 2Ca | Ringerlösung 1Ca | Ringerlösung 0Ca |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| NaCl (mM) | 135 | 135 | 135 |
| KCl (mM) | 5,4 | 5,4 | 5,4 |
| MgCl ₂ (mM) | 2 | 2 | 2 |
| CaCl ₂ (mM) | 2 | 1 | - |
| Glucose (mM) | 20 | 20 | 20 |
| Hepes (mM) | 10 | 10 | 10 |
| EGTA (mM) | - | - | 2 |

4 Ergebnisse

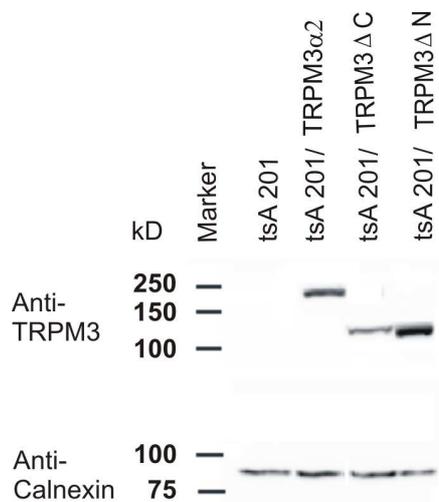
4.1 Amino- und Carboxyterminus sind für die Bildung funktionstüchtiger TRPM3-Ionenkanäle wesentlich

Nach dem gegenwärtigen Modell bestehen TRP-Ionenkanäle aus vier TRP-Proteinuntereinheiten, die gemeinsam die Pore des Kanals bilden (Abb. 3). Alle TRP-Untereinheiten besitzen jeweils sechs Transmembrandomänen, die die Plasmamembran durchqueren und ihre Amino- und Carboxy-Termini sind im Cytosol lokalisiert.

A



B



C

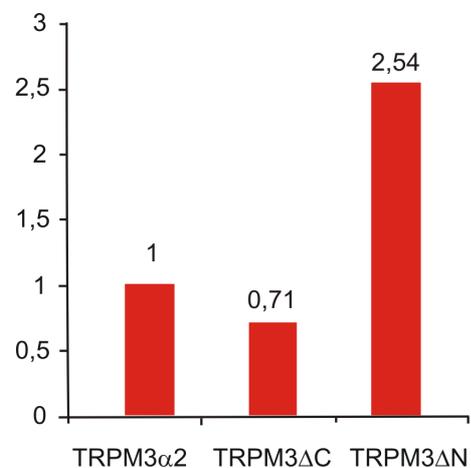


Abb. 8: Expression von C- und N-terminal trunkierten TRPM3-Proteinen in HEK-tsA201-Zellen

- A** Schematische Darstellung von TRPM3 α 2 sowie der C- und N-terminal trunkierten Proteine TRPM3 Δ C und TRPM3 Δ N. Der obere Balken zeigt die generelle Organisation der TRPM3-Domänen. Die Transmembranregion (rot), die Kanalpore (P, hellgrau) und das TRP-Motiv (TRP, grün) sind gezeigt. Die Erkennungsstelle des polyklonalen Anti-TRPM3-Antikörper AK 695 ist durch einen blauen Kasten angezeigt. Die Mutanten TRPM3 Δ C und TRPM3 Δ N sind relativ zu ihrer Größe skaliert und die Zahl der Aminosäuren ist in Klammern angegeben.
- B** Westernblot von TRPM3 α 2, TRPM3 Δ C und TRPM3 Δ N 48h nach Transfektion ihrer cDNA in HEK-tsA201-Zellen. Der Anti-TRPM3-Antikörper AK 695 wurde in der Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zur Kontrolle der im Gel getrennten Proteinmenge wurde der Blot gestrippt und mit einem Anti-Calnexin-Antikörper inkubiert.
- C** Densitometrische Analyse der in B gezeigten TRPM3-Signale. Diese Signale wurden in Bezug zu den mit dem Anti-Calnexin-Antikörper erhaltenen Signalen gesetzt und dann auf die nach Transfektion von MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP erhaltenen Signale normiert.

Der Aminoterminus von TRPM3 α 2, umfasst 967 Aminosäurereste, also mehr als die Hälfte des Gesamtproteins (1709 AS; Abb. 8A). Er ist Gegenstand vielfältiger Variationen des TRPM3-Proteins, die durch alternatives Spleißen der Transkripte generiert werden, und er enthält verschiedene Calmodulin-Bindungsstellen (Frühwald J., 2010). Der Carboxyterminus weist 492 Aminosäurereste auf und trägt das für TRP-Proteine typische TRP-Motiv (Abb. 8A). Während die Transmembranregion des TRPM3-Proteins als porenbildende Domäne funktionell bereits gut charakterisiert ist (Oberwinkler et al., 2005), ist die Funktion von N- und C-Terminus weitgehend unklar.

Daher wurde zunächst untersucht, inwiefern diese großen Proteinabschnitte für die Funktionstüchtigkeit von TRPM3-Proteinen wesentlich sind. Dazu wurden Mutanten TRPM3 Δ N und TRPM3 Δ C, welchen die Aminosäurereste 1-767 bzw. 1125-1613 fehlen, hergestellt. Ihre cDNA wurde in den Expressionsvektor pCAGGS2/IRES-GFP (Kap. 3.2) eingeschleust und in humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie HEK-tsA201 transfiziert (Kap. 3.8.2). Nach 48 h wurden die Zellen lysiert (Kap. 3.7.1) und 20 μ g Protein im Westernblot, (Kap. 3.7.4) im Hinblick auf die Gegenwart von rekombinanten TRPM3-Proteinen mit Hilfe des Anti-TRPM3-Antikörpers AK 695 untersucht (Abb. 8B). Die im Gel getrennte Proteinmenge wurde mit Hilfe des Anti-Calnexin-Antikörpers überprüft.

Abbildung 8B zeigt, dass TRPM3 α 2 und auch die Mutanten TRPM3 Δ N und TRPM3 Δ C erfolgreich in HEK-tsA201-Zellen exprimiert wurden. Die molekularen Massen der gebildeten, rekombinanten Proteine stimmten mit den anhand der Aminosäuresequenz kalkulierbaren Massen von TRPM3 α 2 (195kD), TRPM3 Δ N (110kD) und TRPM3 Δ C (139,5kD) überein. Die densitometrische Untersuchung zeigt, dass die Menge des gebildeten TRPM3 Δ C-Proteins ca. 29% geringer war als die Menge des gebildeten TRPM3 α 2-Proteins. Das TRPM3 Δ N-Protein wurde im Vergleich zum TRPM3 α 2-Protein deutlich überexprimiert. (Abb. 8C).

Zur Untersuchung der Funktion der TRPM3-Mutanten wurden Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von HEK-tsA201-Zellen mit Hilfe des Ca²⁺-Indikatorfarbstoffs Fura-2 nach Transfektion der TRPM3 cDNAs durchgeführt (Kap. 3.9). Die Identifikation transfizierter Zellen gelang dabei mit Hilfe der grünen Fluoreszenz des bicistronisch co-exprimierten Reporterproteins GFP. Die Zellen wurden mit Ringerlösung 1Ca perfundiert (Tab. 7) und durch Zugabe von 30 μ M Pregnenolonsulfat aktiviert (Wagner et al., 2008). TRPM3 α 2 exprimierende Zellen zeigten nach Stimulation im Unterschied zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen ein reversibles und wiederholbares Ca²⁺-Signal (Abb. 9A+D). Demgegenüber zeigten sowohl TRPM3 Δ C- als auch TRPM3 Δ N-transfizierte Zellen kein Ca²⁺-Signal nach Pregnenolonsulfat-Stimulation (Abb. 9B-D).

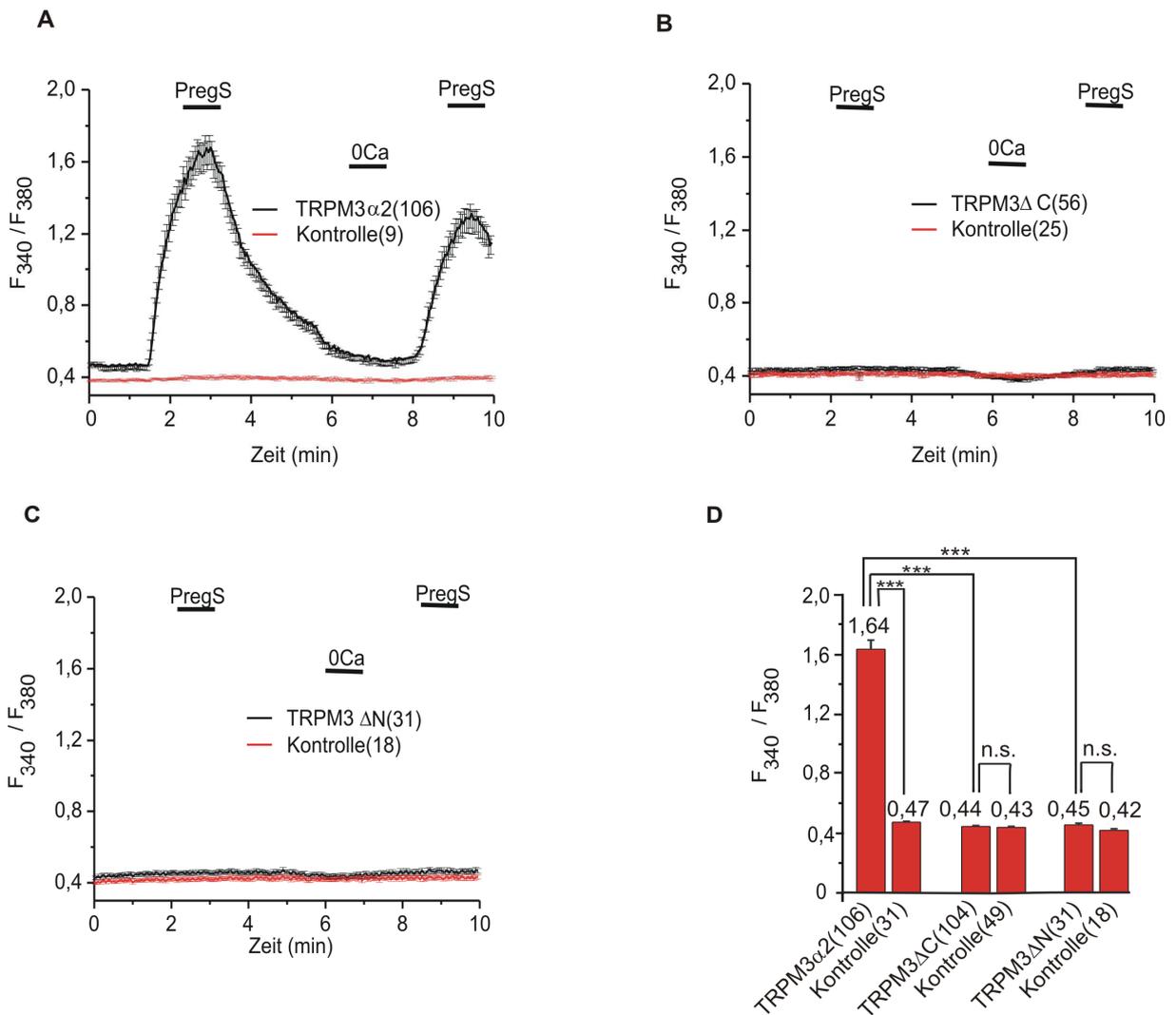


Abb. 9: C-terminal und N-terminal verkürzte TRPM3-Proteine zeigen nach Pregnenolonsulfat-Stimulation kein Ca²⁺-Signal

A–C Fura-2-Messung von HEK-tsA201-Zellen in Ringerlösung 1Ca 48h nach Transfektion mit TRPM3α2-, TRPM3ΔC und TRPM3ΔN im Vergleich zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen nach Stimulation der Zellen mit 30 μM Pregnenolonsulfat (PregS). Die Signale sind wiederholt auch nach vorübergehendem Entzug von Ca²⁺ in der Badlösung (0Ca) auslösbar.

D Statistische Auswertung des maximalen Ca²⁺-Signals der in A-C gezeigten Experimente (**p<0,001; n.s., nicht signifikant).

Die Ergebnisse belegen, dass sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus wesentlich für die Funktion des TRPM3-Kanals sind. Deletionen dieser Bereiche führen zum Funktionsverlust des TRPM3-Ionenkanals.

4.2 TRPM3 besitzt eine Coiled-Coil-Domäne im C-Terminus

Die vorangegangenen Experimente zeigen, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von TRPM3 für die Funktionstüchtigkeit des TRPM3-Ionenkanals wichtig sind. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten im N-Terminus von TRPM3 verschiedene Calmodulinbindungsstellen mit Hilfe einer computergestützten Analyse identifiziert werden (Frühwald J., 2010). Im C-Terminus von TRPM3 sind hingegen mit Ausnahme des TRP-Motivs keine weiteren funktionell oder strukturell bedeutsamen Domänen bekannt. Jedoch wurde im C-Terminus anderer TRPM-Proteine wie TRPM2 und TRPM8 eine Coiled-Coil-Domäne nachgewiesen, die für die Funktion dieser Kanäle wesentlich ist (Erlor et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Um einen ersten Hinweis auf die Gegenwart von Coiled-Coil-Domänen im TRPM3-Protein zu erhalten, wurde die TRPM3 α 2-Aminosäuresequenz computergestützt mit Hilfe eines von Lupas entwickelten Algorithmus (Lupas et al., 1991), (www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) untersucht. Das Programm gleicht die Proteinsequenz gegen eine Datenbank mit bekannten Coiled-Coil-Sequenzen ab und sucht in unterschiedlich langen Sequenzabschnitten (Fenstern) Ähnlichkeiten zur Heptadenstruktur von Coiled-Coils. Die gewählte Fensterbreite kann 14, 21 oder 28 Aminosäurereste umfassen. Zur Identifizierung unbekannter Coiled-Coil-Regionen sollten jedoch nur 28 Aminosäurereste umfassende Sequenzabschnitte berücksichtigt werden und die Wahrscheinlichkeit für eine Coiled-Coil-Domäne sollte mindestens 50% betragen (Lupas et al., 1991; Lupas, 1996). Weiterhin wichtig bei der Analyse ist die 2,5-fache Gewichtung der Aminosäurereste a und d in der Heptade, da diese Reste zur Ausbildung der Interaktionsgrenzfläche wesentlich sind (Mason und Arndt, 2004). Liegt der Wert mit 2,5-facher Gewichtung mehr als 20-30% unter dem Wert ohne Gewichtung, ist das Vorliegen einer Coiled-Coil-Domäne unwahrscheinlich. Die Enden der Coiled-Coil-Region werden am exaktesten mit einer Fensterbreite von 21 Aminosäureresten identifiziert.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer solchen Analyse des TRPM3 α 2-Proteins. Bei der Wahl einer Fensterbreite von 14 Aminosäureresten erscheint zwar die Gegenwart von Coiled-Coil-Regionen im N-Terminus von TRPM3 denkbar, nach Analyse der Sequenz mit einem 21 (nicht gezeigt) oder 28 Aminosäurereste langen Fenster wird jedoch klar, dass nur im Carboxyterminus des Proteins unmittelbar hinter der sechsten Transmembrandomäne zwischen den Aminosäureresten 1215-1284 mit nahezu 100% Wahrscheinlichkeit eine Coiled-Coil-Region vorhanden ist. Diese Domäne konnte mit zwei weiteren Algorithmen „Marcoil“ (<http://bcf.isb-sib.ch/Delorenzi/Marcoil/index.html>) und „PCOILS“ (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>) bestätigt werden (nicht gezeigt).

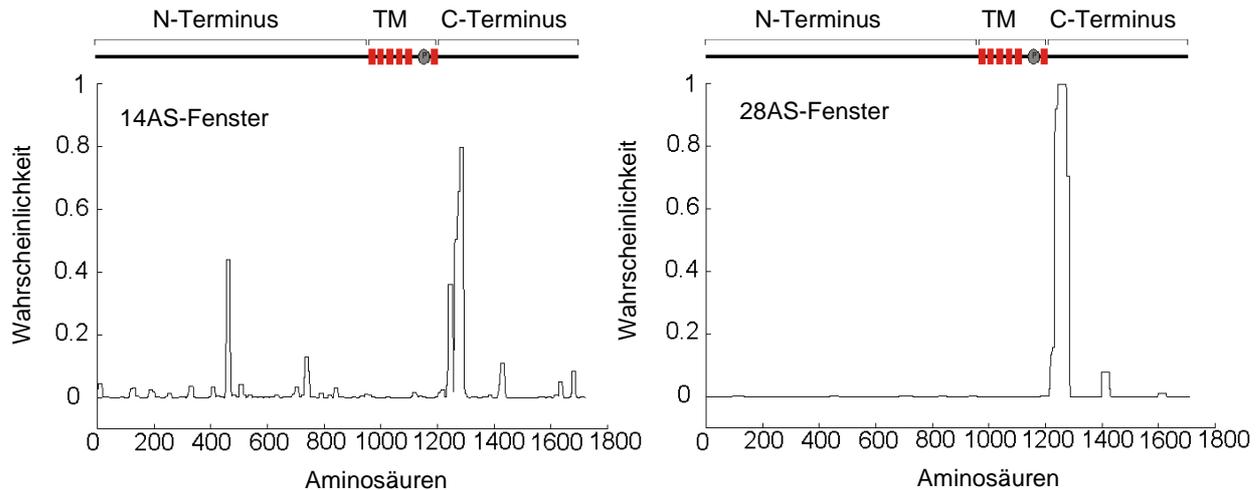


Abb. 10: Prognose von Coiled-Coil-Regionen im TRPM3 α 2-Protein mittels „Coils“

Die Abbildung zeigt die Wahrscheinlichkeit (Ordinaten) für die Gegenwart von Coiled-Coil-Regionen in definierten Sequenzabschnitten des TRPM3 α 2-Proteins nach Analyse mit einer Fensterbreite von 14 (links) und 28 Aminosäureresten (rechts) sowie 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d innerhalb einer möglichen Heptade. Auf den Abszissen sind die 1709 Aminosäuren des TRPM3 α 2-Proteins skaliert. Die oberen Balken zeigen die generelle Organisation des TRPM3-Proteins mit N-Terminus, C-Terminus, Transmembranregion (TM, rot) und Kanalpore (P, hellgrau).

4.3 Strategien zur Analyse der funktionellen Bedeutung der Coiled-Coil-Region des TRPM3-Proteins

Wenn die Coiled-Coil-Domäne für die TRPM3-Kanalkomplexbildung wesentlich ist, so kann man erwarten, dass die Deletion dieser Domäne zur Funktionslosigkeit des TRPM3-Ionenkanals führt. Um die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne für die Funktion des TRPM3-Ionenkanals zu untersuchen, sollten daher Ca^{2+} -Signale von Zellen verglichen werden, die TRPM3 α 2 oder aber TRPM3 α 2 ohne Coiled-Coil-Domäne exprimieren. Um eine Deletion der Coiled-Coil-Domäne zu erzielen, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt: Einerseits wurde das TRPM3-Protein systematisch C-terminal verkürzt. Diese einfache Strategie hat den Vorteil, schnell durchführbar zu sein und mit großer Sicherheit die Coiled-Coil-Region zu zerstören. Funktionsverluste der veränderten Proteine können jedoch nicht nur durch das Fehlen der Coiled-Coil-Region erklärt werden, sondern können ebenso gut, durch die Abwesenheit anderer funktionell wesentlicher Strukturen bedingt sein. Daher wurde eine zweite Strategie zur Deletion der Coiled-Coil-Domäne verfolgt bei der durch gezielten Austausch einzelner Aminosäurereste in den Heptaden-Positionen a und d (Abb. 4) die Coiled-Coil-Struktur zerstört wird.

4.3.1 Strategie 1: Deletion der Coiled-Coil-Region durch schrittweise Verkürzung des C-Terminus

Wie Abbildung 10 zeigt, ist die Coiled-Coil-Region von TRPM3 α 2 im Carboxyterminus zwischen den Aminosäureresten 1215-1284 lokalisiert (Fensterbreite 21). Um die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne untersuchen zu können, wurde zunächst entsprechend der oben beschriebenen ersten Strategie das TRPM3 α 2-Protein im Bereich der Coiled-Coil-Region systematisch um jeweils 15 Aminosäuren gekürzt. Die Benennung der Mutanten erfolgte entsprechend ihrer Aminosäureanzahl: C1277, C1262, C1247, C1232, C1217. Für jede dieser verkürzten Mutanten wurde eine Analyse mittels „Coils“ sowohl mit einfacher als auch mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d durchgeführt. Das Ergebnis mit einer Fensterbreite von 28 Aminosäureresten und 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d ist in Abbildung 11C dargestellt. Die computergestützte Analyse zeigt, dass die Coiled-Coil-Region der Mutanten C1232 und C1217 mit 99,9% Wahrscheinlichkeit zerstört wurde. Bei der Mutante C1277 liegt hingegen die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Coiled-Coil-Domäne bei 100% und die Wahrscheinlichkeiten der Deletionsmutanten C1262 und C1247 liegen bei 92% und 13%.

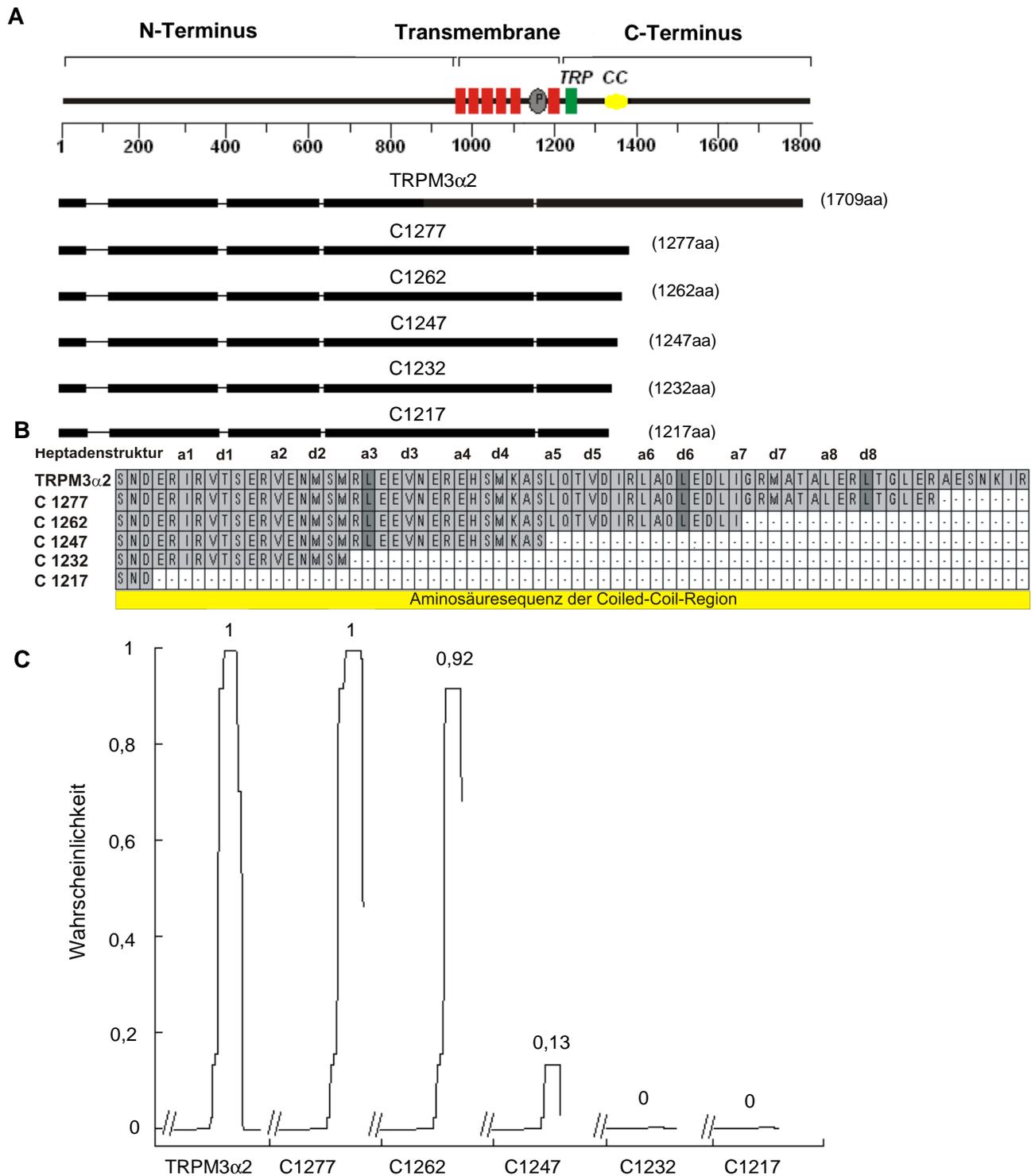


Abb. 11: Durch sukzessive C-terminale Verkürzung von TRPM3 α 2 geht die Coiled-Coil-Region verloren

- A** Schematische Darstellung von TRPM3 α 2 und den Mutanten C1277, C1262, C1247, C1232, C1217 (*schwarze Balken*). Der *obere Balken* zeigt die generelle Organisation der TRPM3-Domänen. Die Transmembranregion inklusive der Kanalpore (*P*), des TRP-Motivs (*TRP*) und der Coiled-Coil Region (*cc*) sind angezeigt. Die Zahl der Aminosäuren steht in Klammern.
- B** Aminosäuresequenz von TRPM3 α 2 und den TRPM3-Mutanten im Bereich der Coiled-Coil-Region, die schrittweise um jeweils 15 Aminosäuren gekürzt wurden. Die Heptadenstruktur mit den Positionen a und d, die zur Ausbildung der Interaktionsgrenzfläche wesentlich sind, ist gezeigt.
- C** Vorhersage von Coiled-Coil-Domänen in den TRPM3-Deletionsmutanten nach Analyse mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d und einer Fensterbreite von 28 Aminosäureresten. Auf der Abszisse sind die Sequenzabschnitte 1200-1300 der einzelnen Mutanten und auf der Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Coiled-Coils dargestellt.

4.3.2 Strategie 2: Deletion der Coiled-Coil-Domäne durch gezielte Mutagenese essentieller Aminosäurereste

Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäurereste in den Heptaden-Positionen a oder d (Abb. 4) sollte die Coiled-Coil-Struktur zerstört werden. Zunächst wurde die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Coiled-Coil-Domäne bei einem einzelnen Aminosäureaustausch in einer der Heptaden-Positionen mit Hilfe von „COILS“ berechnet (Tab. 8). Dabei wurde die entsprechende Aminosäure jeweils durch einen Prolinrest ersetzt, da Prolin die Ausbildung von α -Helices stört (Gunasekaran et al., 1998).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst und zeigen, dass bei keiner der untersuchten Mutanten die Wahrscheinlichkeit (bei 2,5-facher Gewichtung) für die Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur unter 70% liegt. Die einzige Punktmutation, die – allerdings nur bei einfacher Gewichtung der Heptadenpositionen – zu einer deutlichen Verminderung der Wahrscheinlichkeit führt, ist ein Austausch von L₁₂₅₈ in Heptadenposition d6 (lila in der Tabelle gekennzeichnet).

Tab. 8: Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Domäne bei einem einzelnen Austausch in den Heptaden-Positionen a1 bis d8 durch die Aminosäure Prolin

| Heptaden- position | a1 | d1 | a2 | d2 | a3 | d3 | a4 | d4 | a5 | d5 | a6 | d6 | a7 | d7 | a8 | d8 | Coil- Wahrsch. * | Coil- Wahrsch. ** |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------|-------------------------|
| Aminosäure | I | T | V | M | L | V | E | M | L | V | L | L | I | M | L | L | | |
| | P | | | | | | | | | | | | | | | | 100% | 97% |
| | | P | | | | | | | | | | | | | | | 100% | 97% |
| | | | P | | | | | | | | | | | | | | 100% | 97% |
| | | | | P | | | | | | | | | | | | | 100% | 97% |
| | | | | | P | | | | | | | | | | | | 82% | 100% |
| | | | | | | P | | | | | | | | | | | 70% | 100% |
| | | | | | | | P | | | | | | | | | | 70% | 100% |
| | | | | | | | | P | | | | | | | | | 70% | 100% |
| | | | | | | | | | P | | | | | | | | 80% | 70% |
| | | | | | | | | | | P | | | | | | | 80% | 70% |
| | | | | | | | | | | | P | | | | | | 80% | 70% |
| | | | | | | | | | | | | P | | | | | 80% | 16% |
| | | | | | | | | | | | | | P | | | | 97% | 92% |
| | | | | | | | | | | | | | | P | | | 97% | 92% |
| | | | | | | | | | | | | | | | P | | 97% | 92% |
| | | | | | | | | | | | | | | | | P | 97% | 97% |

* Analyse der Coiled-Coil-Wahrscheinlichkeit mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster

** Analyse der Coiled-Coil-Wahrscheinlichkeit mit einfacher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster. Die Aminosäure in der Heptadenposition d6 (L₁₂₅₈) ist lila unterlegt.

Offensichtlich reicht eine einzelne Punktmutation nicht aus, um die Coiled-Coil-Region komplett zu zerstören. Daher wurde die Wahrscheinlichkeit für eine Coiled-Coil-Struktur nach Einführung von zwei unabhängigen Mutationen im Bereich der Heptaden-Positionen a1 bis d8 analysiert (Tab. 9).

| Heptaden- position | a1 | d1 | a2 | d2 | a3 | d3 | a4 | d4 | a5 | d5 | a6 | d6 | a7 | d7 | a8 | d8 | Coil- Wahrsch. * | Coil- Wahrsch. ** |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------|-------------------------|
| | I | T | V | M | L | V | E | M | L | V | L | L | I | M | L | L | | |
| | | | | | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | | | | | | P | | | | 9% | 0,60% |
| | | | | P | | | | | | | | | | P | | | 70% | 82% |
| | | | | P | | | | | | | | | | | P | | 70% | 82% |
| | | | | P | | | | | | | | | | | | P | 100% | 82% |
| | | | | | P | P | | | | | | | | | | | 100% | 70% |
| | | | | | P | | P | | | | | | | | | | 100% | 70% |
| | | | | | P | | | P | | | | | | | | | 70% | 23% |
| | | | | | P | | | | | P | | | | | | | 70% | 23% |
| | | | | | P | | | | | | P | | | | | | 70% | 23% |
| | | | | | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | | | | | | | P | | | | 9% | 4% |
| | | | | | P | | | | | | | | | P | | | 0,20% | 4% |
| | | | | | P | | | | | | | | | | P | | 26% | 10% |
| | | | | | P | | | | | | | | | | | P | 97% | 37% |
| | | | | | | P | P | | | | | | | | | | 100% | 70% |
| | | | | | | P | | P | | | | | | | | | 70% | 33% |
| | | | | | | P | | | P | | | | | | | | 70% | 33% |
| | | | | | | P | | | | P | | | | | | | 70% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | | P | | | | 9% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | | | P | | | 2,50% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | | | | P | | 7% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | | | | | P | 97% | 37% |
| | | | | | | | P | P | | | | | | | | | 70% | 37% |
| | | | | | | | P | | P | | | | | | | | 70% | 37% |
| | | | | | | | P | | | P | | | | | | | 5% | 37% |
| | | | | | | | P | | | | | P | | | | | 9% | 37% |
| | | | | | | | P | | | | | | | P | | | 2,50% | 37% |
| | | | | | | | P | | | | | | | | P | | 7% | 37% |
| | | | | | | | P | | | | | | | | | P | 3% | 33% |
| | | | | | | | | P | P | | | | | | | | 70% | 80% |
| | | | | | | | | P | | P | | | | | | | 70% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | | P | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | | | P | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | | | | P | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | P | | | | | | | 70% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | P | | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | | | P | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | | | | P | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | P | | | | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | | P | | | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | | | P | | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | | | | P | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | P | | | | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | P | | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | | P | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | | | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | | P | P | | | 97% | 97% |
| | | | | | | | | | | | | | P | | P | | 97% | 97% |
| | | | | | | | | | | | | | | P | P | | 97% | 97% |
| | | | | | | | | | | | | | | | P | P | 97% | 97% |
| | | | | | | | | | | | | | | | P | P | 97% | 97% |

* Analyse der Coil-Wahrscheinlichkeit mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster. Wahrscheinlichkeiten für die Bildung eines Coiled-Coils unter 20 % sind grau und die Prolinreste in der Heptadenposition d6 (L₁₂₅₈) sind lila gekennzeichnet.

** Analyse der Coil-Wahrscheinlichkeit mit einfacher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster.

Von den 120 möglichen Doppelmutanten in den Heptaden-Positionen a1 bis d8 gibt es keine, bei der mit nahezu 100% Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann, dass eine Coiled-Coil-Region gebildet wird. Auffallend ist jedoch erneut die Bedeutung von L₁₂₅₈: Wie die grauen Kennzeichnungen in der Tabelle 9 verdeutlichen, liegt immer dann, wenn diese Aminosäure mutiert ist, die Coiled-Coil-Wahrscheinlichkeit auch bei 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d unter 20 %.

Daher wurde basierend auf einer L₁₂₅₈P-Mutation nach Dreifach-Mutanten gesucht, bei denen mit größtmöglicher Sicherheit von einem Fehlen der Coiled-Coil Region ausgegangen werden kann. Tabelle 10 zeigt die 105 möglichen Kombinationen.

Tab. 10: Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Struktur nach gezieltem Austausch von L1258 und zwei weiteren Aminosäuren in den Heptaden-Positionen a1 bis d8 durch Prolin

| Heptaden- position | a1 | d1 | a2 | d2 | a3 | d3 | a4 | d4 | a5 | d5 | a6 | d6 | a7 | d7 | a8 | d8 | Coil- Wahrsch. * | Coil- Wahrsch. ** |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------|-------------------------|
| Aminosäure | I | T | V | M | L | V | E | M | L | V | L | L | I | M | L | L | | |
| | P | P | | | | | | | | | | P | | | | | 16% | 66% |
| | P | | P | | | | | | | | | P | | | | | 13% | 27% |
| | P | | | P | | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | P | | | | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | P | | | | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | P | | | | | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | P | | | | | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | P | | | | | | | | P | | | P | | | | | 10% | 57% |
| | P | | | | | | | | | | | P | | | | | 16% | 66% |
| | P | | | | | | | | | | | P | P | | | | 16% | 66% |
| | P | | | | | | | | | | | P | | P | | | 16% | 66% |
| | P | | | | | | | | | | | P | | | P | | 16% | 66% |
| | | P | P | | | | | | | | | P | | | | | 13% | 27% |
| | | P | | P | | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | | | | | P | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | P | | | | | | | | P | | P | | | | | 16% | 66% |
| | | P | | | | | | | | | | P | P | | | | 16% | 66% |
| | | P | | | | | | | | | | P | | P | | | 16% | 66% |
| | | P | | | | | | | | | | P | | | P | | 16% | 66% |
| | | P | | | | | | | | | | P | | | | P | 16% | 66% |
| | | | P | P | | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | | | | P | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | | | | | P | | P | | | | | 13% | 27% |
| | | | P | | | | | | | | | P | | P | | | 13% | 27% |
| | | | P | | | | | | | | | P | | | P | | 13% | 27% |
| | | | | P | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | | P | | | P | | | | | 5% | 1% |

| Heptaden- position | a1 | d1 | a2 | d2 | a3 | d3 | a4 | d4 | a5 | d5 | a6 | d6 | a7 | d7 | a8 | d8 | Coil- Wahrsch. * | Coil- Wahrsch. ** |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------|-------------------------|
| | I | T | V | M | L | V | E | M | L | V | L | L | I | M | L | L | | |
| | | | P | | | | | | | | P | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | P | | | | | | | | | P | P | | | | 0,40% | 0,70% |
| | | | P | | | | | | | | | P | | P | | | 0% | 0,70% |
| | | | P | | | | | | | | | P | | | P | | 0,30% | 0,70% |
| | | | P | | | | | | | | | P | | | | P | 0% | 0,70% |
| | | | | P | P | | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | | P | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | P | | | | | | P | | P | P | | | | 0,40% | 0,10% |
| | | | | P | | | | | | | | P | | P | | | 0% | 0,10% |
| | | | | P | | | | | | | | P | | | P | | 0,30% | 0,10% |
| | | | | P | | | | | | | | P | | | | P | 0% | 0,10% |
| | | | | | P | P | | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | P | | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | | P | | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | | | P | | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | | | | P | | P | | | | | 5% | 1% |
| | | | | | P | | | | | | P | P | | | | | 0,40% | 0,70% |
| | | | | | P | | | | | | | P | | P | | | 0% | 0,70% |
| | | | | | P | | | | | | | P | | | P | | 0,30% | 0,70% |
| | | | | | P | | | | | | | P | | | | P | 0% | 0,70% |
| | | | | | | P | P | | | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | P | | P | | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | P | | | P | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | P | | | | P | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | P | P | | | | | 2% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | P | | P | | | 2% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | P | | | P | | 2% | 33% |
| | | | | | | P | | | | | | P | | | | P | 2% | 33% |
| | | | | | | | P | P | | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | | P | | P | | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | | P | | | P | | P | | | | | 5% | 33% |
| | | | | | | | P | | | | P | P | | | | | 2% | 33% |
| | | | | | | | P | | | | | P | | P | | | 2% | 33% |
| | | | | | | | P | | | | | P | | | P | | 2% | 33% |
| | | | | | | | P | | | | | P | | | | P | 2% | 33% |
| | | | | | | | | P | P | | | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | P | | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | P | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | P | | P | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | P | | | | P | | | P | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | P | | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | P | P | | | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | P | P | | P | | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | P | | | P | | | P | | 13% | 80% |
| | | | | | | | | | | P | P | P | | | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | P | P | | P | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | P | P | | | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | P | P | | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | P | | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | P | | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | | P | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | | P | P | | 16% | 80% |
| | | | | | | | | | | | | P | | | P | P | 16% | 80% |

* Analyse der Coil-Wahrscheinlichkeit mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster. Die Triplemutationen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9% die Coiled-Coil-Region zerstören, sind grau und die Prolinreste in Heptadenposition d6 (L₁₂₅₈) sind lila unterlegt.

** Analyse der Coil-Wahrscheinlichkeit mit einfacher Gewichtung der Aminosäurereste a und d im 28AS-Fenster.

Tabelle 10 zeigt, dass rechnerisch zwei Dreifach-Mutationen existieren, die mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 99,9\%$ zur Zerstörung der Coiled-Coil-Region führen. Diese sind in Tabelle 10 hellgrau unterlegt. Das Ergebnis gilt sowohl bei einfacher als auch bei 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d nach Analyse im 28 Aminosäurereste langen Fenster.

Für einen funktionellen Vergleich von TRPM3 α 2 mit einem TRPM3-Protein ohne Coiled-Coil-Domäne wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Dreifach-Mutante generiert, deren Leucinreste L₁₂₃₄ (a3), L₁₂₅₈ (d6) und L₁₂₇₂ (d8) zu Prolin mutiert waren (Tab. 10 und Kap. 4.3.2). Diese Dreifach-Mutante wird im Folgenden als Mutante 3LnP bezeichnet. In Abbildung 12 ist die computergestützte Prognose von Coiled-Coil-Domänen der Dreifach-Mutante 3LnP im Vergleich zum TRPM3 α 2-Protein dargestellt.

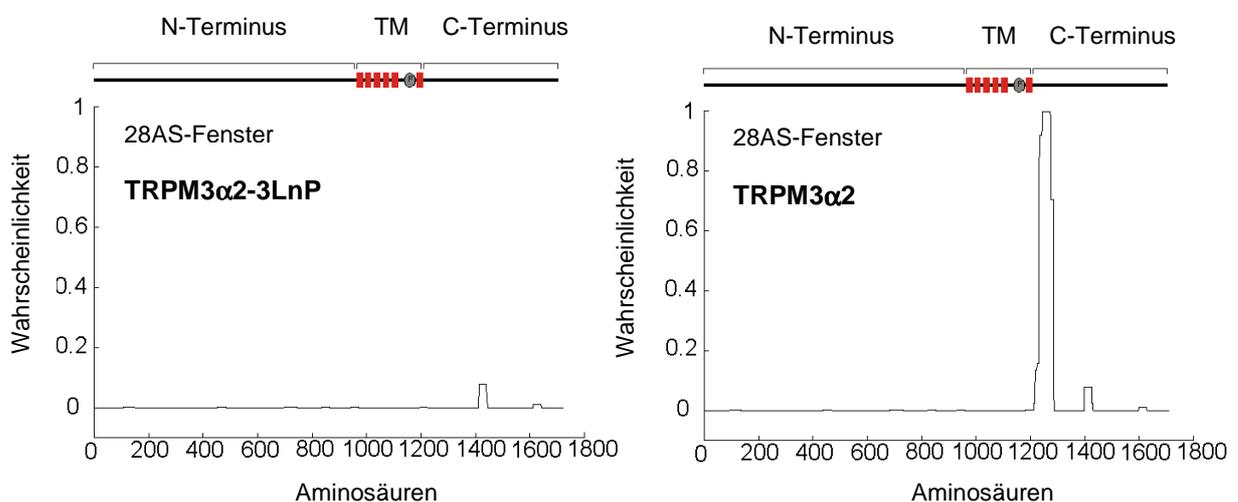


Abb. 12: Der Austausch von Leucinresten zu Prolin in den Heptaden-Positionen a3, d6, d8 von TRPM3 α 2 führt zur Zerstörung der Coiled-Coil-Domäne

Vorhersage der Coiled-Coil-Domäne im untersuchten TRPM3 α 2-3LnP-Protein im Vergleich zum TRPM3 α 2-Protein nach Analyse mittels „COILS“ mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste a und d und einer Fensterbreite von 28 Aminosäureresten. Auf der Abszisse sind die Aminosäuresequenzen von TRPM3 α 2-3LnP (links) und TRPM3 α 2 (rechts) und auf der Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Coiled-Coils dargestellt. Der obere Balken zeigt in beiden Diagrammen maßstabsgetreu die generelle Organisation des TRPM3-Proteins mit N-Terminus, C-Terminus, Transmembranregion (TM, rot) und der Kanalpore (hellgraue Ellipse).

4.4 Herstellung und Expression von TRM3-Mutanten

4.4.1 Herstellung C-terminaler Deletionsmutanten von TRPM3 α 2

Um, wie in Mutagenese-strategie 1 vorgesehen (Kap. 4.3.1), den Carboxyterminus schrittweise zu verkürzen, wurden die Oligonukleotidprimer PH710, PH711, PH712, PH713 und PH714 (Abb. 13A) synthetisiert. Diese Gegenstrangprimer codieren die C-terminalen Aminosäuren der im Abschnitt 4.3.1 konzipierten Mutanten (Abb. 11) gefolgt von einem Stopcodon (Tab. 3). Diese Primer wurden jeweils in Kombination mit Oligonukleotidprimer

PH399 zur Amplifikation 634 bis 454 Basenpaare langer TRPM3 cDNS-Fragmente mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion verwendet. Das Plasmid MycTRPM3 α 2pcDNA3 diente dabei als Matrize. Die Amplifikationsprodukte enthielten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV, welches glatte DNA-Enden generiert. Nach Restriktion der PCR-Amplifikationsprodukte mit EcoRV und nach Entfernung eines den TRPM3-C-Terminus codierenden EcoRV-Fragmentes aus dem Plasmid TRPM3-pCAGGSM2/IRES-GFP konnte dieses Fragment durch die verkürzten EcoRV-Fragmente (in Abb. 13 PCR-Produkte grün markiert) ersetzt werden.

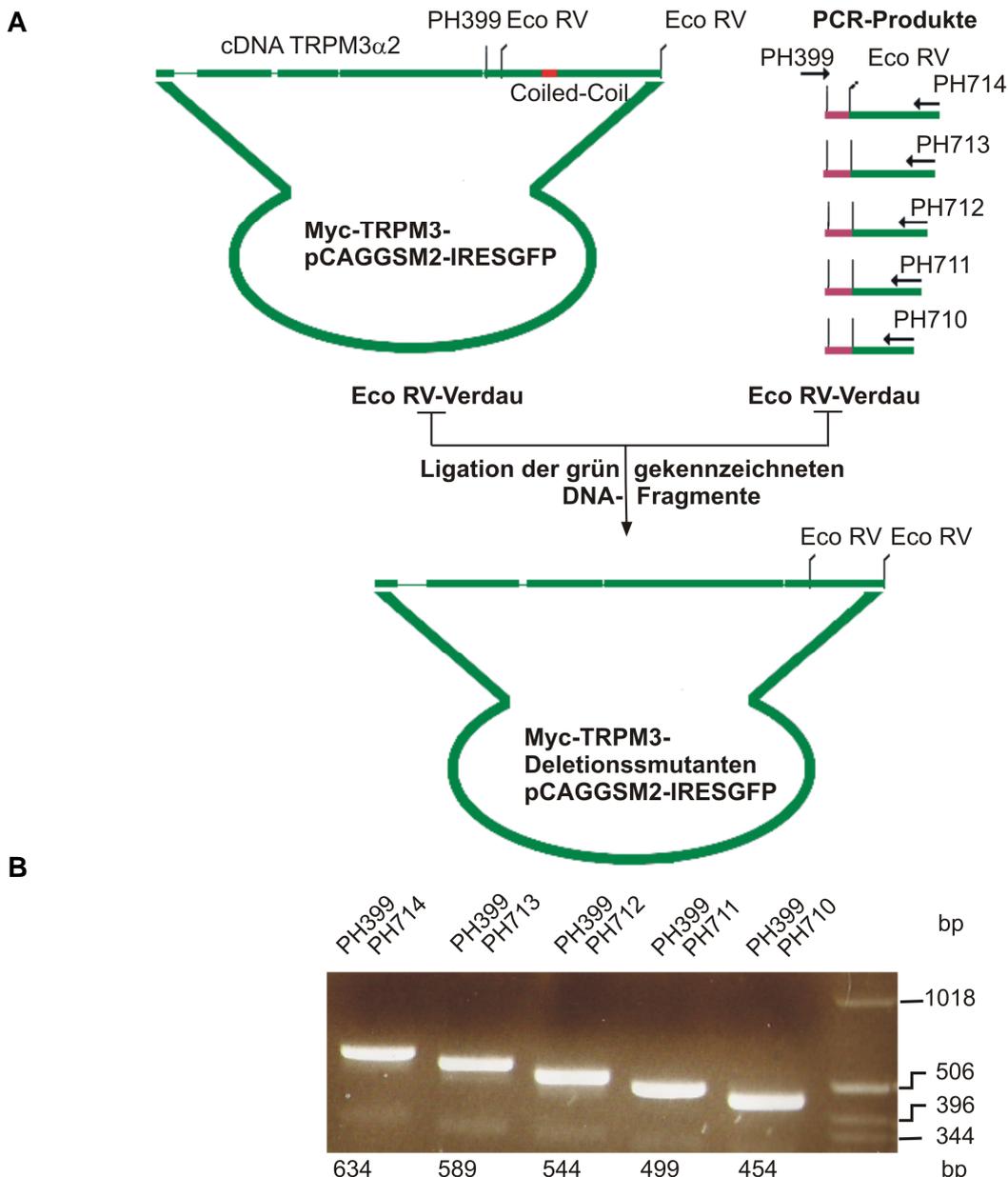


Abb. 13: Klonierung C-terminaler Deletionssmutanten C1277-C1217

- A** PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Sinn-Primers PH399 in Kombination mit den Primern PH710 - PH714 erhalten und mit EcoRV hydrolysiert. Die grün gekennzeichneten Fragmente wurden in einen EcoRV geschnittenen, dephosphorylierten Vektor MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP ligiert.
- B** Analyse der in A beschriebenen PCR-Produkte im Agarose-Gel. Die erwarteten Produktlängen (in bp) sind angegeben.

4.4.2 Expressionsanalyse C-terminaler Deletionsmutanten von TRPM3 α 2

Die Expression der verkürzten Mutanten wurde mit Hilfe von Westernblots überprüft (Abb. 14). Dazu wurden HEK-tsA201-Zellen mit pCAGGSM2/IRES-GFP-Plasmiden transfiziert, welche die cDNA von TRPM3 α 2 oder von den verkürzten Mutanten C1277, C1262, C1247, C1232, C1217 codieren (Kap. 3.8.2). 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (Kap. 3.7.1) und nach Quantifizierung der Proteinkonzentration (Kap. 3.7.2) im Westernblot analysiert. Die Gegenwart von rekombinanten TRPM3-Proteinen wurde mit Hilfe des Anti-TRPM3-Antikörpers AK 695 untersucht und die Proteinmenge mit dem Anti-Calnexin-Antikörper überprüft. Abbildung 14 zeigt, dass TRPM3 α 2 und die fünf Mutanten erfolgreich in HEK-tsA201-Zellen exprimiert wurden. Die molekularen Massen der gebildeten, rekombinanten Proteine stimmten mit den anhand der Aminosäuresequenz kalkulierbaren Massen von TRPM3 α 2 (195kD), C1277 (147kD), C1262 (145,5kD), C1247 (144kD), C1232 (142kD), und C1217 (140kD) überein. Die densitometrische Analyse (Abb. 14B) zeigt, dass die Menge zelleigenen Calnexins ungefähr gleich war. Bezogen auf die Calnexinexpression zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Menge der heterolog exprimierten TRPM3-Proteine, die mit unterschiedlicher Reinheit der codierenden Plasmide oder unterschiedlicher Stabilität der exprimierten mRNA oder Proteine zusammenhängen mag. Im Vergleich zu TRPM3 α 2 wurden die Mutanten der langen Varianten C1277 und C1262 nur mit 41 bzw. 67% Effizienz gebildet (Abb. 14B). Die Menge der Variante C1232 ist annähernd gleich mit der von TRPM3 α 2. Die Menge der stärker verkürzten Varianten C1217 und C1232 überstieg hingegen die von TRPM3 α 2 um 15–29%.

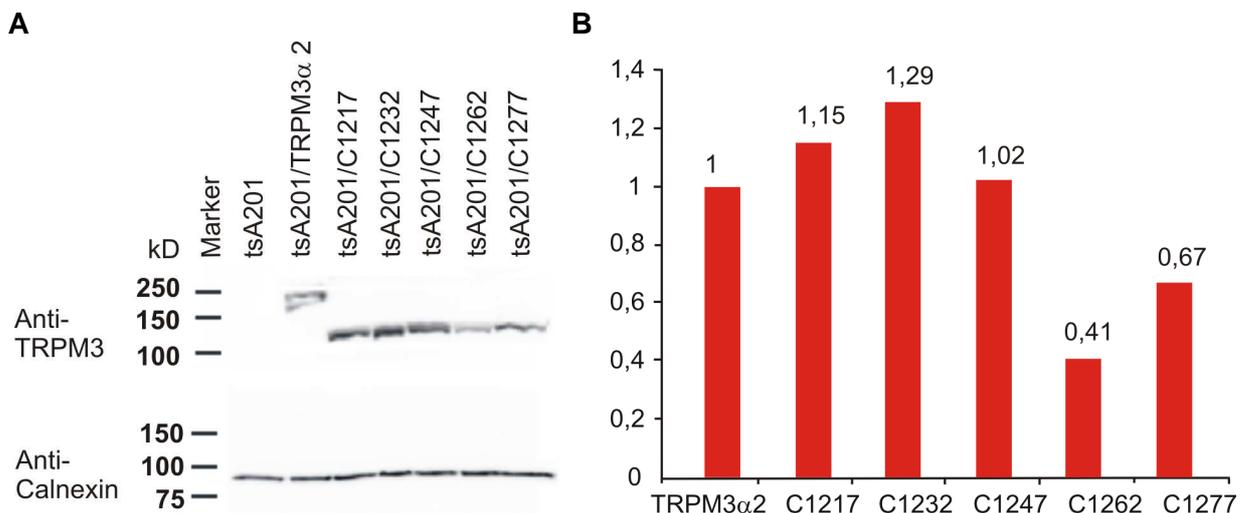


Abb. 14: Analyse der Expression C-terminaler Deletionsmutanten

- A** Westernblot von HEK-tsA201-Zelllysaten 48h nach Transfektion von je 20 μ g MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP oder der Mutanten C1277, C1262, C1247, C1232, C1217 im gleichen Vektor. Der Anti-TRPM3-Antikörper AK 695 (zur Lokalisation der Bindungstelle vgl. Abb. 8A) wurde in der Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zur Kontrolle der im Gel getrennten Proteinmenge wurde der Blot gestrippt und mit einem Anti-Calnexin-Antikörper inkubiert.
- B** Densitometrische Analyse der in A gezeigten TRPM3-Signale. Diese Signale wurden mit Hilfe des Anti-Calnexin-Signals gewichtet und dann auf das nach Transfektion von MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP erhaltene Signal normiert.

4.4.3 Herstellung einer Punktmutanten 3LnP und Analyse ihrer Expression

Aufgrund der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Ergebnisse wurden durch ortsspezifische Mutagenese (Kap. 3.6.12) schrittweise die Leucinresten L₁₂₃₄, L₁₂₅₈, und L₁₂₇₂ zu Prolin mutiert. Das Vorliegen der einzelnen Punktmutationen wurde durch Sequenzierung beider DNA-Stränge des erhaltenen Plasmids MycTRPM3 α 2-3LnP pCAGGSM2/IRES-GFP überprüft.

Die Expression des mutierten Proteins TRPM3 α 2-3LnP wurde mit Hilfe eines Westernblots mit der von TRPM3 α 2 verglichen (Abb. 15). Dazu wurden die cDNAs von TRPM3 α 2 und der Mutanten TRPM3 α 2-3LnP in HEK-tsA201 transfiziert (Kap. 3.8.2), 48h nach Transfektion wurden RIPA-Lysate hergestellt (Kap. 3.7.1) und 20 μ g Protein wurde im Westernblot (Kap. 3.7.4) analysiert.

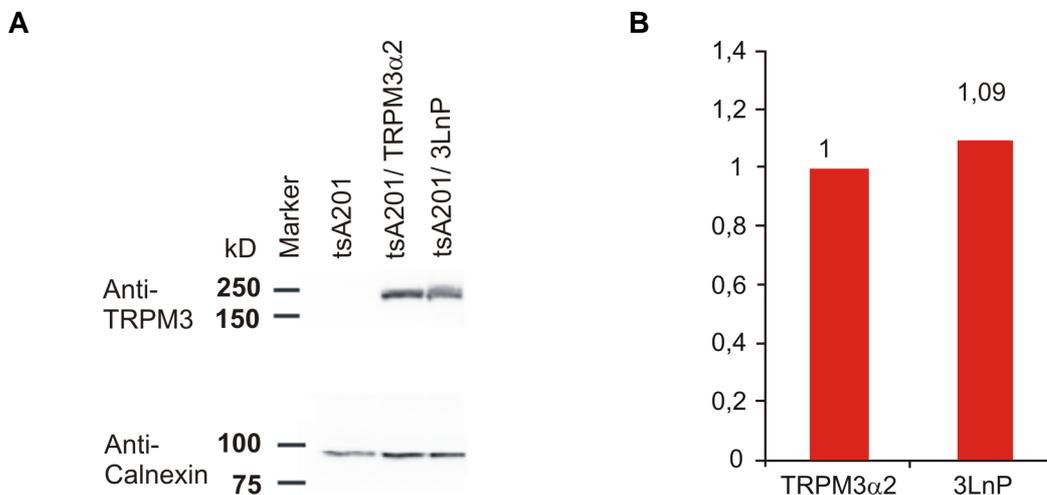


Abb. 15: Analyse der Expression von TRPM3 α 2 und der Mutanten TRPM3 α 2-3LnP

- A** Westernblot von HEK-tsA201-Zelllysaten 48h nach Transfektion von TRPM3 α 2 und 3LnP. Der Anti-TRPM3-Antikörper AK 695 wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Zur Kontrolle der im Gel getrennten Proteinmenge wurde der Blot mit einem Anti-Calnexin-Antikörper inkubiert.
- B** Densitometrische Analyse der in A gezeigten TRPM3-Signale. Diese Signale wurden mit Hilfe des Anti-Calnexin-Signals gewichtet und dann auf das nach Transfektion von MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP erhaltene Signal normiert.

Mit Hilfe des Anti-TRPM3-Antikörpers AK 695 konnte 48 h nach Transfektion eine deutliche Expression von TRPM3 α 2 und auch der Mutanten TRPM3 α 2-3LnP in HEK-tsA201-Zellen nachgewiesen werden. (Abb. 15). Die gebildeten, rekombinanten Proteine stimmten mit ihren molekularen Massen mit der theoretisch berechneten Masse (195kD) beider Proteine überein. Die im Gel getrennte Proteinmenge wurde mit Hilfe des Anti-Calnexin-Antikörpers überprüft und die densitometrische Untersuchung in Abbildung 15B zeigt, dass die Menge der gebildeten TRP-Proteine vergleichbar war.

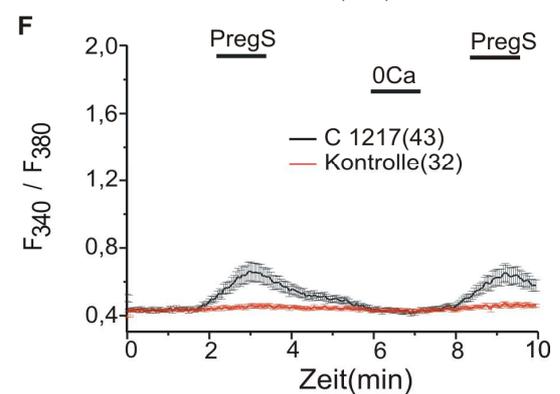
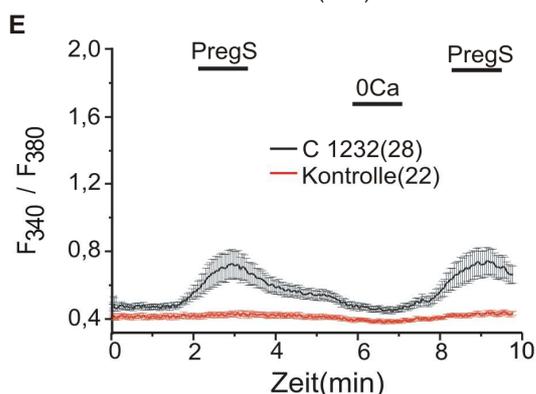
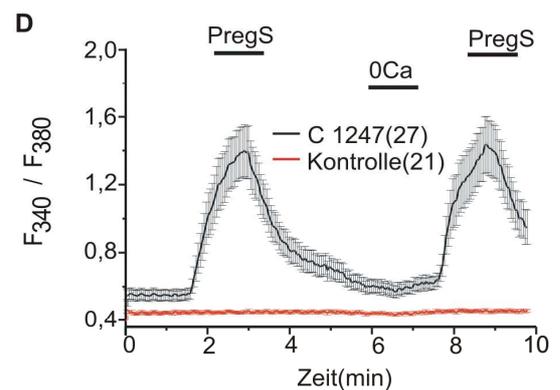
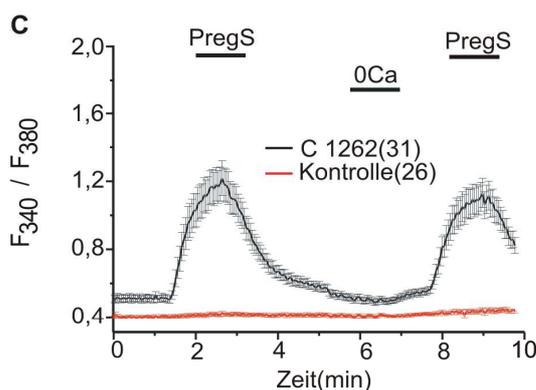
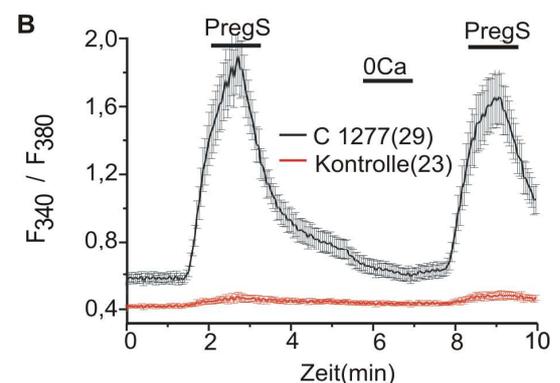
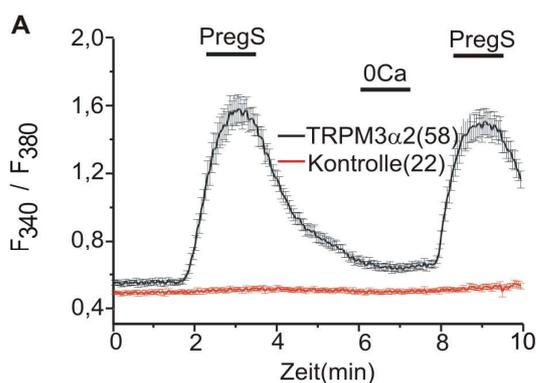
4.5 Funktionelle Analyse von TRPM3-Mutanten

4.5.1 Funktionelle Analyse von TRPM3 α 2-Deletionsmutanten

Zur Untersuchung der Funktion der TRPM3 α 2-Deletionsmutanten wurden Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von HEK-tsA201-, Cos- und HEK293-Zellen mit Hilfe des Ca²⁺-Indikatorfarbstoffs Fura-2 nach Transfektion der verschiedenen TRPM3 cDNAs durchgeführt (Kap. 3.9). HEK-tsA201- und Cos-Zellen wurden mit Ringerlösung perfundiert, welche 1mM Ca²⁺ enthielt; HEK293-Zellen wurden mit Ringerlösung 2mM Ca²⁺ umspült (Tab. 7). Die Aktivierung TRPM3-abhängiger Ca²⁺-Signale erfolgte jeweils durch Zugabe von 30 μ M Pregnenolonsulfat. Die Abbildungen 16A-F zeigen jeweils beispielhaft die Ca²⁺-Signale nach Einschleusung von TRPM3 α 2 sowie der Mutanten C1277, C1262, C1247, C1232, C1217 in HEK-tsA201-Zellen. Die zeitlichen Verläufe der Ca²⁺-Signale von Cos- und HEK293-Zellen entsprachen den hier für HEK-tsA201-Zellen gezeigten. Die Abbildungen 16G-H zeigen eine vergleichende Gegenüberstellung der maximalen Ca²⁺-Signale nach Pregnenolonsulfat-Stimulation in allen Zelltypen.

Die längste Mutante C1277, welcher 432 Aminosäurereste im Vergleich zu TRPM3 α 2 fehlen, erschien trotz vergleichsweise schwacher Expression (Abb. 14) voll funktionsfähig und zeigte sogar in HEK-tsA201- und Cos-Zellen einen im Vergleich zum Wildtypprotein verstärkten Ca²⁺-Einstrom nach Aktivierung mit Pregnenolonsulfat (Abb. 16G). Diese Verstärkung war jedoch in HEK-tsA201-Zellen statistisch nicht signifikant und konnte auch in HEK-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die uneingeschränkte Funktionstüchtigkeit von C1277 und die vollständige Funktionslosigkeit von Mutante TRPM3 Δ C (Abb. 8) zeigen, dass der 153 Aminosäurereste lange Abschnitt zwischen Position A₁₂₇₈ und S₁₁₂₅ im TRPM3 α 2-Protein essentiell für die Kanalfunktion von TRPM3-Proteinen ist, während der 432 Aminosäure lange Rest des Carboxyterminus entbehrlich ist. Der essentielle Abschnitt umfasst die Coiled-Coil-Domäne und das auch in TRPM3 konservierte TRP-Motiv des Proteins (Abb. 8). Eine weitere C-terminale Verkürzung um 15 bzw. 30 Aminosäuren (Mutanten C1262 und C1247) führte zu einer geringen aber in HEK-tsA201- und HEK-Zellen signifikanten Abnahme des Ca²⁺-Signals um 21-45% im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die mit der Mutante C1262 erzielten Signale sind dabei möglicherweise unterschätzt, da dieses Protein nur halb so stark heterolog exprimiert wurde (Abb. 14). Beide verkürzten Proteine erscheinen weitgehend funktionstüchtig. Dies ist überraschend, da die Wahrscheinlichkeit ein Coiled-Coil auszubilden bei der Mutante C1247 bereits deutlich unter 20% liegt (Abb. 11C). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Gegenwart einer Coiled-Coil-Struktur nicht wesentlich für die Funktionsfähigkeit von TRPM3-Ionenkanälen ist und demgemäß eine Multimerisierung von TRPM3-Kanaluntereinheiten auch ohne eine solche Struktur möglich ist. Diese Annahme bestätigt sich auch bei der Analyse der Mutanten C1232 und C1217: Für die um weitere 15 bzw. 30 Aminosäuren gekürzten Proteine liegt die Prognosewahrscheinlichkeit für

eine Coiled-Coil-Struktur unter 0,1% (Abb. 11C). Trotzdem offenbaren beide Proteine bei vergleichbarer Expressionsstärke (Abb. 14) in den verschiedenen Zelllinien mit 8-28 % bzw. 7-37 % des TRPM3 α 2-Signals ein zwar deutlich vermindertes, aber klar nachweisbares Ca²⁺-Signal nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat. Dies zeigt erneut, dass die Gegenwart eines Coiled-Coils für die Bildung eines TRPM3-Ionenkanals nicht notwendig ist. Es bleibt offen, inwiefern eine Coiled-Coil-Struktur zur Assemblierung von TRPM3-Kanälen beiträgt. Darauf könnte die deutliche Abnahme der Calciumsignale nach Verkürzung hindeuten. Umgekehrt scheint insbesondere das Fehlen der Aminosäurereste R₁₂₃₃LEEVNEREHSMKAS₁₂₄₇ die Funktionstüchtigkeit von TRPM3 besonders negativ zu beeinflussen: Die Mutante C1232 weist gegenüber der Mutante C1247, je nach Zelllinie, eine mindestens 2,9-fach geringere Aktivität auf (Abb. 16H). Dieser Bereich enthält eine Konsensussequenz ([S/T]-x-[RK]) einer Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle (Kishimoto et al., 1985). Möglicherweise ist die Phosphorylierung des Aminosäurerestes S₁₂₄₃ wesentlich für die Funktionsfähigkeit von TRPM3.



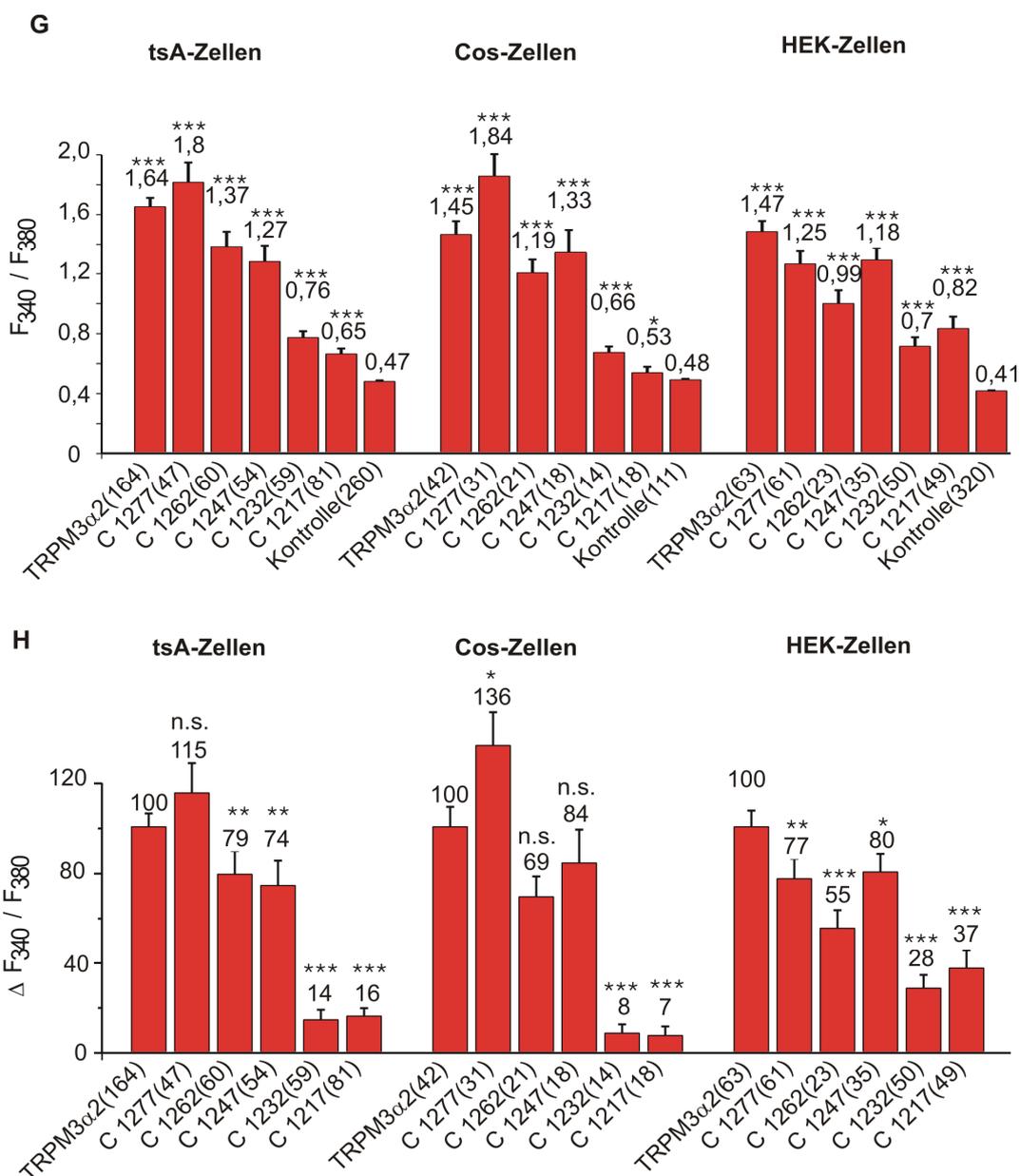


Abb. 16: Beteiligung der Coiled-Coil-Domäne am Ca²⁺-Einstrom

- A-F** Fura-2-Messung in HEK-tsA201-Zellen 48h nach Transfektion mit TRPM3α2, C1277, C1262, C1247, C1232, C1217 im Vergleich zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen der gleichen Messung nach Stimulation der Zellen mit 30μM Pregnenolononsulfat (PregS) in Ringerlösung 1Ca. Die Signale sind wiederholt auch nach vorübergehendem Entzug von Ca²⁺ in der Badlösung (0Ca) auslösbar.
- G** Statistische Zusammenfassung der maximalen (ersten) Ca²⁺-Signale in HEK-tsA201-, Cos- und HEK293-Zellen in Fura-2-Experimenten. Die Anzahl der analysierten Zellen und die Signifikanz der Unterschiede gegenüber der Kontrolle ist angegeben (*p<0,05, *** p<0,001)
- H** Gegenüberstellung der in Abbildung 16G gezeigten Ca²⁺-Signale nach Abzug der Ca²⁺-Signale der Kontrollzellen und normiert auf die Ca²⁺-Signale, die nach Transfektion von TRPM3α2 erhalten wurden. Die Signifikanz der Unterschiede gegenüber TRPM3α2 exprimierenden Zellen ist angegeben (*p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,001, n.s., nicht signifikant).

4.5.2 Funktionelle Analyse der Punktmutanten 3LnP

Um einen möglichen Beitrag einer Coiled-Coil-Struktur zur Bildung eines TRPM3-Kanals weiter zu analysieren, wurde die Mutante TRPM3 α 2-3LnP, welche nach Einführung von nur drei Punktmutationen kein Coiled-Coil zu bilden vermag (Tab. 10), vergleichend mit TRPM3 α 2 analysiert. Dazu wurden sowohl HEK-tsA201 als auch Cos-Zellen mit den in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Plasmiden transfiziert und mit Hilfe des ratiometrischen Calciumindikatorfarbstoffes Fura-2AM gemessen. (Kap. 3.9). Die Zellen wurden in Ringerlösung 1Ca perfundiert (Tab. 7) und durch Zugabe von 30 μ M Pregnenolonsulfat aktiviert. Die Abbildungen 17A-D zeigen beispielhaft das Ergebnis einer Fluoreszenzmessung von TRPM3 α 2 und der Mutante 3LnP in beiden Zelltypen. In Abbildung 17E und F ist die statistische Auswertung der durchgeführten Fluoreszenzmessungen dargestellt.

TRPM3 α 2-3LnP-exprimierende Zellen zeigen, in beiden Zelltypen im Vergleich zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen nach Pregnenolonsulfat-Stimulation ein deutliches, reversibles und wiederholbares Ca²⁺-Signal. Dies bestätigt die mit den Deletionsmutanten erhaltenen Ergebnisse (Kap. 4.5.1) und demonstriert erneut, dass die Gegenwart eines Coiled-Coils für die Bildung von TRPM3-Ionenkanälen nicht notwendig ist. Bei ähnlichem Expressionsniveau ist im Unterschied zum TRPM3 α 2-Protein jedoch auch bei der Mutante 3LnP eine signifikante Reduktion der Ca²⁺-Signale sowohl in HEK-tsA201-Zellen als auch in Cos-Zellen um 29-37% zu verzeichnen (Abb.17F). Dieser Funktionsverlust ist jedoch trotz des vollständigen Fehlens einer Coiled-Coil-Struktur in beiden Zelltypen moderat und ist deutlich geringer als der bei den Deletionsmutanten C1232 und C1217 beobachtete (Abb. 16H). Offensichtlich beeinflusst der Austausch der drei Aminosäuren die korrekte Proteinfaltung zwar negativ, jedoch ist dieser Einfluss weit geringer als beim vollständigen Fehlen dieses Aminosäureabschnittes.

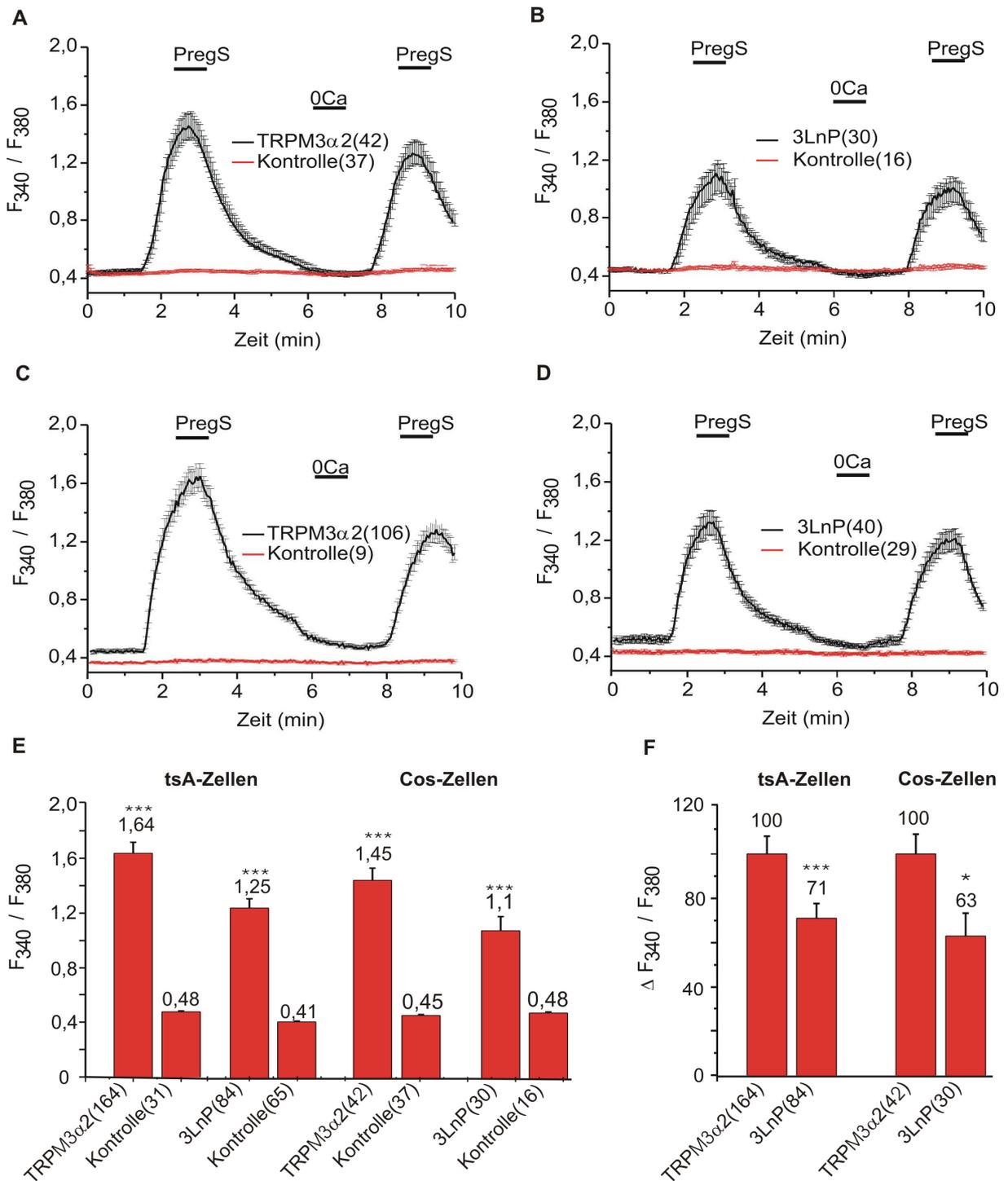


Abb. 17: Signifikante Reduktion des Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Signals in der untersuchten Mutante 3LnP im Vergleich zum Wildtyp-Protein TRPM3 α 2

A-B Fura2-Messung von TRPM3 α 2 und TRPM3 α 2-3LnP (3LnP) in Cos-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen der gleichen Messung nach Stimulation der Zellen in Ringerlösung 1Ca mit 30 μ M PregS.

C-D Fura2-Messung von TRPM3 α 2 und TRPM3 α 2-3LnP (3LnP) in HEK-tsA201-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten, benachbarten Kontrollzellen der gleichen Messung nach Stimulation der Zellen in Ringerlösung 1Ca mit 30 μ M PregS.

E Statistische Zusammenfassung der maximalen (ersten) Ca^{2+} -Signale in HEK-tsA201- und Cos-Zellen in Fura2-Experimenten. Die Anzahl der analysierten Zellen und die Signifikanz der Unterschiede gegenüber der Kontrolle sind angegeben (**** $p < 0,001$)

F Gegenüberstellung der in Abbildung 17E gezeigten Ca^{2+} -Signale nach Abzug der Ca^{2+} -Signale der Kontrollzellen und normiert auf die Ca^{2+} -Signale, die nach Transfektion von TRPM3 α 2 erhalten wurden. Die Signifikanz der Unterschiede gegenüber TRPM3 α 2 exprimierenden Zellen ist angegeben (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.5.3 Gegenwart der 3LnP Mutante an der Zelloberfläche

Um herauszufinden, ob der Funktionsverlust in den oben gezeigten Untersuchungen auf einer gestörten Lokalisation der Proteine in der Zelle beruht, wurden Biotinylierungsexperimente durchgeführt. Untersucht wurde die Präsenz der Mutanten 3LnP in der Plasmamembran. Ausgesucht wurde diese Mutante, da sie trotz einer niedrigen Coiled-Coil-Wahrscheinlichkeit (Abb. 12), immer noch ein signifikantes Ca^{2+} -Signal in den Fura-Messungen aufzeigt. Für die Biotinylierungsexperimente wurden HEK-tsA201-Zellen mit TRPM3 α 2 und 3LnP transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert waren, durch Inkubation in Gegenwart von NHS-Biotinestern mit Biotin markiert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, biotinylierte Proteine an Avidin-Agarose gebunden, gewaschen und mit Proteinauftragspuffer eluiert. Mit Hilfe von Anti-Myc-Antikörpern konnten TRPM3 α 2 und 3LnP in der an Avidin-Agarose gebundenen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 18). Als Kontrolle, ob auch intrazelluläre Proteine an Avidin-Agarose gebunden wurden, diente das Protein Calnexin. Calnexin ist ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, so dass es im Proteinlysate, jedoch nicht in der Avidin-gebundenen Fraktion nachweisbar sein sollte. Die relative Expression von 3LnP an der Zelloberfläche betrug nach Detektion mit den Anti-Myc-Antikörpern 0,17 (17 %) im Vergleich zu TRPM3 α 2. Die Experimente zeigen, dass die 3LnP Mutante in der Plasmamembran vorkommt, jedoch erscheint ihre Menge im Vergleich zu TRPM3 α 2 deutlich reduziert. Dies deutet daraufhin, dass eine intakte Coiled-Coil-Region für den Proteintransport, die exakte Lokalisation von TRPM3-Proteinen in die Plasmamembran und/oder Stabilität der TRPM3-Proteine wesentlich ist.

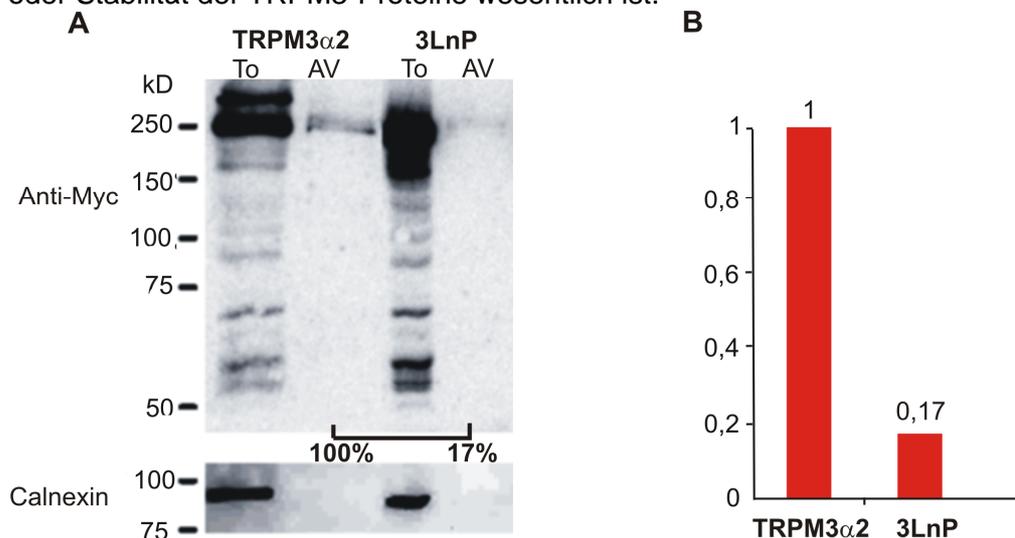


Abb. 18: Biotinylierung der Proteine TRPM3 α 2 und 3LnP an der Zelloberfläche

- A** 48h nach Transfektion mit MycTRPM3 α 2- pCAGGSM2/IRES-GFP oder Myc3LnP- pCAGGSM2/IRES-GFP wurden Oberflächenproteine biotinyliert und an Avidin-Agarose gebunden. 30 μ g Gesamtprotein vor Avidinbindung (To) und 1/3 der Avidin-gebundenen Fraktion (AV) wurden durch SDS-PAGE getrennt und im Westernblot untersucht. Zur Detektion wurde ein Anti-Myc-Antikörper eingesetzt. Zur Kontrolle wurde der Blot gestrippt und anschließend mit Anti-Calnexin-Antikörpern inkubiert.
- B** Densitometrische Analyse der in A gezeigten TRPM3-Signale. Diese Signale wurden mit Hilfe des Anti-Calnexin-Signals gewichtet und dann auf das nach Transfektion von MycTRPM3 α 2 pCAGGSM2/IRES-GFP erhaltene Signal normiert.

5 Diskussion

5.1 Beeinflussung des TRPM3-Kanals durch die TRP-Domäne

Spleißen von 18 Aminosäureresten im 967 Aminosäureresten umfassenden Aminoterminus von TRPM3 hat den vollständigen Funktionsverlust des Proteins zur Folge (Frühwald J., 2010). Dementsprechend führte die in dieser Arbeit beschriebene vollständige Entfernung des Aminoterminus zu einem funktionslosen Protein, das nicht auf die Stimulation mit Pregnenolonsulfat reagierte. Umgekehrt zeigten verschiedene Untersuchungen, dass ein im 492 Aminosäure langen Carboxyterminus um 382 Aminosäuren verkürztes Protein immer noch in der Lage ist als Kalziumkanal zu fungieren. (Grimm et al., 2003; Grimm et al., 2005; Oberwinkler und Phillipp, 2007; Naylor et al., 2008; Abb.19). Meine hier vorliegenden Experimente zeigen, dass nach Deletion der carboxyterminalen Aminosäuren 1125-1613 (TRPM3 Δ C) ein TRPM3-vermitteltes Ca^{2+} -Signal ausblieb (Kap. 4.1, Abb. 19A). Wurden jedoch in weiteren Experimenten nur die Aminosäuren 1218-1709 (C1217, Abb.19A) deletiert, konnte ein deutliches, TRPM3-vermitteltes Ca^{2+} -Signal nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass zwischen den Aminosäuren Serin₁₁₂₅ bis Aspartat₁₂₁₇ eine für die Funktion des TRPM3-Kanals wesentliche Domäne lokalisiert ist. Ein Vergleich dieser Aminosäuresequenz mit der „Prosite“-Datenbank (www.prosite.expasy.org), zeigte keine Verwandtschaft mit funktionellen Domänen anderer Proteine. Jedoch weisen die ersten 32 Aminosäuren eine hohe Ähnlichkeit zu homologen Sequenzabschnitten anderer TRP-Proteine auf (Abb. 19B). Dieser Bereich ist neben den Transmembrandomänen S1-S6 innerhalb der Familie der TRP-Familie am höchsten konserviert und als TRP-Domäne bekannt (Wu et al., 2010). Dieser Domäne wird im TRPM8- und TRPM5-Protein eine Bedeutung als Interaktionsstelle mit dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zugesprochen (Rohacs et al., 2005) und eine Modulation der Aktivität von TRPV1, TRPV5, TRPM4, TRPM5, TRPM7, TRPM8 durch PIP₂ konnte gezeigt werden (Rohacs und Nilius, 2007). So führten Mutationen im Bereich der TRP-Domäne von TRPM8 und TRPM5 zu einer erheblichen Abnahme der Sensitivität dieser Kanäle für PIP₂ (Rohacs et al., 2005). Vermutlich aktiviert der Ca^{2+} -Einstrom durch TRP-Ionenkanäle eine Ca^{2+} -sensitive Phospholipase C, die PIP₂ hydrolysiert und die Depletion von PIP₂ limitiert letztlich die Kanalaktivität. Über die genaue Funktion der TRP-Domäne im TRPM3-Protein ist bislang nichts bekannt. Die TRP-Domäne von TRP-Ionenkanälen wurde jedoch als generelles Motiv für alle Mitglieder der TRP-Familie postuliert (Rohacs, 2009). Die vorliegenden Daten unterstützen diese Hypothese und legen eine Beteiligung von PIP₂ als wesentlichen Regulator von TRPM3-Ionenkanälen nahe. Die Regulation von TRPM3 durch Phosphoinositide muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

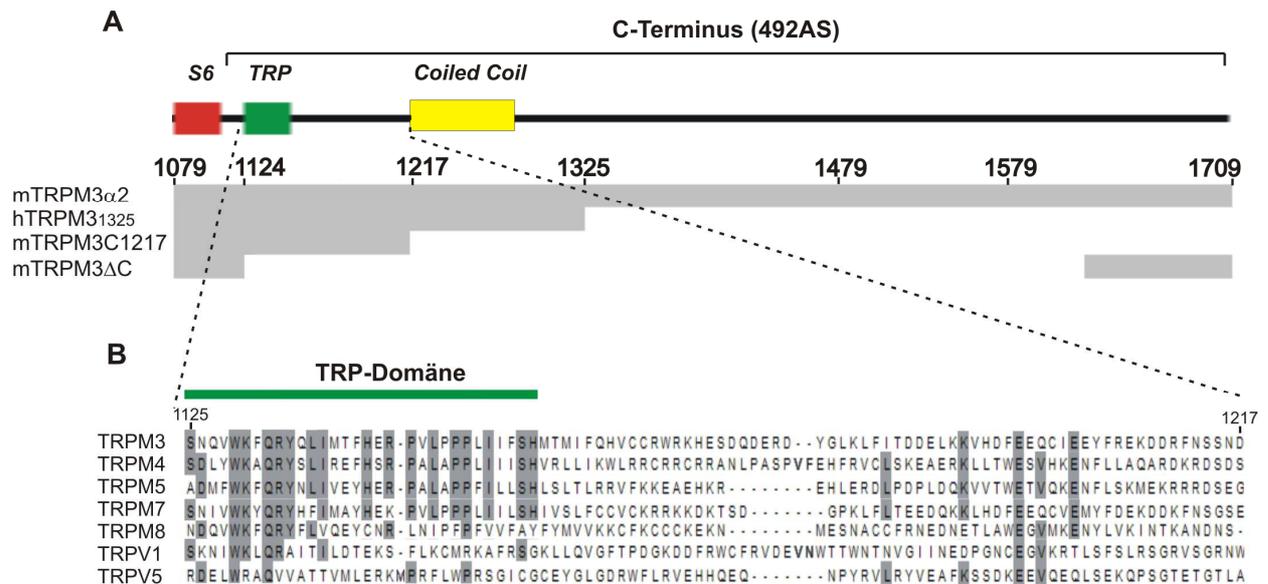


Abb. 19: Beteiligung der TRP-Domäne an der Modulation von TRPM3-Ionenkanälen

- A** Schematische Darstellung von TRPM3 α 2, hTRPM3₁₃₂₅, C1217 und TRPM3 Δ C (*graue Balken*). Der *obere Balken* zeigt die generelle Organisation des C-Terminus von TRPM3 (492 Aminosäuren). Die sechste Transmembranregion, die TRP-Domäne (TRP) und die Coiled-Coil Region (cc) sowie Nummerierung der Aminosäuren von TRPM3 α 2 sind gezeigt.
- B** Vergleich des Sequenzabschnittes zwischen den Aminosäuren S₁₁₂₅ und D₁₂₁₇ des TRPM3-Proteins mit den homologen Bereichen von TRPM4, TRPM5, TRPM7, TRPM8, TRPV1 und TRPV5. Hoch konservierte Aminosäuren (>50%) sind grau unterlegt. Der hohe Konservierungsgrad der TRP-Domäne (grün gekennzeichnet) ist offensichtlich.

5.2 Identifizierung der Coiled-Coil-Domäne im TRPM3-Protein

Innerhalb der TRP-Familie sind Coiled-Coil-Domänen ein häufig zu findendes Strukturmotiv (Montell, 2005). Charakteristisch für Coiled-Coils ist, dass sie aus mindestens zwei α -Helices bestehen, die entweder parallel oder antiparallel angeordnet und umeinander zu einem Supercoil gewunden sind (Abb. 4). Die Stabilisierung dieser Struktur erfolgt über die hydrophobe Wechselwirkung der Aminosäurereste an den Heptadenpositionen a und d (Burkhard et al., 2001; Arndt et al., 2002).

Mit Hilfe eines von Lupas entwickelten Algorithmus „Coils“ identifizierte ich im Rahmen dieser Dissertation eine Coiled-Coil-Domäne im C-Terminus von TRPM3 zwischen den Aminosäureresten 1215-1284. Das Programm „Coils“ vergleicht eine Proteinsequenz mit bekannten Coiled-Coil-Sequenzen und sucht in unterschiedlich langen Sequenzabschnitten eine für Coiled-Coils typische Heptadenstruktur. Eine vergleichende Analyse von Vorhersagemethoden bescheinigt „Coils“, die Verlässlichkeit der Vorhersage einer Coiled-Coil-Struktur (Gruber et al., 2006). Die so definierte Lokalisation eines Coiled-Coils im TRPM3-Protein konnte auch mit einem verbesserten Algorithmus „PCOILS“ sowie mit einem dritten Programm „Marcoil“, welches basierend auf den „hidden Markov Modell“ Coiled-Coil-Strukturen prognostiziert, bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte die größenausschlusschromatographische Trennung von Fusionsproteinen bestehend aus den

TRPM3-Aminosäureresten Arginin₁₂₂₁ bis Threonin₁₂₇₃ und einem modifizierten Maltosebindungsprotein (HMT), dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in silico* identifizierte Coiled-Coil-Region tatsächlich als Interaktionsstelle fungiert und zur Bildung tetramerer Proteinkomplexe führt (Tsuruda et al., 2006).

5.3 Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne für TRPM3-Ionenkanäle

Im Focus zurückliegender Untersuchungen zur Bedeutung von Coiled-Coil-Regionen für TRP-Ionenkanäle standen insbesondere TRPM8 (Erlar et al., 2006; Tsuruda et al., 2006; Phelps und Gaudet, 2007) und TRPM2 (Mei et al., 2006). Durch Deletion des gesamten Coiled-Coils oder durch gezielte Punktmutation in den für die Struktur entscheidenden Heptadenpositionen wurden Mutanten mit fehlender oder funktionsloser Coiled-Coil-Region hergestellt und nachfolgend mit dem Wildtypprotein verglichen.

TRPM8-Punktmutanten werden zwar stabil in der Zelle exprimiert (Erlar et al., 2006; Tsuruda et al., 2006) Oberflächenbiotinylierungsexperimente zeigten jedoch eine circa drei- bis viermal geringeren Gegenwart an der Plasmamembran im Vergleich zum Wildtypprotein (Erlar et al., 2006). Ihre Befähigung zur Wechselwirkung wurden durch Dichtegradientenzentrifugation (Erlar et al., 2006), Größenausschlusschromatographie (Tsuruda et al., 2006; Phelps und Gaudet, 2007), analytische Ultrazentrifugation (Tsuruda et al., 2006) sowie durch chemische Kreuzvernetzung und nachfolgendem Westernblot der assoziierten Proteine untersucht (Tsuruda et al., 2006). Die Untersuchungen von Erlar und Mitarbeitern (Erlar et al., 2006) und Tsuruda et al (Tsuruda et al., 2006) weisen übereinstimmend darauf hin, dass bei Fehlen oder Zerstörung des Coiled-Coils TRPM8-Proteine nicht mehr zur Assoziation in der Lage sind. Im Unterschied dazu zeigten Pentadecanfluorooctansäure-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (PFA-PAGE, Phelps und Gaudet, 2007), dass in SF9-Insektenzellen überexprimierte, Coiled-Coil-defiziente TRPM8-Proteine immer noch in der Lage sind, multimerer Komplexe zu bilden (Phelps und Gaudet, 2007). Diese Ergebnisse konnten durch größenausschlusschromatographische Untersuchungen bestätigt werden (Phelps und Gaudet, 2007), jedoch zeigten solche Kanalkomplexe vollständige Inaktivität nach Stimulation durch Kälte oder in der Gegenwart ihres Agonisten Menthol. Übereinstimmend zeigen alle Untersuchungen, dass nach Entfernung oder struktureller Veränderung des Coiled-Coils die Funktionsfähigkeit von TRPM8 vollständig gestört ist. Dementsprechend ist ein Coiled-Coil im Carboxyterminus von TRPM8-Proteinen essentiell für TRPM8-Kanäle, nämlich entweder als eine für die Kanalöffnung wesentliche Domäne (Phelps und Gaudet, 2007) oder als Schlüsselstruktur zur Assoziation des multimeren Kanalkomplexes (Erlar et al., 2006; Tsuruda et al., 2006) und es wurde postuliert, dass Coiled-Coils eine ähnliche Rolle bei allen TRPM-Kanälen spielen könnten (Tsuruda et al., 2006).

Meine Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine solche Bedeutung der Coiled-Coil-Struktur im TRPM3-Protein nicht zukommt. Trotz deutlicher Störung des Transportes zur Plasmamembran werden auch 3LnP-Proteine in die Plasmamembran eingebaut (Kap. 4.5.3, Abb. 18) und bilden dort funktionstüchtige TRPM3-Kanäle (Kap. 4.5.2, Abb. 17) und es ist davon auszugehen, dass auch sie tetramere Komplexe bilden. Im Unterschied zu TRPM8 ist die Coiled-Coil-Domäne im TRPM3 für eine korrekte Kanalassemblierung also nicht essentiell, sondern sie muss vielmehr als eine die Stabilität oder die Assemblierung fördernde Komponente betrachtet werden. Die von mir beobachtete Reduktion des TRPM3-Kanals in der Plasmamembran nach Zerstörung der Coiled-Coil-Domäne erklärt hinreichend die Verminderung des TRPM3 abhängigen Ca^{2+} -Signals. Umgekehrt ergibt die vorliegende Arbeit keinen Hinweis auf eine wesentliche Rolle der Coiled-Coil-Domäne bei der Kanalöffnung, wie sie für TRPM8 postuliert wurde (Phelps und Gaudet, 2007). Ich konnte vielmehr zeigen, dass auch Coiled-Coil-defiziente TRPM3-Proteine als funktionsfähige Ionenkanäle zur Bildung Pregnenolonsulfat-abhängiger Ca^{2+} -Signale in der Lage sind (Kap. 4.5.1, Abb 16).

Ebenso wie bei TRPM8 und TRPM3 führt die Deletion der Coiled-Coil-Region im TRPM2-Protein zu einer deutlichen Minderung der Proteinmenge in der Plasmamembran (Mei et al., 2006). Daneben konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Coiled-Coils auch eine schwere Störung der Wechselwirkung der Kanaluntereinheiten zur Folge hat. Da der Transport des mutierten Proteins vom Endoplasmatischen Retikulum zum trans-Golgi-Netzwerk unverändert schien, folgerten die Autoren, dass die Verminderung der Oberflächenexpression durch die mangelnde Interaktionsfähigkeit Coiled-Coil-defizienter TRPM2-Proteine verursacht sei und dass eine besondere Funktion des Coiled-Coils beim Proteintransport eher unwahrscheinlich ist. Meine Daten können nicht ausschließen, dass in ähnlicher Weise auch bei TRPM3 die verminderte Gegenwart an der Zelloberfläche mit einer gestörten Assemblierung der Kanaluntereinheiten in Verbindung steht. Es ist jedoch hervorzuheben, dass ähnlich wie bei TRPM2 (und im Unterschied zu TRPM8) auch nach Zerstörung der Coiled-Coil-Region funktionstüchtige Kanäle entstehen und somit andere Proteindomänen wesentlich für die korrekte Faltung und Kanalassemblierung sind. In Frage kommende Proteinabschnitte sind in erster Linie die Transmembrandomänen des Kanals, denn es konnte gezeigt werden, dass zur Assoziation von TRPM8-Proteinen die Transmembranregion ausreichend ist (Phelps und Gaudet, 2007).

6 Literaturverzeichnis

Altarescu,G., Sun,M., Moore,D.F., Smith,J.A., Wiggs,E.A., Solomon,B.I., Patronas,N.J., Frei,K.P., Gupta,S., Kaneski,C.R., Quarrell,O.W., Slaugenhaupt,S.A., Goldin,E., and Schiffmann,R. (2002). The neurogenetics of mucopolidosis type IV. *Neurology* 59, 306-313.

Arndt,K.M., Pelletier,J.N., Muller,K.M., Pluckthun,A., and Alber,T. (2002). Comparison of in vivo selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure*. 10, 1235-1248.

Barrera,N.P., Shaifta,Y., McFadzean,I., Ward,J.P., Henderson,R.M., and Edwardson,J.M. (2007). AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 1086-1090.

Bassi,M.T., Manzoni,M., Monti,E., Pizzo,M.T., Ballabio,A., and Borsani,G. (2000). Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am J. Hum. Genet.* 67, 1110-1120.

Bullock,W.O.,Fernandez,J.M.,Short, J.M. (1987):XL1 Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection.*Bio Techniques*, 5, 376-378.

Burkhard,P., Stetefeld,J., and Strelkov,S.V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82-88.

Cahalan,M.D. (2001). Cell biology. Channels as enzymes. *Nature* 411, 542-543.

Caterina,M.J., Leffler,A., Malmberg,A.B., Martin,W.J., Trafton,J., Petersen-Zeit,K.R., Koltzenburg,M., Basbaum,A.I., and Julius,D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

Chung,C.T., Niemela,S.L., and Miller,R.H. (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, 2172-2175.

Clapham,D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.

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

Erler,I., Al Ansary,D.M., Wissenbach,U., Wagner,T.F., Flockerzi,V., and Niemeyer,B.A. (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J. Biol. Chem.* 281, 38396-38404.

Erler,I., Hirnet,D., Wissenbach,U., Flockerzi,V., and Niemeyer,B.A. (2004). Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.* 279, 34456-34463.

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, 7858-7861.

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

- Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kessel, R.E., and McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **26**, 159-178.
- Frühwald J. Identifizierung und Charakterisierung funktionell bedeutender Proteindomänen in TRPM3-Steroidrezeptoren . 10-10-2010. medizinische Universität des Saarlandes.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A.K., Weigle, B., Kiessling, A., and Wirth, M.P. (2003). Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int. J. Oncol.* **23**, 221-228.
- Goel, M., Sinkins, W.G., and Schilling, W.P. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol Chem.* **277**, 48303-48310.
- Grimm, C.M., 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**, 21493-21501.
- Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., and Harteneck, C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol. Pharmacol.* **67**, 798-805.
- Gruber, M., Soding, J., and Lupas, A.N. (2006). Comparative analysis of coiled-coil prediction methods. *J. Struct. Biol.* **155**, 140-145.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol Chem.* **260**, 3440-3450.
- Gudermann, T. and Flockerzi, V. (2005). TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **371**, 241-244.
- Gunasekaran, K., Nagarajaram, H.A., Ramakrishnan, C., and Balaram, P. (1998). Stereochemical punctuation marks in protein structures: glycine and proline containing helix stop signals. *J. Mol. Biol.* **275**, 917-932.
- Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., and Bindels, R.J. (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* **22**, 776-785.
- Hoffmann, A., Grimm, C., Kraft, R., Goldbaum, O., Wrede, A., Nolte, C., Hanisch, U.K., Richter-Landsberg, C., Bruck, W., Kettenmann, H., and Harteneck, C. (2010). TRPM3 is expressed in sphingosine-responsive myelinating oligodendrocytes. *J. Neurochem.*
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7461-7466.
- Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.* **13**, 1153-1158.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Hsu, Y.J., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. (2007). TRP channels in kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 928-936.

- Humphray,S.J., Oliver,K., Hunt,A.R., Plumb,R.W., Loveland,J.E., Howe,K.L., Andrews,T.D., Searle,S., Hunt,S.E., Scott,C.E., et al. (2004). DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature*. 429, 369-374.
- Jenke,M., Sanchez,A., Monje,F., Stuhmer,W., Weseloh,R.M., and Pardo,L.A. (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J*. 22, 395-403.
- Kiselyov,K., Soyombo,A., and Muallem,S. (2007). TRPpathies. *J. Physiol* 578, 641-653.
- Kishimoto,A., Nishiyama,K., Nakanishi,H., Uratsuji,Y., Nomura,H., Takeyama,Y., and Nishizuka,Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260, 12492-12499.
- Kobori,T., Smith,G.D., Sandford,R., and Edwardson,J.M. (2009). The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement. *J. Biol. Chem.* 284, 35507-35513.
- 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.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Launay,P., Fleig,A., Perraud,A.L., Scharenberg,A.M., Penner,R., and Kinet,J.P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397-407.
- Lee,N., Chen,J., Wu,S., Sun,L., Huang,M., Levesque,P.C., Rich,A., Feder,J.N., Gray,K.R., Lin,J.H., Janovitz,E.B., and Blonar,M.A. (2003). Expression and characterization of human Transient Receptor Potential Melastatin 3 (hTRPM3). *J. Biol. Chem.* 278, 20890-20897.
- Lis,A., Wissenbach,U., and Philipp,S.E. (2005). Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371, 315-324.
- Lupas,A., Van,D.M., and Stock,J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Lupas,A. (1996). Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 266, 513-525.
- Mannebach, S. Untersuchung von TRPM3-Kationkanälen mit Hilfe von Knock-down und Knock-out- Methoden. 20-5-2008. Naturwissenschaftlich Technische Fakultät III der Universität des Saarlandes.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Mason,J.M. and Arndt,K.M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem.* 5, 170-176.
- Mason,J.M., Muller,K.M., and Arndt,K.M. (2007). Considerations in the design and optimization of coiled coil structures. *Methods Mol. Biol.* 352, 35-70.

- Mei,Z.Z., Xia,R., Beech,D.J., 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*, 38748-38756.
- Mohler,P.J., Gramolini,A.O., and Bennett,V. (2002). Ankyrins. *J. Cell Sci.* *115*, 1565-1566.
- Montell,C. and Rubin,G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* *2*, 1313-1323.
- Montell,C., Birnbaumer,L., and Flockerzi,V. (2002a). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* *108*, 595-598.
- Montell,C., Birnbaumer,L., Flockerzi,V., Bindels,R.J., Bruford,E.A., Caterina,M.J., Clapham,D.E., Harteneck,C., Heller,S., Julius,D., Kojima,I., Mori,Y., Penner,R., Prawitt,D., Scharenberg,A.M., Schultz,G., Shimizu,N., and Zhu,M.X. (2002b). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* *9*, 229-231.
- Montell,C. (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE.* *2005*, re3.
- Nadler,M.J., Hermosura,M.C., Inabe,K., Perraud,A.L., Zhu,Q., Stokes,A.J., Kurosaki,T., Kinet,J.P., Penner,R., Scharenberg,A.M., and Fleig,A. (2001). LTRPC7 is a MgATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* *411*, 590-595.
- Naylor,J., Milligan,C.J., Zeng,F., Jones,C., and Beech,D.J. (2008). Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br. J. Pharmacol.* *155*, 567-573.
- Naylor,J., Li,J., Milligan,C.J., Zeng,F., Sukumar,P., Hou,B., Sedo,A., Yuldasheva,N., Majeed,Y., Beri,D., Jiang,S., Seymour,V.A., McKeown,L., Kumar,B., Harteneck,C., O'Regan,D., Wheatcroft,S.B., Kearney,M.T., Jones,C., Porter,K.E., and Beech,D.J. (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ. Res.* *106*, 1507-1515.
- Niwa,H., Yamamura,K., and Miyazaki,J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193-199.
- Numaguchi,H., Johnson,J.P., Jr., Petersen,C.I., and Balsler,J.R. (2000). A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current. *Nat. Neurosci.* *3*, 429-430.
- Oberwinkler,J., Lis,A., Giehl,K.M., Flockerzi,V., and Philipp,S.E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 22540-22548.
- Oberwinkler,J. (2007). TRPM3, a biophysical enigma? *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 89-90.
- Oberwinkler,J. and Philipp,S.E. (2007). TRPM3. *Handb. Exp. Pharmacol.* 253-267.
- Perraud,A.L., Fleig,A., Dunn,C.A., Bagley,L.A., Launay,P., Schmitz,C., Stokes,A.J., Zhu,Q., Bessman,M.J., Penner,R., Kinet,J.P., and Scharenberg,A.M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* *411*, 595-599.
- Phelps,C.B. and Gaudet,R. (2007). The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *J. Biol. Chem.* *282*, 36474-36480.
- Philipp, S.E., Lis, A., and Oberwinkler, J. (2006). Functional diversity of TRPM3 cation channel is generated by splicing and heterooligomeric channel assembly. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, *372* Suppl.1:R202

- Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P.L., Clapham, D.E., and Pollak, M.R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat. Genet.* **37**, 739-744.
- Rohacs, T., Lopes, C.M., Michailidis, I., and Logothetis, D.E. (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* **8**, 626-634.
- Rohacs, T. and Nilius, B. (2007). Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch.*
- Rohacs, T. (2009). Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell Calcium.* **45**, 554-565.
- Runnels, L.W., Yue, L., and Clapham, D.E. (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043-1047.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2001). Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science* **293**, 1327-1330.
- Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann, N.L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W., 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**, 166-170.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Staaf, S., Franck, M.C., Marmigere, F., Mattsson, J.P., and Ernfors, P. (2010). Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expr. Patterns.* **10**, 65-74.
- Stewart, A.P., Egressy, K., Lim, A., and Edwardson, J.M. (2010). AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPM8 channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 383-386.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem.* **278**, 39014-39019.
- Tsavaler, L., Shapero, M.H., 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**, 3760-3769.
- Tsuruda, P.R., Julius, D., and Minor, D.L., Jr. (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* **51**, 201-212.

- Venkatachalam,K. and Montell,C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387-417.
- Voets,T., Janssens,A., Droogmans,G., and Nilius,B. (2004). Outer pore architecture of a Ca^{2+} -selective TRP channel. *J. Biol. Chem.* 279, 15223-15230.
- Vriens,J., Owsianik,G., Hofmann,T., Philipp,S.E., Stab,J., Chen,X., Benoit,M., Xue,F., Janssens,A., Kerselaers,S., Oberwinkler,J., Vennekens,R., Gudermann,T., Nilius,B., and Voets,T. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482-494.
- Wagner,T.F., Loch,S., Lambert,S., Straub,I., Mannebach,S., Mathar,I., Dufer,M., Lis,A., Flockerzi,V., Philipp,S.E., and Oberwinkler,J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 1421-1430.
- Walder,R.Y., Landau,D., Meyer,P., Shalev,H., Tsohia,M., Borochoowitz,Z., Boettger,M.B., Beck,G.E., Englehardt,R.K., Carmi,R., and Sheffield,V.C. (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* 31, 171-174.
- Warnat,J., Philipp,S., Zimmer,S., Flockerzi,V., and Cavalié,A. (1999). Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca^{2+} . *J. Physiol. (Lond.)* 518, 631-638.
- Watson,J.D. and Crick,F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Winn,M.P., Conlon,P.J., Lynn,K.L., Farrington,M.K., Creazzo,T., Hawkins,A.F., Daskalakis,N., Kwan,S.Y., Ebersviller,S., Burchette,J.L., Pericak-Vance,M.A., Howell,D.N., Vance,J.M., and Rosenberg,P.B. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308, 1801-1804.
- Wischmeyer,E., Lentjes,K.U., and Karschin,A. (1995). Physiological and molecular characterization of an IRK-type inward rectifier K^+ channel in a tumour mast cell line. *Pfluegers Arch.* 429, 809-819.
- Wissenbach,U., Niemeyer,B.A., Fixemer,T., Schneidewind,A., Trost,C., Cavalié,A., Reus,K., Meese,E., Bonkhoff,H., and Flockerzi,V. (2001). Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J. Biol Chem.* 276, 19461-19468.
- Wissenbach,U., Niemeyer,B., Himmerkus,N., Fixemer,T., Bonkhoff,H., and Flockerzi,V. (2004). TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca^{2+} channel expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1359-1363.
- Wu,L.J., Sweet,T.B., and Clapham,D.E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381-404.
- Xu,X.Z., Li,H.S., Guggino,W.B., and Montell,C. (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89, 1155-1164.
- Zhang,L. and Barritt,G.J. (2006). TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr. Relat Cancer* 13, 27-38.

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes unter Leitung von Priv. Doz. Dr. Stephan Philipp angefertigt. Bei ihm bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente sowie bei der Erstellung der Dissertation. Er hat mir mit konstruktiver Kritik und vielen neuen Ideen auch in schwierigen Zeiten immer wieder die nötige Motivation gegeben.

Herrn Prof. Flockerzi danke ich für Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Bei Dr. Julia Frühwald und Dr. Stefanie Mannebach bedanke ich mich für die Unterstützung und für die vielen Erklärungen auch außerhalb des Laboralltags.

Desweiteren danke ich Heidi Löhr, Ute Soltek und Martin Simon-Thomas für ihre Hilfe.

Ein ganz besonderer Dank für die Unterstützung geht an meine Eltern, meinen Mann und an meine Schwester. Ohne deren Motivation und Verständnis wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.