

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Signalverarbeitung auf der zellulären und molekularen Ebene: Pankreatische β -Zellen und TRPM3-Kanalproteine

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
2018



vorgelegt von

Andrea

Christina Lesch

geboren am 23.03.1986 in Saarlouis

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Thiel

Prof. Dr. F. Schmitz

Prüfungsvorsitzender:

Akademischer Mitarbeiter:

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe dieser gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Andrea Lesch

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

*Meinen Eltern
& Großeltern*

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	1
Abkürzungen.....	1
Zusammenfassung	4
Summary.....	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Die Bedeutung der Signaltransduktion für die Zelle	6
1.2 Der TRPM3-Kanal	6
1.3 Pregnenolonsulfat-induzierte Transkriptionsfaktoren	10
1.3.1 Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1	11
1.3.2 Basische Leuzinzipper (bZIP) Proteine.....	12
1.3.2.1 Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1).....	12
1.3.3 Der Ternäre Komplexfaktor Elk-1.....	15
1.3.3.1 Die Funktion von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen	17
1.4 Zielsetzung	18
2 Material & Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien und Feinchemikalien	22
2.1.4 Kits	26
2.1.5 Verwendete Vektoren und Plasmide.....	26
2.1.5.1 Lentivirale Reporterplasmide.....	28
2.1.5.2 Lentivirale Expressionsplasmide	29
2.1.6 Zelllinien.....	32

2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur.....	33
2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	33
2.2.1.2 Auftauen von Säugerzellen	34
2.2.1.3 Passagieren von Säugerzellen.....	34
2.2.1.4 Einfrieren von Säugerzellen	34
2.2.2 Das TREX TM -System	35
2.2.3 Verwendete Antikörper zum Nachweis von Proteinen	36
2.2.4 Primer.....	37
2.2.5 Arbeiten mit RNA	39
2.2.5.1 RNA-Isolierung aus Säugerzellen	39
2.2.5.2 Messung der RNA-Konzentration.....	39
2.2.5.3 cDNA-Synthese	40
2.2.6 Arbeiten mit DNA	40
2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR.....	40
2.2.6.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.6.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation... 42	
2.2.6.4 Transformation von Plasmiden in E.coli	43
2.2.6.5 Produktion und Isolierung von Plasmid-DNA (Maxiprep)	43
2.2.6.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli (Miniprep)	44
2.2.6.7 Restriktionsverdau von DNA	45
2.2.7 Lentiviraler Gentransfer in eukaryotische Zellen.....	45
2.2.7.1 Herstellung von Lentiviren	45
2.2.7.2 Lentivirale Infektion von Säugerzellen.....	46
2.2.7.3 Reporteranalyse	47
2.2.8 Proteinbiochemische Methoden.....	49

2.2.8.1	Ernte der Zellen	49
2.2.8.2	Extraktion von Kernproteinen	49
2.2.8.3	Extraktion von Zytoplasmaproteinen	50
2.2.8.4	Proteinbestimmung.....	50
2.2.8.5	Denaturierende diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	51
2.2.8.6	Western Blot Analyse	52
2.2.8.7	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen.....	53
2.2.8.8	X-Gal-Färbung.....	54
2.2.9	In vivo-Analyse Maus: Charakterisierung des transgenen Mausmodells RIP-rtTA[tetO] ₇ REST-Elk-1ΔC	55
2.2.9.1	Maushaltung	55
2.2.9.2	Mausmodell: Das Tetrazyklin System	55
2.2.9.3	Generierung doppelt-transgener RIP-rtTA[tetO] ₇ REST-Elk-1ΔC	56
2.2.9.4	Genotypisierung	57
2.2.9.5	Dissektion des Pankreas und Isolierung von Inseln	57
2.2.9.6	Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	59
2.2.9.7	Histologie.....	59
2.2.9.8	Bestimmung der β-Zellfläche.....	60
2.2.9.9	Statistik	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Untersuchung der Signalkaskade und der aktivierten Transkriptionsfaktoren nach Pregnenolonsulfat-Stimulation des TRPM3-Kanals.	62
3.1.1	Das HEK293/TRPM3-Zellsystem.....	62
3.1.2	Reportergene dienen als Sensoren zur Messung der AP-1-und Egr-1- Aktivität	63
3.1.3	Das TRE innerhalb des Kollagenase-Promotors dient als Sensor der AP- 1-Aktivität.....	65

3.1.4	Die TRPM3-Stimulation erhöht die Biosynthese von c-Fos und c-Jun ...	66
3.1.5	Das TRPM3-exprimierende Zellsystem HEK293 ist induzierbar und funktional	67
3.1.6	Agonisten und Antagonisten von TRPM3	71
3.1.6.1	Die Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat induziert die AP-1- und Egr-1-regulierte Genexpression	72
3.1.6.2	Der Effekt von Nifedipin und D-Erythrosphingosin auf TRPM3-vermittelte Gentranskription	74
3.1.6.3	Pregnenolon und Progesteron beeinflussen die TRPM3-induzierte Aktivierung von AP-1	77
3.1.6.4	Mefenaminsäure inhibiert die TRPM3-regulierte Gentranskription ...	79
3.1.6.5	Rosiglitazone beeinträchtigen die AP-1-, aber nicht die Egr-1-Aktivität, nach Stimulation des TRPM3-Kanals	80
3.1.6.6	Der Einfluss der Polyphenole Naringenin und Quercetin auf die AP-1 und Egr-1-Aktivität	82
3.1.6.7	Die TRPM3-regulierte Aktivierung von AP-1 und Egr-1 wird durch BD1047 geblockt	83
3.1.7	Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 , Egr-1 und Elk-1 durch Pregnenolonsulfat benötigt TRPM3-Kanäle	85
3.1.7.1	Die Expression des TRPM3-Kanals ist notwendig für die Pregnenolonsulfat-vermittelte Aktivierung von AP-1	85
3.1.8	Ca ²⁺ ist der essentielle sekundäre Botenstoff bei der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von TRPM3	86
3.1.8.1	Die Steigerung der AP-1 Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen benötigt eine erhöhte Konzentration intrazellulärer Ca ²⁺ -Ionen	87
3.1.8.2	Die Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin A-Mutante verringert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1	91

3.1.8.3 Die Expression von Calcineurin B verringert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1	93
3.1.9 Der ERK-Signalweg dient zur Signalübertragung bei der TRPM3-vermittelten Transkription	95
3.1.9.1 Die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat induziert die Aktivierung von ERK1/2	95
3.1.9.2 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2 -Signalweges reduziert die AP-1-Aktivität in HEK293/TRPM3-Zellen	96
3.1.9.3 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2 -Signalweges blockt die Biosynthese von c-Jun in HEK293/TRPM3-Zellen.....	97
3.1.9.4 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2-Signalweges blockt ebenfalls die c-Fos-Promotoraktivität in HEK293/TRPM3-Zellen	98
3.1.9.5 Die Expression einer spezifischen shRNA gegen ERK verringert die AP-1 Aktivität nach Stimulation von HEK293 Δ BRAF:ER-Zellen mit 4-OHT	99
3.1.9.6 Die Inhibierung der ERK1/2-Expression vermindert die PregS-induzierte Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen.....	101
3.1.9.7 Die Proteinphosphatase MKP-1 interferiert mit der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation des TRPM3 Kanals in HEK293/TRPM3-Zellen	103
3.1.9.8 Die Expression von MKP-5 interferiert mit der TRPM3-induzierten Aktivierung von AP-1.....	104
3.1.10 Der JNK-Signalweg dient ebenfalls als Vermittler AP-1 regulierter Genexpression nach PregS-Stimulation des TRPM3.....	105
3.1.10.1 Die pharmakologische Inhibierung des JNK-Signalweges durch den JNK-Inhibitor SP600125 reduziert die Aktivierung von AP-1 nach TRPM3-Stimulation	106
3.1.10.2 Die Expression JNK-spezifischer shRNAs inhibiert die AP-1-Aktivität nach TRPM3-Stimulation.....	107
3.1.11 Die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung der Transkription in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen bedarf der Aktivierung von AP-1	108

3.1.11.1	Die dominant-negative Mutante c-Jun Δ N blockiert die Aktivierung von AP-1 durch MEKK1 und MKK6	108
3.1.11.2	c-Jun ist für die Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen erforderlich	109
3.1.11.3	Die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des TRPM3 Kanals induziert ein verstärktes transkriptionelles Aktivierungspotential von ATF2 .	112
3.1.11.4	Die dominant-negative Mutante ATF2 Δ N blockiert die Aktivierung von AP-1 durch MEKK1 und MKK6	113
3.1.11.5	ATF2 ist für die Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen erforderlich	114
3.1.11.6	Pregnenolonsulfat erhöht das transkriptionelle Aktivierungspotential des ternären Komplexfaktors Elk-1 in HEK293/TRPM3 Zellen.....	117
3.1.11.7	Die Hemmung ternärer Komplexfaktoren verhindert die Aktivierung von AP-1 in TRPM3 exprimierenden HEK293 Zellen	119
3.2	Die Funktion Stimulus-reponsiver Transkriptionsfaktoren in β -Zellen	122
3.2.1	Verwendung von transgenen REST/Elk-1 Δ C-Mäusen.....	122
3.2.2	Generierung von doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO] ₇ REST/Elk-1 Δ C Mäusen	124
3.2.3	Doxyzyklin-abhängige Expression der dominant-negativen Transkriptionsfaktormutante REST/Elk-1 Δ C in pankreatischen β -Zellen	127
3.2.4	Die Expression von REST/Elk-1 Δ C in RIP-rtTA/[tetO] ₇ REST/Elk-1 Δ C - Mäusen führt zu einem diabetischen Phänotyp.....	129
3.2.5	Verringerte Inselgröße in REST/Elk-1 Δ C-exprimierenden Mäusen	130
4	Diskussion	132
4.1	Der TRPM3-Kanal	132
4.1.1	Die Pharmakologie des TRPM3-Kanals.....	132
4.1.2	Die Pregnenolonsulfat-induzierte Signaltransduktion in HEK293/TRPM3-Zellen	137

4.1.2.1 Die zentrale Rolle von Ca ²⁺ -Ionen als Botenstoff bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Gentranskription	137
4.1.2.2 Die TRPM3-Aktivierung induziert ERK	139
4.1.2.3 Die TRPM3-Aktivierung induziert JNK.....	140
4.1.2.4 Die Aktivierung von TRPM3 induziert die Phosphatasen Calcineurin und MKP-1	141
4.1.2.5 Die Aktivierung Stimulus-responsiver Transkriptionsfaktoren durch TRPM3	143
4.2 Das Mausmodell zur Analyse der Funktion von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen.....	148
4.2.1 Elk-1 in pankreatischen β -Zellen.....	149
4.2.2 Die Rolle von Elk-1 in der Regulation des Blutglukosespiegels und der Größe der pankreatischen Inseln	149
Literaturverzeichnis.....	152
Publikationen	173
Poster.....	174
Danksagung.....	175

Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethyl-diphenylborinat
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Abb	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
A. dest.	Aqua destillatum
BAPTA AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
BIS III	Bisindolylmaleimid III
bZIP	"basic region leucin zipper"
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium Ion
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
CNO	Clozapin-N-oxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
coll	Kollagenase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	"enhanced green fluorescence protein"
Egr	"early growth response factor"
EGTA	"extracellular signal-regulated"
ERK	"extracellular signal-regulated protein kinase"
EtOH	Ethanol
FCS	"fetal calf serum"
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd -3 -Phosphat -Dehydrogenase
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HBSS	"Hank´s balanced salt solution"
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
IPGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	„lysogeny broth“-Medium
LTR	"long terminal repeat"
lu	„light units“
M	Molar
mA	Milliampere
Mef	Mefenaminsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
Nar	Naringenin
NES	"nuclear export signal"
ng	Nanogramm
NLS	"nucler localisation signal"
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	„Point accepted mutation“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdx-1	"pancreatic duodenum homeobox-1"
Preg	Pregnenolon
PregS	Pregnenolonsulfat
Prog	Progesteron
Quer	Quercetin
RIP	Ratten-InsulinII-Promotor
RNA	Ribonukleinsäure
Rosi	Rosiglitazone

rpm	"round per minute"
REST	"RE-1 silencing transcription factor"
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SPH	D-Erythrosphingosin
SV 40	Simian Virus 40
TBS	„tris buffered saline“
TBST	„tris buffered saline“ + Tween 20
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TetO	Tetrazyklin Operon
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsives Element
TRP	"Transient receptor potential"
U	"Unit"
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
WPRE	"woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element"
wt	Wildtyp
x g	x Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

TRPM3-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle für Na⁺- und Ca²⁺-Ionen. Durch die Aktivierung des TRPM3-Kanals durch Pregnenolonsulfat kommt es zu einem verstärkten Ca²⁺-Einstrom ins Zellinnere. Dadurch werden Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren aktiviert. Bisherige Aktivitätstests von TRPM3 verwendeten die Messung des Ca²⁺-Einstroms ins Zellinnere. In dieser Arbeit wurde die TRPM3-regulierte Genexpression als Messsystem verwendet. Dabei wurde die Mefenaminsäure als effektivster Inhibitor TRPM3-induzierter Genregulation identifiziert. Desweiteren wurde die Signalkaskade entschlüsselt, die den TRPM3-Kanal mit der Genregulation verknüpft. Dabei sind sowohl extra-als auch intrazelluläre Ca²⁺-Ionen essentiell zur TRPM3-initiierten Signaltransduktion. Die Proteinkinasen ERK und JNK wurden als Signalüberträger identifiziert. Die Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 aktivierte die Transkriptionsfaktoren Egr-1, AP-1, ATF2, c-Jun, c-Fos und Elk-1. Die Expression der Proteinphosphatasen MKP-1 und Calcineurin inaktivierte die TRPM3-vermittelte Signaltransduktion. MKP-1 und Calcineurin sind somit Bestandteil eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Als zentrale Signalmoleküle von AP-1-aktivierter Genexpression wurden das TRE und das SRE identifiziert. Damit wurde die gesamte Signaltransduktion und Genregulation von TRPM3 aufgeklärt.

Weiterhin wurde die Funktion von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen untersucht. Bisher war bekannt, dass Elk-1 durch Glukose aktiviert wird. Elk-1 fungiert als ein zentrales Signalmolekül, weil es AP-1 und SRE aktiviert. Um die Funktion von von Elk-1 *in vivo* zu entschlüsseln wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das die dominant-negative Form von Elk-1: REST/Elk-1 Δ C in den β -Zellen exprimiert. Die Analyse durch intraperitoneale Glukosetoleranz-Tests stellte heraus, dass die Mäuse hyperglykämische Blutglukosewerte zeigen. Außerdem wurde eine verringerte Größe der Inseln festgestellt, wodurch sich der diabetische Phänotyp erklären lässt.

Summary

TRPM3-channels are non-selective cation channels, permeable for Na⁺-and Ca²⁺-ions. TRPM3-activation via Pregnenolonesulfate leads to an enhanced Ca²⁺-influx into the cells which results in activation of stimulus-responsive transcription factors. Previous studies used the measurement of TRPM3-induced Ca²⁺-influx to analyze TRPM3 activation. In this work, the TRPM3-regulated gene expression is used as a measuring system to analyze TRPM3 activation. Mefenamic acid has been identified to be the most efficient inhibitor in TRPM3-induced gene regulation. In addition, the signaling cascade connecting TRPM3-activation with enhanced gene regulation, has been revealed. In this process, both extra-and intracellular Ca²⁺-ions are essential to induce TRPM3-initiated signaling transduction. The protein kinases ERK and JNK have been identified as signal transducers. Pregnenolonsulfate-stimulation of TRPM3 activates the transcription factors Egr-1, AP-1, Elk-1 and ATF2, c-Jun and c-Fos. Expression of the protein phosphatases MKP-1 and Calcineurin inactivate TRPM3-induced signal transduction. Therefore, MKP-1 and Calcineurin are part of a negative feedback mechanism. As a key target of AP-1-induced gene expression the TRE and SRE have been identified. Hence, the TRPM3-induced signaling pathway and gene regulation has been completely clarified.

Furthermore, the function of Elk-1 in pancreatic β -cells has been analyzed. It is known, that Elk-1 is activated via glucose. Elk-1 functions as a component in activating AP-1 and SRE. To analyze the Elk-1-functions *in vivo*, a transgenic mouse model was generated, that expresses the dominant-negative form of Elk-1; termed REST/Elk-1 Δ C; in pancreatic β -cells. Analysis of intraperitoneal glucose tolerance tests revealed that the mice show hyperglycemic blood glucose levels. Further on, a significantly reduced islet size was determined, which explains the diabetic phenotype.

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Signaltransduktion für die Zelle

Eukaryotische Zellen in einem multizellulären Organismus müssen sich fortlaufend an Änderungen der Umwelt anpassen können, um ihr Überleben zu sichern. Die zelluläre Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen und Zelltypen ist essentiell und für fast alle Aspekte eukaryotischer Zellfunktionen und muss daher präzise abgestimmt und koordiniert werden. Extrazelluläre Reize werden durch Botenstoffe in intrazelluläre Signale umgewandelt, die die Anpassung der Zelle an Veränderungen ermöglicht. Durch extrazelluläre Signalmoleküle wie Liganden, Hormone, Neurotransmitter und Zytokine wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die durch Bildung von sekundären Botenstoffen zusätzlich zur Verstärkung und Weiterleitung des Signals und letztlich zu einer zellulären Antwort auf der Ebene der Gentranskription führt (Brivanlou und Darnell 2012, Li 2005). Im Laufe der Evolution stellten sich neben Phosphationen, cAMP und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) freie Kalzium-Ionen als die wahrscheinlich wichtigsten sekundären Botenstoffen zur Signalübertragung heraus.

1.2 Der TRPM3-Kanal

Transient Rezeptor Potential (TRP)-Kanäle werden in fast allen Geweben exprimiert, wo ihnen diversen Funktionen zukommen. Nach Aktivierung durch vielzählige unterschiedliche Liganden sind sie permeabel für diverse Kationen. Die Nomenklatur dieser Proteine richtet sich nach Alexander et al. 2013.

Der TRPM3-Kanal ist ein konstitutiv aktiver, nichtselektiver Ionenkanal, der permeabel für Ca^{2+} und andere divalente Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} ist. Die Permeabilität und Selektivität hängt von der Spleißvariante ab (Owsianik et al. 2006). Aufgrund von alternativem Spleißen kodiert das TRPM3 Gen für viele transkriptionelle Varianten von TRPM3, die sich in Ionenpermeabilität und -selektivität unterscheiden (Oberwinkler et al. 2005, Frühwald et al. 2012). TRPM3 α 2 ist hochpermeabel für Ca^{2+} und Mg^{2+} , und wird durch Na^+ inhibiert. Für die Spleißform TRPM3 α 1 ist beides nicht der Fall (Oberwinkler et al. 2005).

Aufbau und Funktion

Der TRPM3-Kanal besitzt die kennzeichnenden Merkmale, die für alle TRP-Kanäle üblich sind. Er besteht aus sechs membrandurchspannenden Domänen, wobei zwischen der fünften und sechsten Domäne eine hydrophobe, ionendurchlässige Pore gebildet wird. Sowohl der N-als auch der C-Terminus befinden sich auf der zytosolischen Seite. Ein funktionaler TRPM3-Kanal wird aus einem Homotetramer oder einem Heterotetramer mit TRPM1 aufgrund hoher struktureller Ähnlichkeit (Lambert et al. 2011) gebildet, das in der Architektur einem spannungsabhängigen Kaliumkanal gleicht (Flockerzi 2007, Kalia 2013, Watanabe et al. 2009). Die coiled-coil Domäne wird mit der Tetramerbildung assoziiert (Tsuruda et al. 2006). Am N-terminalen Ende befinden sich zwei Bindestellen für Calmodulin (Halokovska et al. 2012). Am C-terminalen Region eine TRP-Domäne, die sich im Anschluss zur sechsten Transmembran-Domäne befindet und aus einer Prolin-reichen Sequenz besteht (Montell et al. 2005). Sie dient wahrscheinlich zur Interaktion mit Effektorproteinen (dargestellt in Abbildung 1).

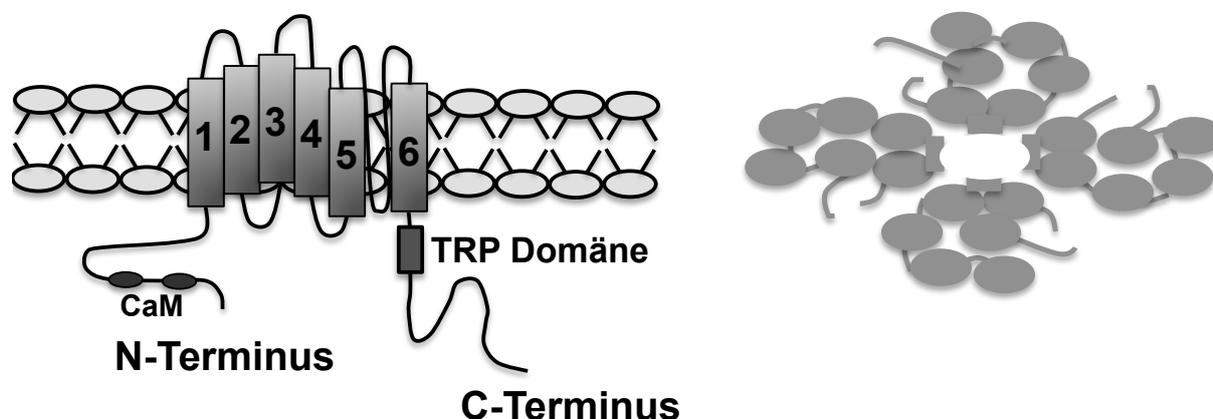


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines TRPM3-Kanals.

Der TRPM3-Kanal setzt sich aus sechs Transmembrandomänen zusammen. Zwischen der Domäne 5. und 6. ist die ionendurchlässige Pore lokalisiert. Die N-terminale Calmodulin-Bindedomäne und die C-terminale TRP-Domäne sind zytosolisch lokalisiert (modifiziert nach Thiel et al. 2013). Vier TRP Proteine lagern sich zusammen und bilden einen homo-, oder einen heterotetrameren Kanal mit TRPM1 (adaptiert aus Flockerzi 2007).

TRPM3-Kanäle werden u.a. in Leber, Augen, Nieren, Gehirn und Hypophyse, Ovarien, Hoden, Rückenmark und transgeminalen (TG) und dorsalen

Wurzelganglien (DRG) des zentralen Nervensystems , Purkinje-Zellen (Zamudio-Bulcock, vaskulären glatten Muskelzellen (Naylor et al.2010) und β -Zellen des Pankreas (Thiel et al. 2012, Marabita et al. 2016) exprimiert (Lee et al. 2003, Grimm et al. 2003, Oberwinkler et al. 2005, Fonfria et al 2006, Wagner et al. 2008, Naylor et al. 2010, Thiel et al. 2012). Aufgrund der breiten Expression in diversen Zelltypen und Geweben kommen den TRPM3 Kanälen diverse Funktionen zu, sie sind u.a. beteiligt an proinflammatorischer Zytokinsekretion (Naylor et al 2010), inflammatorischem Schmerz & Hyperalgesie (Vriens et al. 2011, Straub et al 2013 b), rheumatoider Arthritis (Ciurtin et al. 2010) und Insulinsekretion (Wagner et al 2008, Klose et al. 2011, Thiel et al. 2013). Eine Pregnenolonsulfat-Stimulation des TRPM3-Kanals in Insulinomazellen verstärkt die durch Glukose-induzierte Sekretion von Insulin (Wagner et al 2008). In pankreatischen β -Zellen sind TRPM3 Kanäle, neben TRPM2, TRPM5 und TRPA1, die wohl wichtigsten TRP Kanäle in der Regulation der Insulinsekretion (Colsoul et al. 2011), wobei in TRPM5^{-/-}-und TRPM2^{-/-}-Mäusen eine verschlechterte Glucosehomöostase festzustellen war. Die Stimulation von TRPM3 in pankreatischen β -Zellen von TRPM3^{-/-}-Mäusen induzierte die Sekretion von Insulin (Vriens et al. 2011, Held et al. 2015), jedoch war kein Effekt auf die Glucosehomöostase festzustellen (Vriens et al. 2011, Thiel et al. 2013). Desweiteren wurde in TRPM3^{-/-}-Mäusen eine deutlich verringerte Schmerzwahrnehmung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt. Diese Tiere zeigten auch Defizite in der Reaktion auf inflammatorischen Schmerz (Vriens et al. 2011). Die Aktivierung von TRPM3 durch hypotone Osmolaritätsänderungen ist desweiteren ein Indiz für die Rolle des Kanals in der renalen Osmolaritätsregulation (Grimm et al. 2003).Die Aktivierung bzw. Inhibierung der TRPM3-Kanäle bewirkt somit vielzählige biologische Funktionen und Prozessen und wird durch verschiedene Mechanismen reguliert.

Signalübertragung via Ca²⁺/ Calmodulin

Ca²⁺ ist ein grundlegender Regulator vieler zellulärer Funktionen wie Differenzierung, Sekretion, Proliferation, Aktivierung Transkriptionsfaktoren bis hin zur Apoptose (Berridge et al. 1993, 2000, Clapham 1995, Bootman et al. 2001, Orrenius et al 2003, Clapham 2007, Uhlen und Fritz 2010). Die Ca²⁺-Konzentration muss daher extra-und intrazellulär präzise abgestimmt sein. Die Konzentration von freien, intrazellulären

Ca^{2+} -Ionen liegt bei $0,1 \mu\text{M}$ und ist somit etwa 20.000 fach geringer im Vergleich zu der extrazellulären, die bei etwa 1-2 mM liegt (Clapham 2007, Case et al. 2007). Die Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsgradienten wird durch verschiedene Ca^{2+} -Transporter gewährleistet (Carafoli 2004) und dient zur raschen Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wodurch eine schnelle Signalweiterleitung gewährleistet wird. Bei Stimulation der endogenen TRPM3-Kanäle mit Pregnenolonsulfat wurde ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom gezeigt (Wagner et al. 2008, Majeed et al. 2010). TRPM3-Kanäle gelten als relativ effiziente Ca^{2+} -Kanäle (Nilius und Flockerzi 2014). Aus diesem Grund wird der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom und der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Maß für die Aktivierung der TRPM3-Kanäle verwendet (Wagner et al. 2008, Majeed et al. 2010). Freie intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen aktivieren intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Proteine wie Calmodulin, ein zytosolisches Protein, das vier Bindestellen für Ca^{2+} besitzt und in der Regulation verschiedener TRP-Kanäle beteiligt ist. Der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert auch die Proteinkinase C, die ebenfalls direkt durch Ca^{2+} aktiviert werden kann, und so die Gentranskription durch Rekrutierung von Ras den MAPK- oder den cAMP-Signalweg anschaltet (Berridge et al. 2003). Ca^{2+} ist somit auch essentiell in der Aktivierung oder Reprimierung der Expression von Transkriptionsfaktoren (Bandyopadhyay und Bancroft 1989) wie Egr-1, Elk-1 und CREB (Hardingham et al. 1997, Mayer und Thiel 2009, Thiel et al. 2010).

Agonisten und Antagonisten

In der Vergangenheit wurden einige aktivierende und inhibierende Liganden für TRPM3 beschrieben: Nifedipin und das Neurosteroid Pregnenolonsulfat (Wagner et al 2008, Drews et al 2014), D-Erythrosphingosin (Grimm et al 2003), CIM0216 (Held et al. 2015, Rubil et al 2017). Eine erniedrigte Osmolarität führt ebenfalls zur Aktivierung von TRPM3 -Kanals (Grimm et al. 2003, 2005). Ein inhibitorischer Effekt konnte für Kationen wie La^{3+} und Gd^{3+} (Clapham 2007), pharmakologische Substanzen wie 2-APB (Straub et al 2013), Pregnenolon (Majeed et al 2012), Flavone (Straub et al 2013) und Fenamate (Klose et al 2011) gezeigt werden. Auch das antiinflammatorische Medikament Diclofenac wurde als TRPM3-Antagonist beschrieben (Suzuki et al 2016). Zusätzlich wird der TRPM3-Kanal durch Phosphatidylinositolphosphate (PIP), besonders PIP_2 aktiviert (Tóth et al. 2015a, b),

eine Auswirkung auf eine TRPM3-vermittelte Signalkaskade wurde noch nicht gezeigt. In Insulinomazellen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat eine Signalkaskade zur Aktivierung der Gentranskription induzierte (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011). Eine genauere Untersuchung der Aktivatoren und Inhibitoren hinsichtlich der Induktion einer Signalkaskade zur Regulation AP-1 und Egr-1-regulierter Gentranskription in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen stand zu Beginn der Arbeit noch aus.

Aufgrund der fehlenden Identifikation eines natürlichen Liganden ist die Funktion von TRPM3 *in vivo* noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Untersuchung dieses Kanals hinsichtlich Struktur, Selektivität für Ionen und Funktion kommt eine immer größere Bedeutung zu, da Mutationen, Dysfunktion und Fehlfaltungen dieser Proteine zu phänotypischen Erkrankungen führen (Ashcroft 2006). Es wurde beschrieben, dass eine Regulation von TRPM3 durch Osmoregulation und der renalen Expression bei einer Dysfunktion zu einer Nierenerkrankung führt (Woudenberg-Vrenken et al. 2009). Zudem konnte die Rolle der renalen Expression von TRPM3 mit der Ausbildung eines Nierentumors in Verbindung gebracht werden (Hall et al. 2014). Mutationen im TRPM3-Gen führen zu einer vererbten Linsentrübung und Ausbildung eines Glaukom (Bennett et al. 2014). Pathophysiologisch konnte noch keine Erkrankung in Menschen als Konsequenz einer TRPM3-Dysfunktion nachgewiesen werden, es lassen sich nur pathophysiologische Schlüsse aus der Expression und Funktion von TRPM3 in den Geweben oder Organen schließen (Nilius et al. 2007).

1.3 Pregnenolonsulfat-induzierte Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Transkription von Genen positiv oder negativ regulieren. Die Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren dienen der Änderungen des Genexpressionsmusters nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli (Angel et al. 1991). Mehrere Transkriptionsfaktoren konnten identifiziert werden, die nach Stimulation des TRPM3 mit Pregnenolonsulfat aktiviert wurden, u.a. CREB, AP-1, c-Jun, c-Fos, Egr-1, und Elk-1 (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011, Thiel et al. 2013, Lesch et al. 2014, 2015, Rubil et al. 2015).

Diese Arbeit konzentriert sich vorwiegend auf die transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1), der aus den basischen

Leuzinzipper-Proteinen (bZIP) Jun, Fos oder ATF gebildet wird, den Zinkfingertranskriptionsfaktor „early growth response“-1 (Egr-1), und den ternären Komplexfaktor „Ets-like“-1 (Elk-1).

1.3.1 Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1

Der Zinkfingertranskriptionsfaktor „early-growth-response-1“ (Egr-1) wurde zuerst in kultivierten Fibroblasten entdeckt (Sukhatme et al. 1988) und ist auch unter den Namen NGFI-A („nerve growth factor-induced protein A“, Milbrandt 1987), Tis8 (Lim et al. 1987), Zif268 (Zinkfingerprotein 225, Christy et al. 1988, 1989) und Krox24 (Lemaire et al. 1988, Chavrier et al. 1989), bekannt. Die Egr-Familie umfasst insgesamt 4 Proteine: Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Egr-4 (Sukhatme et al. 1988, Lemaire et al. 1988, Patwardhan et al. 1991, Crosby et al. 1991). Die Egr-Proteine besitzen Zinkfinger motive vom Cys₂His₂-Typ (Sukhatme et al. 1988, gezeigt in Abbildung 2). Die Biosynthese von Egr-1 wird durch diverse extrazelluläre Faktoren und Signalwege induziert wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter (Thiel und Cibelli 2002, Pagel und Deindl 2011), extrazelluläres Ca²⁺ (Thiel et al. 2010), TPA und TNF α (Cao et al. 1991) gezeigt werden.

Die Aktivierungsdomäne befindet sich N-terminal, während eine inhibitorische Domäne zwischen der Aktivierungsdomäne und der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist. Die inhibitorische Domäne dient der Bindung der transkriptionellen Repressoren „nerve-growth-inducible-factor-binding“-Proteine NAB1 und 2, die durch die Egr-1-Biosynthese induziert werden (Russo et al., 1995, Svaren et al. 1996, Thiel et al. 2000, Kumbrick et al. 2005,). Egr-1 wirkt in diversen biologischen Prozessen als transkriptioneller Regulator. Zu diesen Funktionen zählen die Regulation des Zellwachstums und -differenzierung (Sukhatme et al. 1987, Thiel et al. 2002), Proliferation, Reproduktion, Vermittlung der Immunantwort (McMahon und Monroe 1996), Apoptose, Regulation der neuronalen Plastizität im Nervensystem (Jones et al. 2001), Regulation der synaptischen Exozytose via VAMP2 (Petersohn and Thiel 1996). In β -Zellen des endokrinen Pankreas oder in Insulinomazellen wurde eine Stimulus-induzierte Aktivierung von Egr-1 durch Glukose gezeigt (Susini et al. 1988, Frödin et al. 1995, Josefsen et al. 1999, Bernal-Mizrachi et al. 2000, Müller et al. 2011) und der daraus resultierende Ca²⁺-Einstrom (Wagner et al. 2008) führt zu einer

erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die Egr-1 in Insulinomazellen induziert (Mayer und Thiel 2009). Egr-1 ist in β -Zellen *in vivo* durch Aktivierung des Pdx-1-Promotors (Eto et al. 2007) indirekt an der Insulinbiosynthese, Inselgröße und Blutglukosewerten beteiligt (Müller et al. 2012).

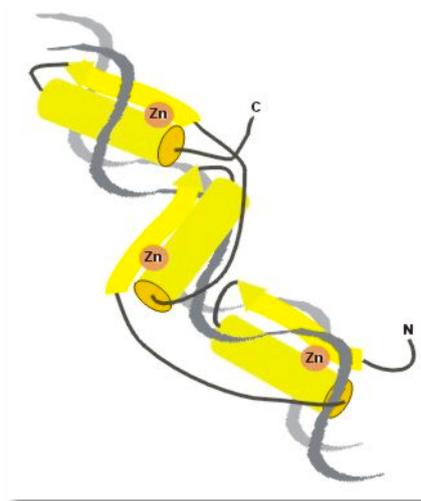


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zinkfingertranskriptionsfaktors.

Die Mitglieder der Familie der Zinkfingertranskriptionsfaktoren besitzen drei Zinkfingerdomänen vom Cys_2His_2 -Typ, die aus einer α -Helix und einem antiparallelen β -Faltblatt gebildet werden. Im Zentrum wird dabei je ein Zn^{2+} durch je zwei Cysteine und Histidine koordinativ gebunden. Die Zinkfinger binden in der großen Furche der DNA (Abbildung aus feldmann.userweb.mwn.de).

1.3.2 Basische Leuzinzipper (bZIP) Proteine

Die charakteristische Struktur der basischen Leuzinzipper-Proteine (bZIP) wird aus einer amphipathischen α -Helix gebildet, bei der jede siebte Aminosäure ein Leuzin ist. Die hydrophoben Leuzinreste zeigen aufgrund der periodischen α -Helix-Windung nach außen. Durch Dimerisierung zweier Leuzinzipperproteine weisen die Leuzinreste beider Proteine zueinander, was die typische „Reißverschlussstruktur“, den „Leuzinzipper“ bildet und die charakteristische Struktur dieser Proteinfamilie beschreibt (Landschulz et al. 1988). Alle Proteine dieser Familie besitzen zudem im N-terminalen Bereich eine basische Domäne, die mit der sauren DNA in Wechselwirkung tritt und die Transkription initiieren kann.

1.3.2.1 Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1)

Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 ist ein Komplex, der durch Dimerisierung zweier Proteine aus der Familie der Leuzinzipperproteine Jun, Fos und ATF gebildet

wird. Die Dimerisierung erfolgt durch Verknüpfung der Leuzinreste dieser Proteine und ist notwendig zur Bindung an die DNA (Halazonetis et al. 1989, Smeal et al 1989, schematisch gezeigt in Abbildung 3). AP-1 wurde zuerst als Heterodimer aus den basischen Leuzinzipperproteinen c-Jun und c-Fos beschrieben (Chiu et al. 1988, Curran & Franza 1988). Zudem können Heterodimere aus c-Fos/ATF2, c-Jun/ATF2 oder seltener Homodimere von ATF2 und c-Jun den AP-1-Komplex bilden. c-Fos hingegen kann nicht als Homodimer an die DNA binden (Halazonetis et al. 1988, Rauscher et al. 1988). Die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes kann die DNA-Bindungsspezifität beeinflussen (Hai und Curran 1991, Halazonetis et al. 1989, Smeal et al 1989). So besitzen die Heterodimere aus Fos und Jun Proteinen eine höhere Stabilität und Affinität zur DNA-Sequenz als Jun-Homodimere (Allegretto et al. 1990, Halazonetis et al 1988, Smeal et al 1989). Jun-Homodimere und Jun/Fos-Heterodimere binden an das TPA-responsiven Element (TRE) mit hoher Affinität (Steinmüller et al. 2001). Jun/ATF und ATF/Fos Dimere binden an ein cAMP-responsive Sequenz (CRE) (Reddy und Mossman 2002). Durch diese unterschiedlichen Möglichkeiten zur Dimerisierung kann der AP-1-Komplex die transkriptionelle Aktivität diverser Gene regulieren. AP-1 wurde als TPA-induzierter Transkriptionsfaktor beschrieben, der an das spezifische Sequenzmotiv 5'-TGAGTCA-3' im SV40 diverser Gene bindet (Angel et al. 1987). Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Apoptose, Überleben der Zelle, Wachstumkontrolle, Transformation, Proliferation, Differenzierung (Angel und Karin, 1991, Karin et al. 1997, Shaulian und Karin 2002), sowie der Entwicklung maligner Tumoren. (Eferl et al. 2003, Veserly et al. 2009). Die Aktivierung von AP-1 erfolgt über extrazelluläre Signale, die die Kinasen p38, ERK und JNK aktivieren (Whitmarsh und Davis 1996). In *in vivo* Experimenten mit Mäusen konnte eine Korrelation der Malignität von chemisch karzinogen induzierten Tumoren mit der Aktivität von AP-1 gezeigt werden (Zoumpourlies et al 2000). In β -Zellen des Pankreas wird AP-1-durch Glukose-Stimulation induziert (Glauser & Schlegel 2007, Müller 2010).

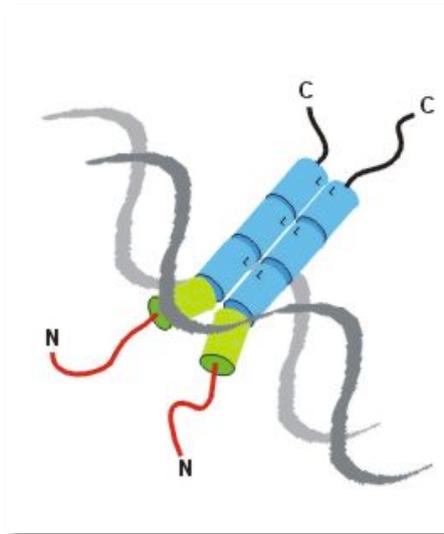


Abbildung 3: Schematische Darstellung des AP-1-Komplexes.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird durch Dimerisierung zweier basischer Leuzinzipper (bZIP)-Proteine gebildet, hier am Beispiel aus c-Fos und c-Jun gezeigt. Die C-terminalen Leuzinzipper beider Proteine lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkung an und die basische N-terminale Domäne dient zur Bindung an die negativ geladene Phosphatreste der DNA (Abbildung aus feldmann.userweb.mwn.de).

c-Jun

Das basische Leuzinzipperprotein c-Jun zählt zu den AP-1-bildenden Proteinen. Die Expression von c-Jun wird durch AP-1 reguliert. Der c-Jun-Promotor beinhaltet ein TPA-responsives Element (TRE). Das c-Jun-Protein besitzt durch eine starke Transaktivierungsdomäne ein starkes transkriptionelles Aktivierungspotential. Durch Phosphorylierung an den Serinresten 63 und 73 durch die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) wird die Expression von c-Jun aktiviert (Angel et al. 1988, Behrens et al 1999). Die Transkription wird durch diverse Faktoren induziert, wie z.B. Zytokine, UV-Strahlung und Wachstumsfaktoren. c-Jun ist ein wichtiger Regulator in Apoptose, neuronaler Apoptose (Ham et al 2000), und Zellzykluskontrolle. Die Aktivierung von c-Jun über JNK leitet die Apoptose differenzierender β -Zellen ein (Ammendrup et al. 2000). Einige Karzinomaarten benötigen erhöhte Expressionslevel von c-Jun zur Entwicklung und Progression (Vogt et al 2001). In Mäusen reguliert c-jun die normale Entwicklung genauso wie die Entwicklung von Tumoren (Erferl et al. 2003). Bei einer erhöhten Expression von c-Jun in β -Zellen kommt es zu einer reduzierten Insulinbiosynthese, wie sie bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ 2 auftritt (Matsuoka et al. 2010).

c-Fos

c-Fos zählt zu der Familie der Fos-Transkriptionsfaktoren, zu der auch FosB, Fra-1 und 2 (Franza et al. 1988) und die FosB2- und Δ FosB-Spleißvarianten gehören. Der c-Fos-Promotor besitzt ein Serum-response-Element und ein cAMP-responsives Element. Die Expression wird durch diverse Faktoren aktiviert, wie UV-Licht, Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Zelluläres Fos wurde als Dimerisierungspartner von Jun und somit als weiteren Bestandteil des AP-Komplexes identifiziert (Rauscher et al. 1988, Sassoni-Corsi et al. 1988). c-Fos besitzt eine starke C-terminale Transaktivierungsdomäne und spielt eine wichtige Rolle in der Formation der Knochenmatrix, so entwickelten Mäuse bei Überexpression von Osteosarkome, während bei c-Fos knockout-Tieren Osteoporose auftrat (Eferl et al. 2003). c-Fos liegt im unstimulierten Zustand in geringer intrazellulärer Konzentration vor. Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt über die MAP-Kinase-Kaskade. In Insulinomazellen konnte eine Induktion der Expression durch simultane Stimulation mit Glukose und Glukoincretinen gezeigt werden (Susini et al. 1998).

ATF2

Der „Activating Transcription Factor 2“ zählt ebenfalls zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren. Er wird durch die c-Jun N-terminale Kinase JNK und p38 phosphoryliert und aktiviert (Gupta et al. 1995) und p38. Er spielt eine wichtige Rolle in neuronaler Apoptose (Yuan et al. 2009) und in der Suppression der Tumorgenese via JNK (Gozdecka et al 2014). ATF2 bildet Heterodimere, bevorzugt mit c-Jun, oder mit c-Fos, aber auch Homodimere, die jedoch ein geringes transkriptionelles Aktivierungspotential besitzen. ATF2 interagiert mit β -Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren und aktiviert die Insulinbiosynthese (Han et al. 2011).

1.3.3 Der Ternäre Komplexfaktor Elk-1

Elk-1 zählt zu den ternären Komplexfaktoren (TCFs) aus der Familie der Ets-(E26 transformation-specific, Nunn et al. 1983, oder E-twenty-six, LePrince et al. 1983) Proteine. Allen Proteinen dieser Familie ist ein hochkonserviertes, geflügeltes „helix

turn helix“-Motif als DNA-Bindedomäne gemein, die sich aus zwei α -Helices und einer β -Schleife zusammensetzt (Brennan et al. 1993). Die TCF-Proteine besitzen eine C-terminale Aktivierungsdomäne, die durch die Proteinkinase ERK phosphoryliert wird, und eine N-terminale Domäne zur Bindung an die DNA. Elk-1 bindet spezifisch an die purinreiche DNA-Sequenz GGA(A/T) (Karim et al 1990, Oikawa und Yamada 2003), während die SRFs an die CArG-Sequenz binden. Die TCFs wurden ursprünglich durch Bindung des SRFs an das SRE im c-fos-Promotor beschrieben (Hipskind et al. 1991). Auch der Egr-1-Promotor besitzt ein SRE (Treismann et al 1995, Janknecht et al. 1995, Hodge et al. 1998). Elk-1 stellt dadurch einen Knotenpunkt zur Änderung der Genexpression dar (Cavigelli et al. 1995, Whitmarsh et al. 1995, Shaw und Saxton 2003) dar. Der Transkriptionsfaktor wird durch ein Protein aus der TCF-Familie und zwei Serumresponsefaktoren (SRF) gebildet, die dann als ternärer Komplex an das SRE im Promotor früh exprimierter Gene binden und sie aktivieren oder reprimieren (Yordy und Muise-Helmericks, 2000, Shaw und Saxton 2003, Besnard et al. 2011, Abbildung 4). Aktiviert Dabei ist die B-box-Domäne von Elk-1 essentiell zur Formation und Bindung des ternären Komplexes (Janknecht und Nordheim 1992, Shore und Sharrocks 1994,. Elk-1 wird durch Phosphorylierung an den Serinresten S383 und S389 im C-Terminus durch die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 aktiviert (Yordy und Muise-Helmericks, 2000). Neben Elk-1 existieren noch 2 weitere humane TCFs: die beiden SRF-akzessorischen Proteine SAP-1 (Treismann 1992) und SAP-2 (Net, Elk-3). In Insulinomazellen wurde eine Stimulus-induzierte Aktivierung von Elk-1 gezeigt (Bernal-Mizrachi et al. 2001, Mayer und Thiel 2009).

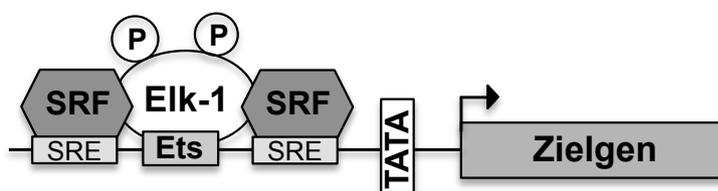


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ternären Komplexes.

Elk-1, oder die redundanten Proteine SAP-1 oder -2, bildet zusammen mit zwei „serum-response“-Faktoren (SRF) den Ternären Komplexfaktor. Phosphoryliertes Elk-1 bindet an die Ets-Sequenz und aktiviert zusammen mit den SRFs das Serum-response-Element und induziert so die Genexpression.

1.3.3.1 Die Funktion von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen

Die Gene in β -Zellen müssen schnell auf veränderte metabolische Bedingungen reagieren. Diese Gene kodieren für Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Insulinbiosynthese und der β -Zellmasse maßgeblich beteiligt sind (Susini et al. 1998, Webb et al. 2000, Glauser und Schlegel 2007). In β -Zellen existieren Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren, deren Funktion noch nicht völlig aufgeklärt ist. Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählt der ternäre Komplexfaktor Elk-1. Elk-1 wird in β -Zellen durch Glukose-induzierte Membrandepolarisation aktiviert (Bernal-Mizrachi et al. 2001, Müller et al. 2012). In Insulinomazellen wurde die Aktivierung von Elk-1 durch eine Membrandepolarisation mit KCl/FPI nachgewiesen (Mayer et al. 2011). Elk-1 ist der Hauptregulator in der Pregnenolonsulfat-induzierten Aktivierung von Egr-1 (Mayer et al. 2011). Aber welche Bedeutung besitzt Elk-1 in pankreatischen β -Zellen? Um die Funktion von Elk-1 in β -Zellen aufzuklären, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, in dem die Bedeutung von Elk-1 durch Expression einer dominant-negativen Form: REST/Elk-1 Δ C analysiert werden konnte. Die Verwendung einer Elk-1^{-/-}-Linie kam nicht in Frage, da die Proteine der TCF-Familie eine Redundanz aufweisen und der Funktionsverlust ausgeglichen wird. In den bisherigen Elk-1^{-/-}-Mausmodellen war daher kein Phänotyp zu erkennen (Cesari et al. 2004).

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden zwei Projekte zur Analyse von Signaltransduktion und Genregulation bearbeitet. Daraus lassen sich folgende Aufgaben definieren:

1. Analyse der Signalkaskade hinsichtlich der Regulation der Genexpression nach Stimulation des TRPM3 Kanals.

Die Aktivierung von TRPM3 in β -Zellen des Pankreas aktivierte die Stimulus-regulierten Transkriptionsfaktoren AP-1 und Egr-1 (Mayer et al 2011, Müller et al. 2011). Bisher wurde die Aktivierung von TRPM3 nur über den induzierten Ca^{2+} -Einstrom gemessen. Es ist aber bekannt, dass dieser nicht immer ausreicht um eine Signaltransduktion zur Regulation der Genexpression zu induzieren. In dieser Arbeit wurden die bisher beschriebenen Aktivatoren und Inhibitoren von TRPM3 wie Mefenaminsäure, Nifedipin und D-Erythrosphingosin hinsichtlich Induktion einer Signalkaskade zur Aktivierung von AP-1 und Egr-1 untersucht. Desweiteren wurde ebenfalls diese TRPM3-induzierte Signalkaskade Regulation der Genexpression untersucht.

2. Analyse der Funktion des Stimulus-induzierten Transkriptionsfaktors Elk-1 in pankreatischen β -Zellen *in vivo*.

Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 wird in Insulinomazellen durch Glukose aktiviert und ist der Hauptregulator von Glukose-induzierter Egr-1-Expression (Bernal-Mizrachi etv al. 2001, Eto et al. 2007, Mayer et al 2011, Thiel et al. 2013). Egr-1 ist in der Regulation der Glukosehomöostase involviert. Die Aktivierung von Elk-1 geschieht auch durch die Aktivität von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Um die Rolle von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen zu untersuchen, wurde ein Mausmodell verwendet, das eine dominant-negative Variante von Elk-1; REST/Elk-1 Δ C; spezifisch in den β -Zellen exprimiert. Die Proteine der TCF-Familie sind redundant. Durch die Verwendung einer dominant-negativen Variante wird das Problem der Redundanz vermieden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop (Stemi2000)	Zeiss, Göttingen
Autoklav	Schütt, Göttingen
Behälter für Flüssigstickstoff	diverse Hersteller
Blotting Kammer	Hoefer Scientific Instruments, CA, USA
Brutschrank	verschiedene Hersteller
Einfrierhilfe „Mr Frosty“	Thermo Scientific, Karlsruhe
Eismaschine	verschiedene Hersteller
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau der Werkstatt der Biochemie Homburg
Entwicklergerät für Röntgenfilme (Gevamatic 60)	Agfa-Gevaert, München
Exposure Cassette mit Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, GE Healthcare, Freiburg
Evaporator (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad , München
Heizblock mit Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
Kühlzentrifuge (J2-HS)	Beckman, München
Lichtmikroskop (BX-60)	Olympus, Hamburg
Luminometer	Berthold Detection Systems,Alabama, USA
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader (Model 550)	Bio-Rad, München
Mikroprocessor pH-Meter pH537	WTW, Weilheim,

Mikroskop (Durchlicht) Axiovert25	Zeiss, Göttingen
Mikroskop (BZ-8000)	Keyence, Osaka, Japan
Mikrotom (Leica SM2000R)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrotom (Leica CM1900)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrowellenherd	AEG, Nürnberg
Milliporewasser-Anlage Milli Q	Millipore, Milford, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
PCR-Cycler Labcycler	Sensoquest, Göttingen
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Weilheim
PhosphorImager SF	Molecular Dynamics, GE Healthcare, Freiburg
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, NJ, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Rotator	Faust GmbH, Köln
Rotoren für Kühlzentrifuge (JA.20)	Beckman, München
RT-PCR-Gerät (Mx3000P)	Stratagene, CA, USA
Spannungsgeräte für Agarosegel- Elektrophorese (APELEX PS 503)	Bio-Rad, München
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät mit Micro-und Macrotip	Branson, Danbury, USA
UV-Tisch	Fröbel, Wasserburg
Vortex-Mischer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad, temperierbar	verschiedene Hersteller
Western Blot-Apparatur: Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Wipptische	Biometra, Göttingen

Zentrifuge (5810R)	Eppendorf, Hamburg
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	
24-Loch Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch Mikrotiterplatte, durchsichtig	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch Mikrotiterplatte, weiß	Nunc Roskilde, Dänemark
Bindfaden	diverse Hersteller
Deckgläser 24 x 24 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettkassette mit Deckel	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmal-Impfösen: Inoculating Loop, steril	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Einmal-Spitzen	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen Injekt (1 ml, 20 ml)	Braun Melsungen AG, Nürtingen
Filterpapier (DE81)	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtersäulen, 1 ml	Qiagen, Hilden
Glucometer mit Kontrollstreifen	Accu-Chek®, Aviva, Roche, Mannheim
Inkubationsröhrchen 12 ml	Greiner & Söhne, Nürtingen
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryokonservierungsröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Küvetten UVette, 50-2000µl	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulose Membran (Trans-Blot Transfer Medium, 0,2 µm)	Bio-Rad, München
Objektträger, 76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co. KG, Wuppertal
Petrischalen 120 mm	Sarstedt, Nürnberg
Pflaster	Leukosilk® 10 mm Beiersdorf AG, Hamburg
Plastikröhren 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Plastikröhren 15 ml	Sarstedt, Nürnberg
Polystyren-Röhrchen	Becton Dickensen, Heidelberg
Qiagen-tip 500 Säule	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,2ml	Thermo Scientific, Karlsruhe

Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Fuji-Film, Düsseldorf
Sartolap P Druckfiltrationseinheit steril	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter: 0,2 µm, und 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
TissueTek (Jung Einbettmedium)	Leica, Nussloch
Whatman 3MM-Papier	Whatman, Maidstone, UK
Wattestäbchen (kleiner Kopf), unsteril	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (60mm x 15mm, 35mm x 15mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht (# 83.1830)
Zentrifugenröhrchen-Röhrchen 15 ml	Greiner & Söhne, Nürtingen

2.1.3 Chemikalien und Feinchemikalien

100bp DNA Ladder plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot(# SM0321)
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Aminodiphenylborinat	Sigma-Aldrich, München (# D9754)
3-N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamino-propansulfonsäure Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich, München (# H7904)
6x Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt (# 1615)
Agarose-Tabletten 0,5g	Roti®garose Roth, Karlsruhe (# HP67.3)
Amersham ECL Plus Western-Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (# 2132.2133)
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe (# 9178.1)
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe (# K029.2)
BAPTA AM	Tocris, Wiesbaden (# 126150-97-8)

BD 1047 Dihydrobromid	Tocris, Wiesbaden (# 0956)
Bisindoylmaleimid III	Enzo Life Sciences, Lörrach (# ALX-270-051)
Blasticidin S HCl	Gibco, Invitrogen, CA, USA (#R210-01)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg (# 15375.02)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München (# 85040C)
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe (# T885.1)
Chelex Resin 100	BioRad, München (# 1432832)
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München (# C6628)
Clozapin-N-oxid	Sigma-Aldrich, München (#C0832)
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Steinheim (# A2056)
Complete® Protease Inhibitor	Roche, Mannheim (# 11873580001)
dATP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0141)
Dantrolene	Sigma-Aldrich, München (#D9175)
dCTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0151)
dGTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0161)
D-Erythrosphingosin	Biomol, Hamburg (# 10007907)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe (# A994.1)
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt (# 6580)
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe (# 6908.1)
DMEM	Sigma-Aldrich, München (# D5523)
Doxyzyklin	Biomol, Hamburg (# LKT-D5898.25)
DPBS	Gibco, Invitrogen, CA, USA (# 14200-075)
dTTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0171)
EDTA	Roth, Karlsruhe (# CN06.1)
EGTA	Sigma-Aldrich, München (# E4378)
Ethanol	VWR, Fontenay sous Bois
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe (# 7870.1)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin (# S0115)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt (# 344198)
Forene® (Isofluran)	Baxter, Unterschleißheim

Glycerol	Biomol, Hamburg (# 50405)
D-Glukose	Merck, Darmstadt (# 25972)
HBSS	Gibco, Invitrogen, CA, USA (#14025)
HCl	Roth, Karlsruhe (# 9277.1)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe (# 2363.4)
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe (# CP41.1)
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe (# T874.2)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe (# 6781.1)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (# 4873)
Kalziumdichlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe (# 5239.1)
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Roth, Karlsruhe (# N069.1)
Kollagenase P	Roche, Mannheim (# 11 213 857 001)
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories, Pasching (# M11004)
Luminol	Roth, Karlsruhe (# 4203.2)
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
Mefenaminsäure	Santa Cruz, Heidelberg (# 205380)
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St.Leon-Rot (# EP0441)
Magermilchpulver (Slim Fast)	Allpharm-Vertrieb GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt (# 5833.0250)
Methanol	Roth, Karlsruhe (# 4627.2)
N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N' (2-ethanesulfonic acid) (HEPES)	Roth, Karlsruhe (# 9105.4)
N,N-Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe (# T921.1)
Natriumacetat-Trihydrat z.A.	Merck, Darmstadt (# 1.06267.1000)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (# 3957.2)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (# 137018)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (# 2326.2)
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe (# 8551.2)
Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt (# 6575)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt (# 106467)

Natriumpyruvat	Invitrogen, CA, USA (# 11360070)
Naringenin	Sigma-Aldrich, Steinheim, (# N5893)
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim, (# N6264)
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Steinheim (# N7634)
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim (# 74385)
PD 98059	Merck, Darmstadt (# 513000)
Penicillin/Streptomycin (100x) (P/S)	PAA, Marburg (# P11010)
Pepton	Roth, Karlsruhe (# 8986.2)
Phenol	Roth, Karlsruhe (# 0040.2)
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim (# 107689)
Ponceau-S-Lösung (1%)	Fermentas, St.Leon-Rot (# EO0381)
Pregnenolon	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P9129)
Pregnenolonsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim (#P162)
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P8783)
Primer	Roth, Karlsruhe (# 3029.1)
Proteinmarker	PAA, Marburg (#G0029,3050)
Puromycin Dihydrochlorid	Thermo Fisher Scientific (#A1113802)
Quercetin	Sigma-Aldrich, Steinheim (# Q4951)
Random-Hexamer Primer	Roth, Karlsruhe (# 4625.2)
Rosiglitazone	Enzo Life Sciences, Lörrach (# ALX-350-125)
SP 600125	Alexis, Lörrach (# 270-339)
Sukrose (+D)	AppliChem, Darmstadt (# A2211)
Taq-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot (# EP0401)
TEMED	Roth, Karlsruhe (# 2367.2)
Tetrazyklinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim (# T7660)
TPA	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P1585)
Tetrazyklin	Fluka, Neu Ulm (# 87128)
Trichlormethan / Chloroform	Roth, Karlsruhe (# 3313.1)
Tris	Roth, Karlsruhe (# 5429.2)
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Marburg (# L11003)
Tween20	Roth, Karlsruhe (# 9127.1)

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)	Roche, Mannheim (# 10745740001)
Zeocin	Gibco, Invitrogen, CA, USA (# R250-01)

2.1.4 Kits

Amersham ECL plus	GE Healthcare München (# RPN2132)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific; Karlsruhe (# 23225)
Qiagen RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen, CA, USA (# 74034)
Promega PureYield™ Plasmid Maxiprep Kit	Promega, Mannheim (# A2393)

2.1.5 Verwendete Vektoren und Plasmide

Als lentiviraler Vektor wurde das Grundgerüst des „Human Immunodeficiency Virus“ (HIV) verwendet. Die essentiellen Gene für die Replikation des Virus sind „gag“ („group-specific antigen“, das den viralen Proteinmantel kodiert), „pol“ („polymerase“, kodiert für die virale Polymerase) und „env“ („envelope“, kodiert für das Hüllprotein). Die genetische Information wird von zwei repetitiven DNA-Sequenzen am 5'-und am 3'-Ende flankiert, den „long terminal repeats“ (LTRs). Sie dienen zur Integration ins Genom der Wirtszelle. Am 5'-Ende befindet sich ein starker Promotor. Durch das Verpackungssignal Ψ wird das retrovirale Genom in einen Proteinmantel gehüllt. Durch die Expression des Hüllproteins des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) durch den VSV-G-Expressionsvektors (Burns et al. 1993, Naldini et al. 1996) wurden die lentiviralen Vektoren pseudotypisiert. Zur erfolgreichen Produktion rekombinanter Lentiviren wurden diese Bedingungen auf die folgenden drei Plasmide aufgeteilt (Thiel und Rössler 2007).

Δ 8.91

Das Δ 8.91 Verpackungsplasmid kodiert für die viralen Proteine pol, gag und rev, die durch das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) und den starken „Immediate Early“ (IE) -Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV) flankiert werden (Abbildung 5).

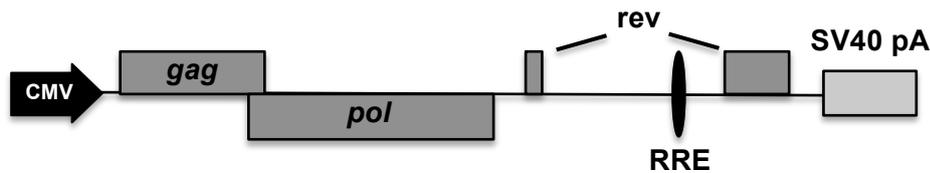


Abbildung 5: Das $\Delta 8.91$ Verpackungsplasmid.

Der Vektor des $\Delta 8.91$ kodiert für gag, pol und rev unter der Kontrolle des „Immediate Early“ (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV). Zudem besitzt das Plasmid das Polyadenylierungssignal des SV40 (Thiel & Rössler, 2007).

pCMV-G

Das Plasmid pCMV-G (Abbildung 6) dient zur Expression des Glykoproteins des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es besitzt ebenfalls das Polyadenylierungssignal des SV40.



Abbildung 6: Das pCMV-G-Expressionsplasmid.

Das Plasmid kodiert für das VSV-Glykoprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es besitzt zudem das Polyadenylierungssignal des SV40 (Thiel & Rössler, 2007).

Transfervektor

Der Transfervektor kodiert für die gewünschte cDNA unter Kontrolle des humanen Ubiquitin-Promotors (Thiel & Rössler, 2007). Der Vektor beinhaltet außerdem das posttranskriptionelle regulatorische Element des „woodchuck hepatitis virus“ (WPRE) (Zufferey et al., 1998), das den Transport der Virus-RNA ins Zytosol steuert. Das HIV-FLAP-Element katalysiert den Transport der Virus-DNA in den Zellkern und erhöht somit den Virustiter (Sirven et al., 2000). Der Transfervektor pFUW (Abbildung 7) bzw. pFUWG dient als Grundgerüst fast aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Lois et al. 2002).

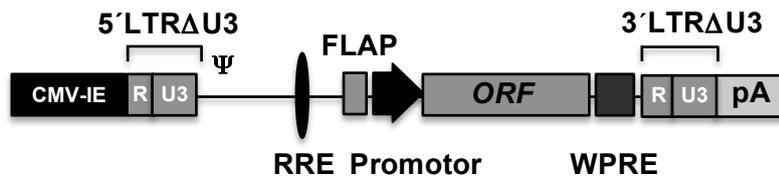


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Transfervektors pFUW.

Der Transfervektor beinhaltet den humanen Ubiquitin-C-Promotor, den Promotor/Enhancer Bereich des Cytomegalovirus (CMV) die LTRs mit einer Δ U3-Mutation sowie das „woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE) und das 3'-Polyadenylierungssignal. Die unterschiedlichen Sequenzen der verschiedenen Transgene wurden zwischen dem Ubiquitin-C-Promotor und dem WPRE inseriert. (Lois et al., 2002).

2.1.5.1 Lentivirale Reporterplasmide

pFW-Coll luc

Der lentivirale Transfervektor enthält das Luziferasegen, dessen Expression durch den humanen Kollagenase-Promotor von -517 bis +63 (Rössler et al. 2008) gesteuert wird. Dient zur Analyse AP-1-vermittelter Transkriptionsregulation.

pFW-Coll mut TRE luc

Das Plasmid kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des humanen Kollagenase-Promotors, in dem die TRE-Sequenz mutiert wurde (Thiel und Rössler 2014).

pFW-EBS2⁴luc

Dieses Plasmid kodiert für das Reporter-gen Luziferase, das unter der Kontrolle des humanen Synapsin I-Promotors steht. Der Promotor besitzt vier Bindestellen für Egr-1 vor einer TATA-Box und ein Initiatorelement (Al-Sarraj et al. 2005, Rössler und Thiel 2009). Spiegelt die transkriptionelle Aktivität von Egr-1 wider.

pFW-StRE¹luc

Dieses Plasmid kodiert für das Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle eines HO-1-Minimalpromotors. Der Promotor enthält drei Kopien des Stress-Response-Elements (StRE) aus dem HO-1-Gen (Müller et al. 2009).

pFW-UAS⁵SP1² luc

Kodiert für das Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle eines Promotors, der fünf Bindestellen für GAL4 und zwei Bindestellen für Sp1 besitzt (Thiel und Rössler 2001, Ekici et al. 2012). Wird verwendet, um die biologische Aktivität der GAL4-Fusionsproteine zu analysieren.

pFW-hcFos.luc

Das Plasmid kodiert für das Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle eines humanen cFos-Promotors. Die Promotorsequenz von -711 bis +42 wurde vor das Luziferasegen kloniert (Thiel und Rössler 2011). Spiegelt die c-Fos-Promotoraktivität wider.

2.1.5.2 Lentivirale Expressionsplasmide**pFUW**

Lentivirales Transferplasmid ohne kodierende Region für ein Transgen. Besteht nur aus dem Plasmidgrundgerüst. Dient als Kontrollplasmid. (Lois et al. 2002)

pFUWR α q

Lentiviraler Transfervektor, der für den Designerrezeptor R α q kodiert. (Kaufmann et al. 2013)

pFUW GAL4-ATF2

Kodiert für ein Fusionsprotein aus ATF2 von Aminosäuresequenz 1 bis 96, das an die GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert wurde. (Lesch et al. 2015)

pFUW GAL4-Elk-1

Kodiert für ein Fusionsprotein aus Elk-1 von Aminosäuresequenz 307 bis 428, das an die GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert wurde. (Rössler et al. 2008, Thiel & Rössler 2011, Lesch et al. 2015)

pFUW GAL4-Sp1

Kodiert für ein Fusionsprotein aus dem humanen Sp1 von Aminosäuresequenz 88

bis 620, das an die GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert wurde. (Ekici et al. 2012)

pFUW-ATF2ΔN

Der Transfervektor kodiert für eine dominant-negative Mutante von ATF2 (Steinmüller & Thiel 2003). Das rekombinante Protein besitzt ein N-terminalen FLAG-Tag zum immunologischen Nachweis (Hopp et al. 1988).

pFUW-c-JunΔN

Das Plasmid dient zur Expression einer dominant-negativen Mutante von c-Jun (Steinmüller & Thiel, 2003). Besitzt ein N-terminalen FLAG-Tag.

pFUW-MKP-1

Kodiert für die MAP-Kinase Phosphatase 1. Das Plasmid wurde von Nicholas K. Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. (Stefano et al. 2007, Bauer et al. 2007). Dephosphoryliert die Kinasen p38, ERK und JNK. Besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW-MKP-5

Kodiert für die MAP-Kinase Phosphatase 5. (Mayer et al. 2008, Spohn et al. 2010). Dephosphoryliert die Kinasen p38 und JNK. Besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW-MKK6E

Der Transfervektor kodiert für die konstitutiv aktive Mutante der Proteinkinase MKK6. (Spohn et al. 2010) Besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW-MEKK1Δ

Kodiert für eine konstitutiv aktive MEKK1-Mutante (Spohn et al. 2010). Besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW-REST/EIk-1ΔC

Das Plasmid wurde verwandt um eine dominant-negative Mutante von Elk-1 (Stefano et al. 2006) zu exprimieren. Besitzt die N-terminale Repressordomäne des

transkriptionalen Repressors REST (Thiel et al 1998) und einen N-terminalen FLAG-Tag zur immunologischen Detektion und ein Kernlokalisierungssignal.

pFUW Δ CnA

Dient zur Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A (Rössler et al. 2008). Besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW Δ CnA-EGFP

Kodiert für eine konstitutiv aktive Mutante von Calcineurin A (Lesch et. Al 2016). Besitzt einen GFP-Tag zur fluorimetrischen Detektion des exprimierten Proteins.

pFUW-Flag-CnB

Kodiert für die humane Calcineurin-Untereinheit B. Besitzt einen FLAG-Tag. (Lesch et al. 2016)

pFUW-SEK-AL

Dient zur Expression einer dominante-negative Mutante der MAP-Kinase Kinase SEK1/MKK4. Dient zur Inhibierung der Phosphorylierung von JNK (Spohn et al., 2010).

pLL3.7

Die Expression dieses Plasmids dient als Negativkontrolle bei der Expression der pLL.3.7-shRNAs. Es enthält keine kodierende Region einer shRNA (Rubinson et al. 2003, Choi et al., 2006). Besitzt einen EGFP-Tag.

pLL3.7-ATF2

Das Plasmid wurde verwandt um eine ATF2-spezifische shRNA zu exprimieren und so die Expression von ATF2 zu reduzieren (Mayer et al., 2011). Besitzt einen EGFP-Tag.

pLL3.7-c-Jun

Dieser Vektor kodiert für eine c-Jun-spezifische shRNA (Freund et al. 2004). Besitzt

einen EGFP-Tag.

pLL3.7-ERK1

Kodiert für eine spezifische shRNA gegen die Kinase ERK1 unter der Kontrolle des U6-Promotors (Hong et al. 2009). Besitzt einen EGFP-Tag.

pLL3.7-ERK2

Kodiert für eine spezifische shRNA gegen die Kinase ERK2 unter der Kontrolle des U6-Promotors (Hong et al 2009). Beinhaltet einen EGFP-Tag.

pLL3.7-shJNK

Kodiert für eine spezifische shRNA gegen die beiden Isoformen der Kinase JNK1 und 2. Beinhaltet einen EGFP-Tag. (Lesch et al. 2015)

pLL3.7-shTRPM3

Dieser lentivirale Transfervektor kodiert für eine spezifische shRNA gegen TRPM3 (Mayer 2011, Müller 2011).

HIV-7- β -Gal

Kodiert für das bakterielle Enzym β -Galaktosidase unter der Kontrolle des HIV-Promotors. Dient zum Nachweis der Infektionseffizienz. (Kowolik & Yee, 2002)

Die Plasmide wurden freundlicherweise von Professor Thiel, Homburg/Saar bereit gestellt.

2.1.6 Zelllinien

HEK293/T17

Die humane Nierenzelllinie wurde von D. Baltimore, Rockefeller University, freundlicherweise bereit gestellt (Pear et al. 1993). Die Zelllinie wurde mit dem SV40 T-Antigen transformiert (Graham et al. 1977).

HEK293ΔB-Raf:ER

Die HEK293ΔB-Raf:ER-Zelllinie wurde mittels retroviralem Gentransfer generiert (Al-Sarraj et al. 2005) und von Prof. Thiel freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie exprimiert stabil ΔB:Raf. Die Zellen wurden mit 0,6 µg/ml Puromycin selektioniert (Al-Sarraj et al. 2005).

HEK293/TRPM3

Diese Zelllinie exprimiert stabil den humanen TRPM3-Kanal unter Kontrolle des Tetrazyklin-regulierten Tet Repressors vom pcDNATM6/TR Plasmid. Als Grundlage hierfür diente die humane embryonale Nierenzelllinie 293/T17 (Graham et al. 1977), die mit Hilfe des T-RExTM-Systems (Invitrogen) generiert wurde.

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von David Beech und Yasser Majeed (University of Leeds, UK) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen S2-Bedingungen durchgeführt. Vor Verwendung wurden die Kulturmedien auf 37°C vorgewärmt.

2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Zur Kultivierung der Zellen wurde folgendes Medium verwandt:

DMEM

10% FCS

25 mM Glukose

2mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Die 293/TRPM3-Zellen wurden zusätzlich durch Zugabe von 5µg/ml Blasticidin S (Gibco, Invitrogen) und 400µg/ml Zeocin (Gibco, Invitrogen) ins Kulturmedium (Naylor et al. 2008) selektioniert.

2.2.1.2 Auftauen von Säugerzellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden sie zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein steriles Röhrchen mit 10 ml des vorgewärmten Kulturmediums überführt. Die Zellen wurden zwei Minuten bei 200xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml des vorgewärmten Mediums aufgenommen, resuspendiert und in eine Zellkulturflasche transferiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.1.3 Passagieren von Säugerzellen

Die Zellzahl sowie die Konfluenz des Zellrasens spielen eine wichtige Rolle in der Proliferationsrate der Zellen. Es ist nötig, die Zellen zu passagieren, um jederzeit optimale Kultivierungsbedingungen zu schaffen. Dazu wurde die Konfluenz des Zellrasens mehrmals wöchentlich lichtmikroskopisch beurteilt und der pH-Wert des Mediums visuell überprüft. Aufgrund dieser Faktoren wurde über eine weitere Passagierung entschieden. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS (170 mM NaCl, 4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 3,35 mM KCl, 1,84 mM KH₂PO₄ pH 7,2) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, versetzt mit 0,1% (w/v) EDTA) bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe von frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden in der Suspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in frische Kulturflaschen überführt und in 30-40ml frischem Medium ausgesät.

2.2.1.4 Einfrieren von Säugerzellen

Nach Entfernen des Kulturmediums und zweifachem Waschen des Zellrasens mit 1x PBS wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst und vereinzelt.

Zugabe von Medium wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 4°C bei 200 xg für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in FCS mit 10% DMSO aufgenommen und in 2 ml Kryokonservierungsröhrchen transferiert. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen in der Einfrierhilfe Mr. Frosty (Thermo Scientific) bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff (-192°C) gelagert.

2.2.2 Das TRExTM-System

Das TREx-System (Invitrogen) dient zur induzierbaren Expression von Genen in Säugerzellen. Das System basiert auf dem regulatorischen Element zur Tetrazyklin-Resistenz aus E.coli, dem Tet-Operon (TetO), unter der Kontrolle des starken Promotors des Zytomegalovirus (CMV) (Hillen et al.1983, Hillen und Berens 1994). Der Promotor beinhaltet zwei Kopien der Tet-Operon (TetO₂)-Sequenzen 5' TCCCTATCAGTGATAGAGA 3'. Jede der beiden TetO-Sequenzen dient als Bindestelle für zwei Moleküle des Tet-Repressors (TetR). In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Tet-Repressor als Homodimer mit hoher Affinität an die TetO₂-Sequenz des Promotors. Die Expression des Zielgens wird so reprimiert. Bei Zugabe von Tetrazyklin bindet dieses an den Tet-Repressor, der durch die daraus resultierende Konformationsänderung vom Tet-Operon abdissoziiert. Die Expression des Zielgens kann nun erfolgen (siehe Abbildung 8).

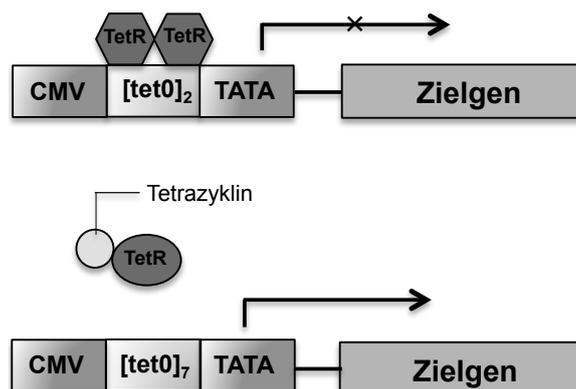


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Tetrazyklin-Systems in Säugerzellen.

Oben: In Abwesenheit von Tetrazyklin blockiert ein Homodimer aus zwei Tet-Repressor-Molekülen die Tet-Operon [tetO]₂-Bindestelle des CMV-Promotors. Die Transkription des Zielgens wird reprimiert. Unten: Durch Zugabe von Tetrazyklin bindet dieses an den Tet-Repressor und es erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch die Bindung des TetR an die [tetO]₂-Sequenz verhindert wird. Dadurch kann die Expression des Zielgens erfolgen (angelehnt an Product Sheet von Invitrogen zum TReX-System)

2.2.3 Verwendete Antikörper zum Nachweis von Proteinen

Zur Analyse von Proteinen mit Hilfe des Western Blots wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 1: verwendete Antikörper für die Proteinanalyse

Primärantikörper	Firma	Sekundärantikörper
Egr-1 (C-19)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc189)	rabbit-anti
HDAC 1 (H-11)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc81598)	mouse-anti
c-Fos (4)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc52)	rabbit-anti
c-Jun (H-79)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc1694)	rabbit-anti
ATF2 (N-96):	Santa Cruz Heidelberg, (#sc-6233)	rabbit-anti
p-ERK 1/2 (K-23)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc153)	rabbit-anti
FLAG®M2	Sigma, Deisenhofen (# F3165)	mouse-anti

Sekundärantikörper	Firma
Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti-mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Lab Baltimore, USA (#115035003) Sigma, Deisenhofen, (#A4416)
Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti-rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Lab Baltimore, USA (#111035003)

2.2.4 Primer

Tabelle 2: Primer zur Genotypisierung

Transgen	Primer 5´-3	Produktgröße (bp)
β-Gal	forward CAAACCATCGAAGTGACCAG	389
	reverse CCTGACTGGCGGTAAATTG	
REST/EIk-1ΔC	forward CGATTACAAGGATGACGATGA	272
	reverse TGCCATTTACTTCCCCAGTTA	
rtTA	forward GTGAAGTGGGTCCGCGTACAG	391
	reverse GTACTCGTCAATTCCAAGGCATCG	

Die Lage der Primer und die Größe des Produktes sind in Abbildung 9 zu sehen.

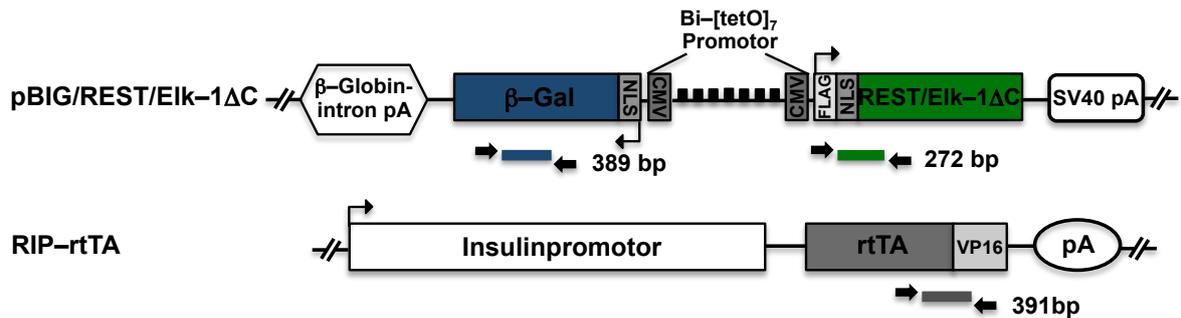


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Primer im pBIG/REST/EIk-1ΔC- und RIP-rtTA-Vektor.

Der Expressionsvektor pBIG/REST/EIk-1ΔC dient zur Expression von REST/EIk-1ΔC und gleichzeitig der β -Galaktosidase (β -Gal) unter der Kontrolle des bidirektionalen Promotors Bi-tetO, der die Promotorregion des humanen Cytomegalovirus enthält. Der Vektor beinhaltet zudem Kernlokalisationssequenzen (NLS) und die Polyadenylierungssignale (pA) des Simian Virus 40 (SV40) bzw. des β -Globin-Gens. Der Expressionsvektor RIP-rtTA exprimiert den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des Insulin Promotors aus der Ratte (RIP). Der Vektor beinhaltet ein Polyadenylierungssignal. Die Lage der Primer und die jeweiligen amplifizierten Produktgrößen sind dargestellt (modifiziert nach Rössler et al. 2016).

Tabelle 3: Primer für die RT-PCR

Gen	Primer 5'-3'	Produktgröße (bp)
Elk-1 (Maus)	forward CTCGGGCCTCTATTCTACTT	220
	reverse GCCTCTGGTGGGGTTAGGATA	
GAPDH (Maus)	forward TTGTGATGGGTGTGAACCAC	169
	reverse GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	
TRPM3 (Mensch)	forward AGCAGTTCTACCTAACGT	268
	reverse CTTGCTCGACTAGACTTG	
REST/EIk-1ΔC	forward CGATTACAAGGATGACGATGA	272
	reverse TGCCATTTACTTCCCCAGTTA	
SAP-1 (Maus)	forward ATGGACCCACTGACGGTAGG	250
	reverse CTGCTAGTTTTTCCGCTGGAT	
SAP-2 (Maus)	forward AGAGTGCAATCACGCTGTGG	230
	reverse GCCCGATCACTTTCTTGATGATG	
SRF	forward CCAGGTGTCGGAATCTGACAG	130
	reverse GCTGACTTGCATGGTGGTAGA	

2.2.5 Arbeiten mit RNA

2.2.5.1 RNA-Isolierung aus Säugerzellen

Die RNA der β -Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Microkits (Qiagen) isoliert. Die frisch isolierten Inseln wurden in 350 μ l RLT Plus Puffer, versetzt mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen und auf die Säule des Qiasredders gegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4°C wurde der Durchfluss auf die gDNA-Eliminator Säule gegeben, in der die genomische DNA entfernt und die RNA an die Säulenmembran gebunden wurde. Dies erfolgte in einem weiteren Zentrifugationsschritt von 30 sek. Zu dem Durchfluss wurde 1 Volumen 70%iges Ethanol gegeben und mit der Pipette vorsichtig durchmischt. Das Gemisch wurde auf die RNeasy MinElute Säule gegeben, 15 sek zentrifugiert und der Überstand verworfen. In den nachfolgenden Waschschrritten wurden Störfaktoren wie z.B. Ethanolreste entfernt. Es wurden zwei Waschschrritte durchgeführt, indem nacheinander je 700 μ l Puffer RW1, 500 μ l Puffer RPE auf die Säule gegeben wurde und je ein 15-sekündiger Zentrifugationsschritt erfolgte, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Im Anschluss wurde die Säule mit 500 μ l 80%igem Ethanol gewaschen und für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 2 ml Zentrifugationsgefäß gesteckt und die Membran der Säule in einem Zentrifugationsschritt 5 min getrocknet. Im Anschluss wurde die Säule erneut in ein frisches Reaktionsgefäß (1,5 ml) gesteckt und die RNA mit 14 μ l RNase-freiem H₂O bei 60 sek Zentrifugation eluiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Messung der RNA-Konzentration

Um die und Reinheit und die Konzentration der extrahierten RNA zu ermitteln, wurde eine 1:50 Verdünnung der RNA in einer 2 ml Küvette (Eppendorf) hergestellt und die optische Dichte (OD) mit Hilfe des Photometers (Biophotometer, Eppendorf) ermittelt. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Der Quotient von 260/280 nm diente hierbei als Indiz der Reinheit und sollte im Normalfall bei 2,0 liegen.

2.2.5.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA aus RNA mittels reverser Transkription wurde das Herstellerprotokoll der M-MuLV-Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus, Fermentas) verwendet. Es wurde 1 µg RNA und 1 µl Random Hexamer Primer (#SO142, ThermoFisher Scientific) eingesetzt. Es wurde mit DEPC-behandeltem H₂O ein Gesamtvolumen von 11 µl eingestellt. Der Ansatz wurde bei 65°C 5 min inkubiert und rasch auf Eis gestellt. Es wurde anschließend ein Ansatz bestehend aus 5x M-MuLV Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 50 mM DTT, 20 mM MgCl₂), 1mM dNTPs, 20 U RNase Inhibitor, 200U M-MuLV Reverse Transkriptase, und 1,5 µl DEPC-H₂O zugesetzt. Die Negativkontrolle enthielt statt der Reversen Transkriptase DEPC-Wasser. Das Gemisch wurde bei 20°C für 10 min, danach bei 42°C für 59 min und anschließend bei 70°C 5 min inkubiert. Die cDNA wurde entweder weiterverwendet (Abschnitt 2.2.6.1) oder bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6 Arbeiten mit DNA

2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur gezielten Amplifikation kurzer DNA-Abschnitte in vitro mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase (Saiki et al. 1988). Die synthetisierte cDNA wird wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben extrahiert und als Template eingesetzt um eine semiquantitative RT-PCR durchzuführen. Nach der reversen Transkription der cDNA enthielt der Ansatz zur PCR-1x Taq Polymerase Puffer, 500nM Primer forward und reverse, 0,25 mM dNTPs, 0,5 U Taq-Polymerase (#M0267S, New England Biolabs), und je 1 µl cDNA. Die Negativkontrolle enthielt dest. Wasser statt cDNA. Der Ansatz der RT-Reaktion wurde mit H₂O dest. auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und im Labcycler (Sensoquest) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 4: PCR-Programm nach reverser Transkription

Schritt	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
2. Denaturierung	95 °C	30 sek	} 30 x
3. Annealing	59 °C	30 sek	
4. Elongation	68 °C	30 sek	
5. Finale Elongation	68 °C	10 min	

Die Anzahl der Zyklen wurde der Expressionsstärke des Gens entsprechend angepasst. Die Zeiten zur Anlagerung der Primer und Elongation wurden je nach Fragmentgröße angepasst.

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde die genomische DNA aus Ohrbiopsien als Template eingesetzt. Der Ansatz zur Genotypisierungs-PCR enthielt 1xTaq Polymerase Puffer, 500nM Primer forward und reverse, 0,25mM dNTPs, 0,5U Taq Polymerase und je 2µl einer vorverdünnten DNA (2.2.5.3). Der Ansatz wurde mit H₂O dest. auf 25 µl aufgefüllt. Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgte im Labcycler (Sensoquest) unter den folgenden Bedingungen.

Tabelle 5: PCR-Programm von RIP-rtTA, REST/EIk-1ΔC und β-Gal zur Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
2. Denaturierung	95 °C	30 sek	} 30 x
3. Annealing	60 °C	30 sek	
4. Elongation	68 °C	60 sek	
5. Finale Elongation	68 °C	10 min	

Die amplifizierten Produkte wurden mit Hilfe eines Ethidiumbromid-angefärbten Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (s. Abschnitt 2.2.6.2).

2.2.6.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Das Agarosegel wurde durch Aufkochen der entsprechenden Agarosemenge in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat (pH 7,2) und 2 mM EDTA) hergestellt. Abhängig von der Fragmentgröße wurden 1-2%-ige Agarosegele angefertigt. Bei einer Temperatur von ca. 60° wurde die Agaroselösung mit 1,5µl Ethidiumbromid (5mg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Fragmente wurden unter UV-Licht bei 253 nm sichtbar gemacht. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde mit 1x TAE-Puffer übergossen und der Kamm wurde entfernt. Die Proben wurden mit 5µl Puffer (6x Loading Dye, Fermentas) versetzt und in die Taschen gefüllt. Es wurde eine Spannung von 80V von Kathode zu Anode angelegt. Die DNA-Fragmente wurden dadurch im Gel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Die Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und analysiert.

2.2.6.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation

Zur Transformation wurde der E.coli -Stamm XL-1 Blue verwendet. Die E.coli Bakterien wurden in LB-Medium (205 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton/Pepton, 4,96 g/l NaCl, gelöst in H₂O bidest., pH 7,2) bei 37°C kultiviert. Bei einer OD von 0.5-0.7 wurde das Wachstum und der Stoffwechsel der Bakterien gestoppt, indem ein fünfminütiger Kühschritt auf Eis erfolgte. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 6min, 4°C), und das Pellet in einem Drittel des Volumens in Transformationspuffer (30 mM Kaliumacetat, 100 mM KCl, 10,44% Glycerol, 50 mM Manganchlorid, pH 5.8) zugegeben, um das Pellet 10 min zu resuspendieren. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Danach wurde das Pellet in Puffer 2 (10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM Kalziumchlorid, 10,44% Glycerol, pH 6.5) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die kompetenten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.6.4 Transformation von Plasmiden in E.coli

Zur Transformation wurden 100 µl der kompeteten Bakterien aufgetaut und mit 20 µl eines Ligationsansatzes für 20 min inkubiert. Das Auftauen sowie die Inkubation erfolgte auf Eis. Für eine Transformation von Plasmid-DNA wurden 40 µl der Bakterien mit 100 ng der jeweiligen Plasmid-DNA in einem Polystyrolröhrchen mit Deckel 30 Minuten auf Eis inkubiert. Bei einem Hitzeschritt im Thermoblock (42°C, 2 min) nehmen die Bakterien die Fremd-DNA auf. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurden 300 µl LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 mg/ml) zur Selektion eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten + Ampicillin mit einem abgeflammtm Drigalsky-Spatel ausgestrichen, über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert und bis auf weiteres bei 4°C aufbewahrt.

2.2.6.5 Produktion und Isolierung von Plasmid-DNA (Maxiprep)

Von den transformierten Bakterien wurden die selektionierten Klone mit einer Plastikspitze gepickt und in einer Vorkultur in 10 ml LB-Medium 6-8 h angezogen. Davon wurde eine Übernachtskultur angesetzt, in der die Bakterien 1:500 in einem Endvolumen von 200 ml LB-Medium + Ampicillin (100 mg/ml) verdünnt und bei 37°C angezogen wurden. Anschließend wurden die Bakterienkulturen in 50 ml Röhrchen bei 4°C und 4000 xg für 20 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Plasmid -DNA wurde mit Hilfe des PureYield™ Maxiprep System (Promega, Mannheim) isoliert. Das Bakterienpellet wurde in 12 ml des Zellresuspensionspuffers aufgenommen und resuspendiert. Dann wurde das Pellet durch Zugabe von 12 ml Lysepuffer 3 min lysiert. Nach einem Neutralisationsschritt mit 12 ml Neutralisationspuffer wurde das Lysat 30 Minuten bei 10000g in einer Zentrifuge abzentrifugiert (Rotor JA-12, Beckmann Coulter J2-21). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Maxiprep-System von Promega nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde das Lysat durch Anlegen an eine Vakuumpumpe (Promega) über einen Filter vorgefiltert und an die Membran einer Säule gebunden. Um die DNA aufzureinigen, wurden Endotoxine entfernt und zweimal mit 20ml „Colum Wash“ Waschpuffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 1,5ml 1x TE Puffer (0,01 M

Tris/HCl, 0,001 M EDTA, pH 8,0, nach Sambrook et al. 1989 und Ausubel et al. 1995) eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.6.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli (Miniprep)

Um die Kulturen zu sichern, wurden 200 µl auf LB-Agarplatten (plus Ampicillin 100 mg/ml) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht angezogen. Der Rest der Flüssigkultur wurde in 14 ml Rundbodenröhrchen bei 4000 xg 15 Minuten abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 16000 xg. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA, frisch dazu: 10 mg/ml RNase A) aufgenommen und resuspendiert. Danach wurde das Pellet in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgenommen. Anschließend wurde 200 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) hinzugefügt und das Röhrchen mehrmals invertiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde 200 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) zugefügt und wieder invertiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Hierzu wurde 600 µl Phenol/Chloroform/iso-Phenylethanol (Mischungsverhältnis 25:24:1) hinzugegeben, mit Hilfe des Vortexers gemischt und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert. Es wurden 420 µl Isopropanol zupipettiert und gemischt. Anschließend wurde erneut bei 4°C 30 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und das Pellet wurde mit Ethanol (70%, v/v) gewaschen und erneut bei 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Evaporator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer (1 M Tris pH 7,4, 0,5 M EDTA) resuspendiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Um die richtige Ligation zu bestimmen erfolgte im Anschluss an die Phenol-Chloroform-Extraktion ein Restriktionsverdau eines 10 µl Aliquots über Nacht und eine Auftrennung und Analyse mit Hilfe eines Ethidiumbromid-angefärbten Agarosegels (s. Abschnitt 2.2.6.2).

2.2.6.7 Restriktionsverdau von DNA

Zur Kontrolle des richtigen Inserts wurde jede Plasmid-DNA einmalig vor Verwendung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für mindestens 2 Stunden bei 37°C verdaut und mit Hilfe eines 1,5%igen Ethidiumbromid-gefärbten Agaorsegels aufgetrennt. Dazu wurde folgender Restriktionsansatz verwendet:

Tabelle 6: Restriktionsansatz

--

1-2 µg DNA
5 U/µl Enzym A
5 U/µl Enzym B
1 µl Enzympuffer
6 µl H₂O dd.

Die Insertgrößen wurden im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und analysiert.

2.2.7 Lentiviraler Gentransfer in eukaryotische Zellen

2.2.7.1 Herstellung von Lentiviren

Alle lentiviralen Arbeiten wurden unter S2-Bedingungen durchgeführt. Zur Produktion der Lentiviren hat sich vor allem die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293/T17 als Verpackungszelllinie bewährt. Um rekombinante Lentiviren herzustellen, ist eine Kotransfektion dreier Plasmide notwendig: dem Transfervektor, $\Delta 8.91$ und pCMV-G (Thiel & Rössler 2007, Keim et al. 2012). Die verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 2.1.5.1 beschrieben. Am Tag vor der Transfektion wurden $1,6 \times 10^6$ HEK293/T17-Zellen auf 60mm x 15mm Zellkulturschalen ausgesät und 24h bei 37°C kultiviert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels photometrischer Messung der OD bestimmt und das einzusetzende Volumen errechnet. Die in dieser Arbeit verwendete Methode war die Kalziumphosphat-Transfektion (angelehnt an

Kaufmann et al 2001). Für die Transfektion wurde ein Ansatz aus zwei Lösungen verwendet. Lösung 1 bestand hierbei aus 2,3 µg des VSV-G-Expressionsplasmids, 5 µg des Packungsplasmids, 6,6 µg des Transfervektors, das mit H₂O dest. auf 250 ml aufgefüllt wurde. Der Lösung 1 wurde zusätzlich 27,5 µl eiskaltes CaCl₂ (2,5 mM) hinzugefügt. Lösung 2 setzte sich zusammen aus 275 µl 2x HBSS (274 mM NaCl, 3,75 mM Na₂HPO₄, 27,75 mM Glukose, 25 mM KCl und 105 mM HEPES; pH 7,08-7,09). Diese wurde langsam unter kontinuierlichem Sprudeln in Lösung 1 getropft. Eine Trübung des Gemischs ist hierbei ein Indiz für die erfolgreiche Bildung des Kalziumphosphat-Plasmid-Präzipitats. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgenommen und durch frisches ersetzt, das zuvor mit 25µM Chloroquin versetzt wurde. Das Chloroquin diente hierbei zur Steigerung der Transfektionseffizienz. Zu den Zellen wurde pro 60 mm Zellkulturschale 500 µl des Transfektionsansatzes gegeben. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen. Die Zellen erhielten nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS frisches Kulturmedium. Nach einer weiteren Inkubationszeit von drei Tagen wurde der Virus im Überstand isoliert und weiterverwendet.

2.2.7.2 Lentivirale Infektion von Säugerzellen

In dieser Arbeit wurden lentivirale Vektoren verwendet, durch die der zu analysierende Promotorabschnitt oder das zu exprimierende Gen stabil ins Genom der Zielzellen integriert wird. Lentiviren zählen zur Familie der Retroviren und sind in der Lage sowohl teilungsfähige als auch post-mitotische Zellen infizieren zu können. Sie dienen daher als optimale Genfähren. Vor der Infektion wurden ca. 200.000 293/TRPM3-Zellen in 35 mm x 16mm Zellkulturschalen ausgesät. Die virushaltigen Überstände der Verpackungszelllinie 293T/17 wurden isoliert und durch einen Spritzenfilter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert, um Zellreste zu entfernen. Zur Kontrolle der Infektionseffizienz wurde zusätzlich eine Schale mit ca. 200.000 Zellen mit einem Virus infiziert, das mit dem Referenzplasmid HIV-β-Gal hergestellt wurde (Kowolik und Yee 2002). Die infizierten Zellen exprimierten dadurch die β-Galaktosidase und wurden mit Hilfe einer X-Gal-Färbung nachgewiesen (s.2.2.8.8).

Der Virusansatz wurde mit 8 µg/ml Polybrene versetzt und das Gemisch wurde auf die zu infizierenden 293/TRPM3-Zellen gegeben. Die Zugabe von Polybrene erleichtert die Adsorption der Viruspartikel an der Zelloberfläche. Nach einer Inkubationszeit von 16-24 h im Inkubator wurden die Virusüberstände abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden zum Transgennachweis nach 72 h nach Abschnitt 2.2.8.1 geerntet oder zur Reporteranalyse erst serumreduziert und am folgenden Tag für weitere 20 -24 h stimuliert und geerntet (s. Abschnitt 2.2.8.1). Um die exprimierten Proteine und Reportergene hinsichtlich ihrer Regulation durch TRPM3 und anschließende intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, wurden verschiedene Stimuli und Inhibitoren verwendet. Da die Stimulation durch Bestandteile des FCS wie z.B. Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, wurde 24h vor Stimulation das Medium durch serumreduziertes Medium (0,05% FCS) ersetzt.

2.2.7.3 Reporteranalyse

Mit Hilfe von Reporteranalysen wird die Expression der zu analysierenden Gene in Säugerzellen (Alam & Cock 1990) nachgewiesen. Dazu wird das Reportergen in die kodierende Sequenz des zu analysierenden Gens kloniert und vom selben Promotor gesteuert. Die Aktivierung des Reportergens ist somit ein messbarer Nachweis für die Aktivierung des zu analysierenden Gens. In dieser Arbeit wurde das biolumineszente Enzym Luziferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) als Reportergen verwendet. Die Zellen wurden wie beschrieben infiziert und geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 µl 1x Reporterlysepuffer auf Eis aufgeschlossen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 13000 xg bei 4 °C wurde je 5 µl des im Überstand enthaltenen Gesamtzellextraktes in die Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde) pipettiert. Zu den Proben wurde je 50 µl „Working Luciferase Assay“-Reagenz, bestehend aus 9 Vol. „Luciferase Assay Reagent Stock“ (22 mM Tricine pH 7,8, 2,94 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0,11 mM EDTA (Natriumsalz), 1,177 mM (MgCO₃)₄Mg(OH) 2x 5 H₂O, 36,3 mM DTT, 583 µM ATP, 297µM Coenzym A₁), versetzt mit 1 Vol. 4,7 mM Luziferin) pipettiert. Bei Zugabe des Substrates D-Luziferin, katalysiert die Luziferase die Oxidation des Luziferins zu Oxyluziferin, was in der Emission von Licht resultiert (λ=562 nm) (Wood et al 1989;

Abbildung 10). Bei Substratüberschuss steht diese Emission proportional zur Luziferasekonzentration in der Probe (de Wet et al. 1987). Die Luziferaseaktivität wurden unverzüglich mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Detection System) gemessen und mit dem Programm Simplicity-Photocounter erfasst. Die Umsetzungsreaktion von D-Luziferin durch die Luziferase ist in Abbildung 10 gezeigt.

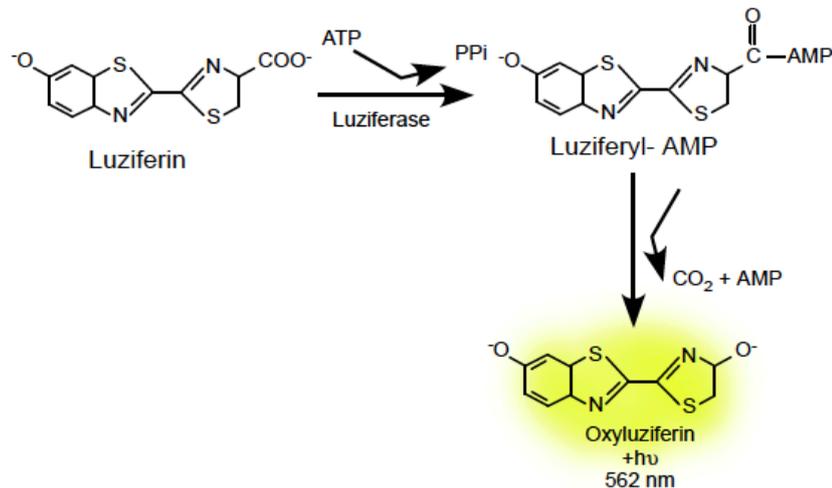


Abbildung 10: Schema des Reaktionsprinzips des Luziferase-Assays

Das Substrat D-Luziferin wird durch die Luziferase unter Abspaltung von Kohlendioxid (CO₂) zu Oxyluziferin umgewandelt, das in der Emission von Lichteinheiten resultiert (modifiziert nach Wood et al. 1989).

Anhand der gemessenen Lichteinheiten konnten Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen werden. Die relative Luziferaseaktivität (rlu) konnte ermittelt werden, indem die gemessene Luziferaseaktivität (lu) durch die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe dividiert wurde.

$$\text{relative Luziferaseaktivität (rlu)} = \frac{\text{gemessene Lichteinheiten (lu)}}{\text{Gesamtproteingehalt (\mu\text{g})}}$$

Jeder Infektionsansatz wurde vierfach gemessen und ein Mittelwert gebildet. Daraus wurde die Standardabweichung errechnet. Die Ergebnisse wurden grafisch in einem Balkendiagramm dargestellt.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1 Ernte der Zellen

Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde von den Zellkulturschalen abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS aufgenommen und vom Boden der Schale mit Hilfe von Zellschabern (Sarstedt) gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 xg bei 4°C wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde zur Analyse der Reportergene nach Abschnitt 2.2.7.3 oder zur Präparation der Kernproteine weiterverwendet. Alternativ wurde das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8.2 Extraktion von Kernproteinen

Nach der Isolation (nach Abschnitt 2.2.8.1) wurden die Zellpellets in 100 µl Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5% Nonidet P40 (v/v) und 40 µl/ml Complete 25x (modifiziert nach Schreiber et al 1989)) aufgenommen und mechanisch lysiert. Nach 30 minütiger Lyse auf Eis erfolgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000 xg, um die Kerne von den restlichen Zellbestandteilen im Überstand zu trennen. Um die Zellkerne aufzuschließen wurde das Pellet in Puffer C (10 mM HEPES-KOH, pH7,9, 420 mM NaCl, 25% Glycerin (v/v), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 40 µl/ml Complete 25x) resuspendiert und erneut mechanisch aufgeschlossen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Überstände in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 µl des Überstandes für die Proteinbestimmung eingesetzt. Der Rest des Extraktes wurde mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Stoppuffer (1:1) versetzt (Stock: 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 3 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol; 9% SDS, versetzt mit 0,05% Bromphenolblau. (Gebrauchslösung bestehend aus 9 Vol. 2x SDS-Stoppuffer und 1 Vol. β-Mercaptoethanol) und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8.3 Extraktion von Zytoplasmaproteinen

Um die zytoplasmatischen Proteine zu präparieren, wurden die geernteten Zellen in 100 µl Puffer A zur Kernextraktion, wie in Abschnitt 2.2.8.2 beschrieben, aufgeschlossen. Nach 30 minütiger Lyse auf Eis wurden durch Zentrifugation bei 13000 xg und 4 °C die Kerne von den Zytoplasmabestandteilen im Überstand getrennt. Dieser wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je 5 µl der Extrakte wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach 2.2.8.2 verwendet. Die restlichen Extrakte wurden in einem 1:1-Verhältnis mit 2x SDS-Stoppuffer (plus 10% β-Mercaptoethanol) versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der präparierten Proteinmenge in dem Zellextrakt erfolgte mit Hilfe eines BCA-Assays. Dieser kolorimetrische Assay zur Proteinbestimmung besteht aus einer Kombination der Biuret Methode und Bicinchoninsäure (BCA), der erstmals von Smith et. al. 1985 beschrieben wurde. Die zweiwertigen Kupferionen reagieren unter alkalischen Bedingungen und in Abhängigkeit der Temperatur mit den Peptidbindungen der Proteine zu einwertigen Kupferionen. Die einwertigen Kupferionen bilden weiterhin mit je zwei Molekülen der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex. Die Absorption wurde im Photometer bei 562 nm gemessen und ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration der Probe. In Abbildung 11 ist schematisch der Reaktionsverlauf gezeigt. Zur Proteinbestimmung wurden je 5 µl des Probenüberstandes in die Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl BCA Reagenz (BCA Assay Kit, Interchim,) versetzt. Die Proben wurden 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde durch Messen der Absorption bei 562 nm bestimmt durch Erstellen einer Standardkurve durch die Analysesoftware von BioRad. Als Standardwerte wurden BSA Lösungen in den Konzentrationen 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml verwendet.

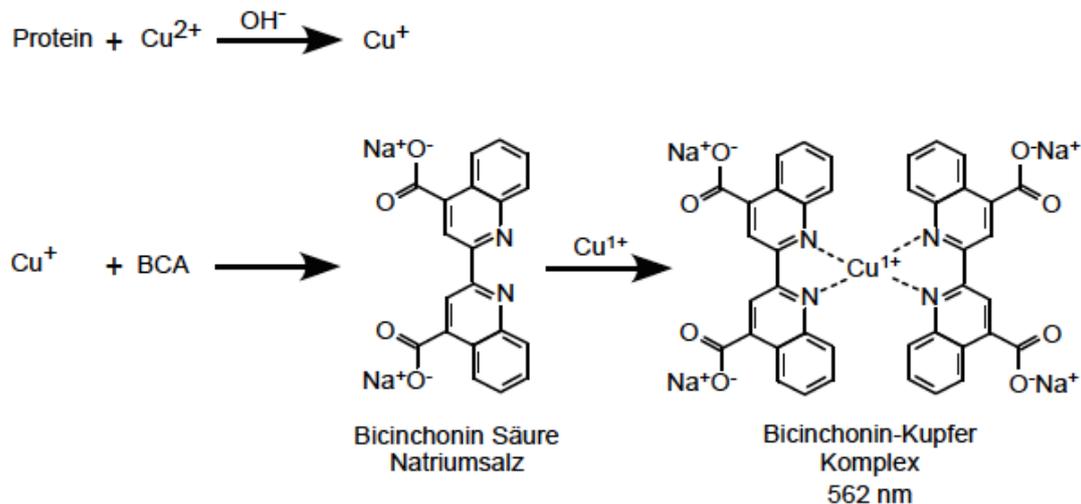


Abbildung 11: Schema des Reaktionsprinzips des BCA-Assays

In einem ersten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen reduziert, die wiederum mit der Bicinchoninsäure-Reagenz einen violetten Farbkomplex bilden (Smith et al. 1985).

2.2.8.5 Denaturierende diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe nach aufzutrennen wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dieses System ermöglicht eine optimale Trennung von Proteinen, deren Molekülmasse zwischen 5 und 250 kDa liegt. Ein Vorteil der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese ist eine hohe Bandenschärfe. Dabei werden die Proteine an die anionische Substanz Natriumdodecylsulfat (SDS) gebunden und wandern im Gel proportional zu ihrem Molekulargewicht. Zur Polymerisation der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung wurden beide Gele mit Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10%) und TEMED versetzt. Hierzu wurde zuerst das 10%ige engporige Trenngel in eine Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem Auspolymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das weitporige Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Taschenkamm eingesteckt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 7 dargestellt. Nach Auspolymerisation beider Gele wurde die Gummidichtung zwischen der Glasplatten entfernt und die Gelkammer mit 1x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris pH 8,3, 2,5 M Glycin, 1% SDS, Laemmli et al. 1970) gefüllt und der Kamm entfernt. Die Proben wurden mit 2x SDS-Stoppuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Es wurden 10 - 20 µg der Probe in die Geltaschen geladen. Als Marker wurden der „Prestained

Protein Molecular Weight Marker“ von Fermentas verwendet. Bis die Proben das Trenngel erreichten wurde eine Spannung von 65 V angelegt. Danach wurde auf 90 V erhöht.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels

--

4,2 ml H₂O
3,3 ml 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)
2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
100 µl 10% SDS (0,4%) (w/v)
100 µl 10% APS

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels

--

3,2 ml H₂O
750 µl 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)
1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8
50 µl 10% SDS (0,4%) (w/v)
100 µl 10% APS
10 µl TEMED

2.2.8.6 Western Blot Analyse

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der denaturierten Proteine wurden diese vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. In dieser Arbeit wurde ein Flüssigtransfer-Verfahren angewendet. Dazu wurde die Blotting-Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments, San Francisco verwendet. Die negativ geladenen Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-

Membran übertragen. Für den Proteintransfer wurde eine Stromstärke von etwa 250 mA angelegt. Die Transferzeit betrug etwa 150 min. Es wurde eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm, 140 µm Dicke) verwendet. Die Whatman-Papiere und die Nitrocellulose-Membran wurden vor Zusammenbau mit Transferpuffer angefeuchtet. Die Nitrocellulose-Membran und das SDS-Gel wurden zu beiden Seiten mit je 3 Lagen angefeuchtetem Whatman-Papier (2mm) bedeckt. Das „Sandwich“ wurde in die Blottingapparatur eingespannt und diese mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) befüllt. Die Seite der Membran wurde zu der Anode hin und das SDS-Gel zur Kathode eingespannt. Die Proteine wurden durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Um die vollständige Übertragung der Proteine zu überprüfen wurde die Nitrocellulose-Membran mit 1ml Ponceau-S-Lösung angefärbt (Sigma-Aldrich, 1:20 mit H₂O verdünnt). Im Anschluss wurde die Membran zweimal 5 min und einmal 10 min mit 1x TBST (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl mit 0,1% Tween 20) gewaschen.

2.2.8.7 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Nachdem die Proteine auf die Membran transferiert wurden, wurde die Membran vor der Antikörperinkubation zur Blockierung unspezifischer Bindestellen für mindestens 30 min bei RT mit Blocking-Lösung aus 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem in TBST verdünnten Primärantikörper (Tabelle 1) über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 x 20 min auf einem Wipptisch mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:10000 in TBST) 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 15 min mit TBST gewaschen. Die Proteine wurden mit Hilfe des „Enhanced Chemoluminescence Reaction“ (ECL) -System nachgewiesen. Die Entwicklerlösung wurde 1:1 aus zwei ECL-Lösungen hergestellt; Lösung 1 bestand aus 100 mM Tris pH 8,5) und Lösung 2 aus 5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 400 µM para-Coumarsäure (Roth). Die Lösung wurde gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und es erfolgte eine Lichtemission, die mit Hilfe des ChemiDoc XRS+ Imaging System und

der Quantity One 1-D Analysesoftware (BioRad) detektiert werden kann. Die Chemilumineszenz wurde detektiert und die spezifischen Proteine mittels Proteinmarker identifiziert.

2.2.8.8 X-Gal-Färbung

Um die Aktivität der β -Galaktosidase qualitativ zu bestimmen, wurde eine Färbung durchgeführt, bei dem die Substanz X-Gal als künstliches Substrat des Enzyms β -Galaktosidase eingesetzt wird. Diese spaltet das X-Gal zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-bromo-4-chloro-Indoxyl. Für die Färbung der 293/T17-Zellen wurden die Zellen nach 2.2.8.1 geerntet und durch Zugabe von 4% Paraformaldehyd in 1x PBS 10 min fixiert und erneut gewaschen. Die frisch angesetzte X-Gal-Färbelösung (5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/l X-Gal (Stock 30mg/ml in DMSO)) wurde auf die Zellen gegeben und bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert, bis eine visuelle Blaufärbung der Zellkerne zu sehen war.

Die Färbung der frisch gepickten, vereinzelt Inselzellen erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise direkt in der 24-Loch Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One). Die Inseln wurden unter einem Lichtmikroskop dokumentiert und bei 4°C gelagert.

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte direkt auf dem Objektträger, indem pro Schnitt 30 μ l der X-Gal-Färbelösung auf den Gewebeschnitt pipettiert wurden. Die Schnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Gegenfärbung mit 0,1% Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Roth, Karlsruhe) um die Zellkerne sichtbar zu machen. Dazu wurde nach Entfernen der X-Gal-Färbelösung die Schnitte 5 min in H_2O dest. gewaschen und anschließend für 2 min in Kernechtrot gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit H_2O dest abgewaschen. Die Schnitte wurden unter Verwendung von Glycerin-Gelatine eingedeckelt. Die Färbung wurde lichtmikroskopisch dokumentiert.

2.2.9 In vivo-Analyse Maus: Charakterisierung des transgenen Mausmodells RIP-rtTA[tetO]₇REST-EIk-1ΔC

2.2.9.1 Maushaltung

Die Haltung und Versorgung der Mäuse erfolgte in den Räumen der Klinisch-Experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums Homburg/Saar. Die Haltung der Tiere entsprach hierbei den EU-Richtlinien der Tierschutzgenehmigungen (NIH Publication #85-23 Rev. 1985). Die Tiere wurden in keimfreien und klimatisierten Makrolonkäfigen mit Einstreu bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50-60% und einer Lufttemperatur von 20-24°C gehalten. Der Tag/Nachtrythmus betrug 12h/12h. Die Mäuse hatten ständigen Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Wasser. Die Durchführung der Experimente sowie die Haltung der Tiere wurden von der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. M. Frings (Universität des Saarlandes) beaufsichtigt. Die Genehmigung der Tierversuche gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt Homburg/Saar (AZ: K110/180-07) lag vor.

Für die Versuche wurden C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter verwendet. Das Alter der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 9-12 Wochen, was einem Körpergewicht von 18-25 g entsprach. Das Trinkwasser der Versuchstiere wurde mit Doxzyklin (1g/l) in 0,8% Sukrose versetzt. Die Kontrolltiere erhielten nur Sukrose mit dem Trinkwasser.

2.2.9.2 Mausmodell: Das Tetrazyklin System

Die Entwicklung und der Einsatz eines regulierbaren Systems zur Analyse und Kontrolle der Genexpression *in vivo* bringt spezielle Anforderungen an das System mit. Es sollte reversibel an- und induzierbar sein, geringe Basalexpression zeigen, und keine toxischen Effekte für den Organismus nach sich ziehen. Zudem sollte der Induktor universell zellgängig sein und der Regulator muss seine Liganden mit hoher Spezifität binden. Das in dieser Arbeit verwendete Tetrazyklin-regulierte System wurde erstmals von Gossen und Bujard 1992 beschrieben und ist heute das am häufigsten angewandte. Anders als das Tetrazyklin-regulierte System nach Hillen et al. 1983, das nur regulatorische Elemente des natives Tet-Operons aus *E.coli*.

benutzt, wird bei diesem System ein Fusionsprotein als Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (tTA) aus dem für die Transkription verantwortliche Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus (HSV) und dem Tetrazyklin-Repressor (TetR) verwendet. In den verwendeten Promotor wurden sieben Kopien des TetO-Sequenz (TetO)₇ inseriert. Bei dem Tet-On System wurde in dem Fusionsprotein durch Austausch von vier Aminosäuren in der DNA-Sequenz des Tet-Repressors dessen Bindungseigenschaften so verändert, so dass dieser nur in Anwesenheit von Tetrazyklin oder des Derivates Doxyzyklin an das Tet-Operon binden und die Expression des Zielgens initiieren kann. In Abwesenheit des Induktors wird die Bindestelle blockiert. Dieses Fusionsprotein wurde als reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (rtTA) bekannt. In Abbildung 12. ist eine Übersicht über das Tetrazyklin-regulierte Tet-On System gezeigt.

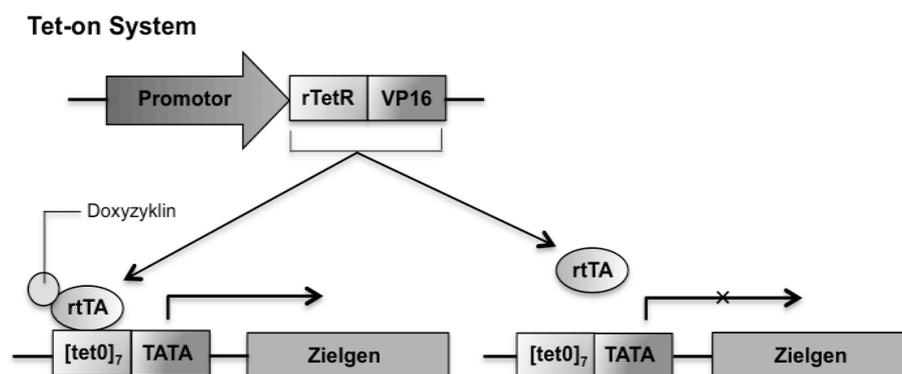


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Tetrazyklin-Systems

Tet-On-System: Es wurde die Transkriptions-aktivierende Domäne des HSV-VP16 an den mutierten Tetrazyklin-Repressor fusioniert, um den reversen Tet-abhängigen Transaktivator (rtTA) zu erhalten. In Anwesenheit von Tet/Dox bindet der rtTA an das Tet-Operon und die aktiviert die Transkription des Zielgens. In Abwesenheit von Tet/Dox findet keine Expression statt (angelehnt an Gossen und Bujard 1992, modifiziert nach Kohan 2008).

2.2.9.3 Generierung doppelt-transgener RIP-rtTA[tetO]₇REST-EIk-1ΔC

Um doppelt-transgene RIP-rtTA[tetO]₇REST-EIk-1ΔC-Mäuse zu generieren, wurden Mäuse der [tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Linie mit der RIP-rtTA-Linie verpaart, die den reversen Tetrazyklin-Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Insulin II Promotors der Ratte (RIP) exprimieren. Dadurch wurde sichergestellt, dass die

Mutante des Transkriptionsfaktors Elk-1: REST/Elk-1 Δ C, unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators ausschließlich in den β -Zellen des endokrinen Pankreas und nur nach Gabe von Doxyzyklin exprimiert wurde. Das Kreuzungsschema ist Abbildung 69 B gezeigt.

In dieser Arbeit wurde mit Mäusen gearbeitet, die den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Insulin-II-Promotors aus der Ratte selektiv in den β -Zellen des Pankreas exprimieren. Die RIP-rtTA-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Hussain (Johns Hopkins University, Baltimore) zur Verfügung gestellt. Die [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C-Mauslinie, die eine dominant-negative Form von Elk-1 trägt, wurde von Herrn Dr. Rößler hergestellt und freundlicherweise von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

2.2.9.4 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der doppelt-transgenen Mäuse wurde DNA aus Ohrbiopsien von drei-vier Wochen alten Mäusen gewonnen. Die Biopsien wurden in 200 μ l Lysepuffer (5 g Chelex-100 Resin, BioRad, 0,5% Natrium-Lauroylsarcosin, 0,1 M NaCl, modifiziert nach Walsh et al. 1991), mit 20 μ l Proteinase K (10mg/ml, frisch dazu), aufgenommen und bei 55°C über Nacht verdaut. Die Proben wurden 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Proteinase K wurde bei 95°C für 10 min inaktiviert. Es wurde erneut zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene genomische DNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit H₂O ddest. 1:5 verdünnt und je 2 μ l pro Ansatz zur PCR (2.2.6.1) verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Lage der Primer und die Größe des Amplifikates sind in Abbildung 9 dargestellt.

2.2.9.5 Dissektion des Pankreas und Isolierung von Inseln

Es wurden ausschließlich in der Genotypisierung positiv getestete doppelt-transgene RIP/rtTA[tetO]₇REST-Elk-1 Δ C Mäuse zwischen 10-14 Wochen verwendet. Die Tiere wurden mit Isofluran (100 %Forene[®] v/v, Baxter) anästhesiert und durch Überstreckung getötet. Alle chirurgischen Arbeiten wurden unter semi-sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Tiere wurden ausgestreckt und in Rückenlage auf einer sauberen Unterlage mit Klebeband an allen vier Extremitäten fixiert. Das

Bauchfell wurde mit Ethanol (70%) befeuchtet. Um das Abdomen zu öffnen, wurde unter einem Binokular eine mediane Laparotomie durchgeführt. Die Organe wurden mehrmals mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurde der gemeinsame Ausführgang von Pankreas und Gallenblase mit einem angefeuchteten Wattestäbchen freigelegt. Der Ausführgang wurde zu beiden Seiten ligiert. Mittels einer Polyethylenkanüle wurde durch retrograde Injektion eine 0,5%igen BSA-1x HBSS-Lösung, mit Kollagenase P (1,3 mg/ml) und Neutralrot (0,1 mg/ml), injiziert (modifiziert nach Gotoh et al. 1987). Das aufgeblähte Pankreas wurde entnommen und für 3-4 Minuten im Wasserbad bei 37°C verdaut. Die heterogene Suspension wurde mehrmals mit 1x HBSS gewaschen und auf Eis sedimentiert. Die obere Phase wurde verworfen und die untere Phase, in der sich die Inseln befanden, wurde in eine Petrischale überführt. Die rot angefärbten Inseln wurden von Hand unter einem Mikroskop gepickt und in einem frischen 1,5 ml Gefäß auf Eis gesammelt. Die Inseln wurden sofort zur X-Gal-Färbung bzw. zur RNA-Isolierung weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren. Die Methode der retrograden Injektion ist schematisch in Abbildung 13 gezeigt.

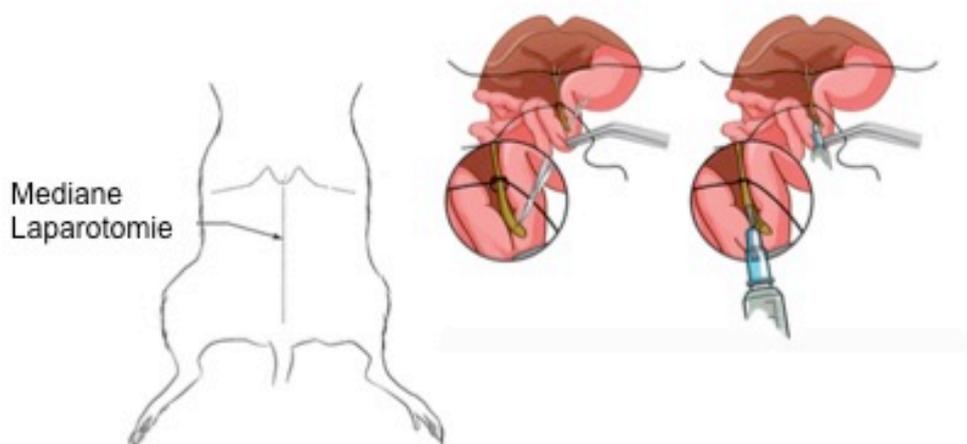


Abbildung 13: Schematische Darstellung der retrograden Injektion zur Dissektion des Pankreas.

10-14 Wochen alte RIP/rTA[tetO]₂/REST-Elk-1ΔC Mäuse wurden in Rückenlage fixiert und das Bauchfell mit Ethanol angefeuchtet. Mit einer medianen Laparotomie wurde der Bauchraum geöffnet

und der Ductus pancreaticus freigelegt und zu beiden Seiten abgeschnürt. Durch eine retrograde Injektion mit wurde das gesamte Pankreas mit einer 1x HBSS-Lösung (0,5% BSA), versetzt mit Kollagenase P (1,3mg/ml) und Neutralrot (0,1mg/ml) aufgebläht und entnommen. Die Organe wurden während der Präparation mehrmals mit Natriumchloridlösung (0,9%) angefeuchtet (Abbildung modifiziert nach Stull .et. al. 2012).

2.2.9.6 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Die Methode beruht auf der amperometrischen Messung der Dehydrierung von D-Glukose in D-Gluconolaktone, katalysiert durch das Enzym Glukose-Dehydrogenase. Hierzu wurde den Tieren von Geburt an bis zu einem Alter von 10 -12 Wochen Doxzyklin oral über Trinkwasser (1 mg/l), versetzt mit 0,8% Sukrose aufgrund des bitteren Geschmacks verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Sukrose. Die RIP-rtTA[tetO]₇REST-EIk-1ΔC Mäuse wurden mindestens 6h vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt und das Käfigstreu wurde gewechselt. Während des gesamten Versuches erhielten die Tiere Wasser ad libitum. Das Körpergewicht der Tiere wurde auf die erste Nachkommastelle bestimmt und 2mg/g Glukoselösung intraperitoneal injiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseinjektion wurde den Tieren mit Hilfe einer sterilen Lanzette Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Glukosekonzentration im Serum aus Vollblut (modifiziert nach Andrikopoulos et al. 2008) mit Hilfe des Glucometers AccuCheck® SensorComfort (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt. Die Werte wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel anhand einer Grafik dargestellt, verglichen und die Signifikanz ermittelt. Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve berechnet (nach Bender et al. 1994, Tai 1994).

2.2.9.7 Histologie

Das entnommene Pankreas wurde abhängig von den weiteren Analysen entweder für Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder um Paraffinschnitte anzufertigen in 4% Formaldehyd fixiert.

Zur histochemischen X-Gal-Färbung des pankreatischen Gewebes wurden Gefrierschnitte angefertigt. Das entnommene Pankreas wurde in TissueTek®

eingebettet und unverzüglich in Einbettkassetten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebe wurden bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM1900) wurde von dem gesamten Organ $5\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden vor X-Gal-Färbung (Abschnitt 2.2.7.7) 45 min bei RT getrocknet. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit einer 0,1%igen Kernechtrotlösung.

Zur morphometrischen Analyse des Pankreas wurden $5\mu\text{m}$ dicke Paraffinschnitte angefertigt indem das entnommene Pankreas in Einbettkassetten für mindestens 24h in 4% Formaldehyd fixiert wurde. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica SM2000R) wurden etwa 400 Serienschritte zu je $5\mu\text{m}$ Dicke angefertigt, die auf Objektträger (76x26mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG., Braunschweig) fixiert wurden. Die Schnitte wurden einer HE-Färbung unterzogen (nach Avwioro 2011). Hämatoxylin färbt dabei saure/basophile Strukturen blau (DNA & Zellkerne), während Eosin basische/azidophile Strukturen (Zytosolproteine) anfärbt. Zur Vermeidung einer Doppelinterpretation wurde jeder zehnte Schnitt analysiert und ausgewertet. Die Schnitte sowie die Färbung des Gewebes wurden von Frau Janine Becker am Institut für Experimentelle Chirurgie angefertigt.

2.2.9.8 Bestimmung der β -Zellfläche

Zur Bestimmung der β -Zellfläche wurden Paraffinschnitte des Kopf-, Mittel- und Schwanzstücks des Pankreas angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Das Gewebe wurde mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Lösung angefärbt. Zur Vermeidung einer Doppelinterpretation wurde jeder sechste Schnitt analysiert und die Fläche der einzelnen Inseln in mm^2 mit Hilfe eines BZ-8000-Mikroskops (Keyence, Osaka, Japan) bestimmt (nach Hussain et al. 2006). Es wurden pro Organ circa 50 Inseln ausgewertet und ein Mittelwert bestimmt.

2.2.9.9 Statistik

Die statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel und zur grafischen Darstellung Microsoft Powerpoint verwendet. Die statistische Analyse

erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen, gepaarten studentischen t-Tests. Eine statistische Wahrscheinlichkeit wurde als signifikant angegeben und dargestellt, wenn *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 angezeigt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Signalkaskade und der aktivierten Transkriptionsfaktoren nach Pregnenolonsulfat-Stimulation des TRPM3-Kanals.

3.1.1 Das HEK293/TRPM3-Zellsystem

Die Stimulation von endogenen TRPM3-Kanälen mit dem Neurosteroid Pregnenolonsulfat bewirkt eine Aktivierung der Genexpression in Insulinomazellen. Dieser Effekt konnte durch Nifedipin, einem Inhibitor von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, unterbunden werden (Mayer et al. 2011). Da Insulinomazellen sowohl TRPM3-als auch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle exprimieren, sind sie als Modellsystem zur Analyse TRPM3-vermittelter Signaltransduktion ungeeignet.

Um sicherzustellen, dass bei der Untersuchung einer TRPM3-induzierten Signalkaskade eine Interferenz durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ausgeschlossen werden kann, wurde eine TRPM3-exprimierende HEK293-Zelllinie verwendet. Diese Zellen besitzen keine L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Das Modellsystem hat zudem den Vorteil, dass die Expression der TRPM3-Kanäle nur nach Zugabe von Tetrazyklin induzierbar gesteuert werden kann.

In TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen induziert Pregnenolonsulfat einen Ca^{2+} -Einstrom unabhängig von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, (Wagner et al. 2008, Majeed et al. 2010). Diese Beobachtung zeigt, dass der TRPM3-Kanal in einem heterologen System als Liganden-aktivierter ionotroper Rezeptor wirkt und bei Aktivierung ein Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol erfolgt. Auf Grundlage dessen wurde in dieser Arbeit mit dem HEK293/TRPM3-Zellsystem gearbeitet.

In einem ersten Experiment wurde die Induzierbarkeit der TRPM3-Expression in diesem Modellsystem überprüft. Dazu wurden die HEK293T-Zellen mit Tetrazyklin stimuliert um die Induktion der TRPM3-Expression zu initiieren. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation geerntet und die Expression verfolgt. In Abbildung 14 ist zusehen, dass eine Tetrazyklin-abhängige Induktion der TRPM3-Expression in den verwendeten HEK293/TRPM3-Zellen nachgewiesen

wurde. Basierend auf der deutlich stärkeren Expression ab einem Zeitpunkt von 4-24h wurde für weitere Experimente eine Tetrazyklin-Stimulation von 24h gewählt.

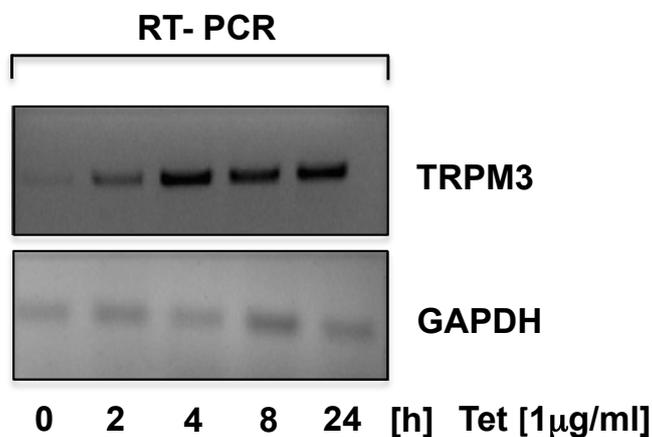


Abbildung 14: Tetrazyklin-abhängige Expression von TRPM3 in HEK293/TRPM3-Zellen.

Die HEK293/TRPM3-Zellen wurden 24h in Medium, versetzt mit 0,05% FCS, kultiviert und anschließend mit Tetrazyklin (1µg/ml) zur Induktion der TRPM3-Expression stimuliert. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 8 h nach Stimulation geerntet. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrollwert 0. Die RNA wurde extrahiert und in einer RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer analysiert. Als Ladekontrolle diente die Expression der GAPDH, amplifiziert mit spezifischen PCR-Primern.

3.1.2 Reportergene dienen als Sensoren zur Messung der AP-1-und Egr-1-Aktivität

Die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat induziert in Insulinomazellen eine Signalkaskade, die zur Aktivierung von AP-1-und Egr-1-führen (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011). Diese beiden Transkriptionsfaktoren werden durch mehrere extrazelluläre Stimuli aktiviert und stellen die Verbindung von extrazellulärer Stimulation bis zur Änderung des zellulären Genexpressionsmusters dar. Um die TRPM3-induzierte Signaltransduktion zu analysieren, wurden Reportergene als Sensor verwendet. Diese Vorgehensweise impliziert, dass die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels durch Aktivierung des TRPM3-Kanals

ausreichend ist um eine Signalkaskade zu induzieren, die das Ca^{2+} -Signal bis hin zum Nukleus transloziert um dort eine Veränderung der Genexpression zu bewirken. Um die zelluläre Aktivität messen zu können, wurde ein Reporterogen als Sensor verwendet, das das Enzym Luziferase unter der Kontrolle des humanen Kollagenase-Promotors exprimiert (dargestellt in Abbildung 15 A). Dieser Kollagenase-Promotor besitzt in der proximalen Region eine Bindestelle für AP-1 und wird aus diesem Grund oft benutzt, um die AP-1-Aktivität zu kontrollieren (Steinmüller et al. 2001, Thiel und Rößler 2011, Thiel et al. 2012). Die Bindestelle für AP-1, auch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)-responsives Element (TRE) genannt, umfasst die Sequenz 5'-TGAGTCA-3' innerhalb des Kollagenasepromotors (Abbildung 15 A).

Außerdem wurde die Aktivität des Zinkfingertranskriptionsfaktors Egr-1 gemessen. Um dessen Aktivität zu detektieren, wurde ein Egr-1-responsives Luziferase/Promotor-Reporterogen, EBS2⁴.luc (Abbildung 15 B), verwendet. Die integrierte Transkriptionseinheit kodiert für die Luziferase unter der Kontrolle eines minimalen Promotors, der vier Bindestellen für Egr-1 besitzt.

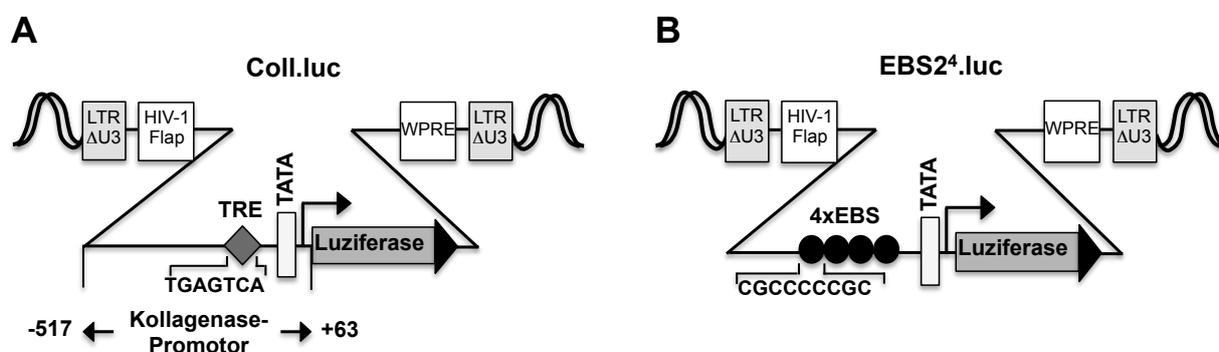


Abbildung 15: Reporter gene zur Detektion der AP-1- bzw. Egr-1-Aktivitäten.

A Schema des integrierten Coll.luc-Reportergens, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase Reporterogen (Coll.luc) kodiert. Die Sequenz und die Lage des 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsiven Elementes (TRE) innerhalb des Kollagenase-Promotors ist eingezeichnet. **B** Schema des integrierten Provirus, das für ein Egr-1-sensitives Luziferase-Reporterogen (EBS2⁴.luc) kodiert. Die Sequenz der Egr-1-Bindestelle (EBS) innerhalb des Egr-sensitiven Promotors ist gezeigt. **A, B** Die U3-Regionen des 5'LTR der Transfervektoren sind deletiert. Das „woodchuck hepatitis virus post-transcriptional-element“ (WPRE) sowie das HIV-Flap Element sind gezeigt.

3.1.3 Das TRE innerhalb des Kollagenase-Promotors dient als Sensor der AP-1-Aktivität

Um die AP-1 Aktivität zu messen, wurde durch lentivirale Infektion ein Reporterogen stabil ins Chromatin der Zellen integriert, das das Enzym Luziferase unter der Kontrolle des humanen Kollagenase-Promotors exprimiert. Der Kollagenase-Promotor besitzt ein TRE (Angel et al. 1987, Müller et al. 2011), das zur Bindung von AP-1 dient (Steinmüller et al. 2001, Thiel und Rößler 2011, Thiel et al. 2012). Es wurde überprüft, ob das TRE im Kollagenase-Promotor als Sensor für die AP-1-Aktivität verwendet werden kann. In Abbildung 16 A ist eine schematische Darstellung des integrierten Provirus gezeigt; die Wildtyp-Sequenzen 5'-TGAGTCA-3' sowie die Sequenz des mutierten TREs 5'-TGATAGT-3 sind dargestellt. Die Zellen TRPM3-Kanal-exprimierenden Zellen wurden nach Infektion mit Tetrazyklin behandelt (1 µg/ml). Anschließend wurden sie 24h serumreduziert (0,05% FCS) und mit Pregnenolonsulfat (20 µM) stimuliert. Abbildung 16 B zeigt eine erhöhte Expression des Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergens nach Stimulation des TRPM3 in HEK293-Zellen. Dieser Effekt wurde durch die Mutation des TREs aufgehoben. Durch dieses Ergebnis wurde das TRE als das responsive Element nach Pregnenolonsulfat-Stimulation in HEK293/TRPM3-Zellen identifiziert und der Kollagenase-Promotor konnte als Sensor für die AP-1-Aktivität bestätigt werden..

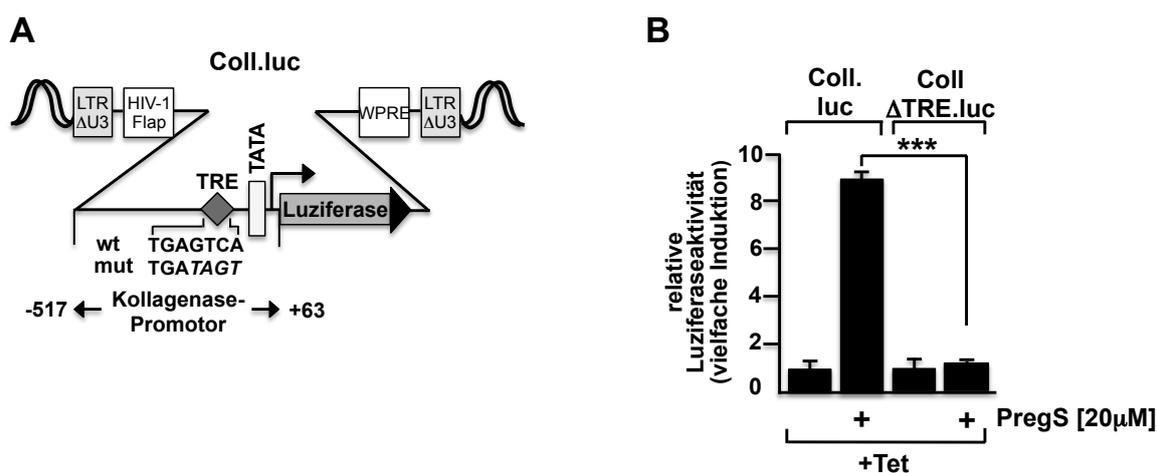


Abbildung 16: Das TRE dient als Sensor für die AP-1-regulierte Transkription in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen.

A Schematische Darstellung des Coll.luc-Provirus. **B** HEK293 Zellen, die ein Tetrazyklin-induzierbare TRPM3 Transkriptionseinheit besitzen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen kodierte, das ein intaktes bzw. mutiertes TRE beinhaltet, infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit 20 μ M Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die Kernextrakte wurden präpariert. Die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert. Dargestellt als signifikant, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

3.1.4 Die TRPM3-Stimulation erhöht die Biosynthese von c-Fos und c-Jun

In Insulinomazellen wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3 eine Aktivierung von Egr-1 induziert (Mayer et al 2011). Eine Aktivierung von Egr-1 konnte zudem in pankreatischen β -Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat nachgewiesen werden (Müller et al. 2012). In TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen wurde in dieser Arbeit bereits eine erhöhte Aktivität des Egr-sensitiven Reportergens gezeigt. Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde zuerst als Heterodimer aus den basischen Leuzinzipper-Proteinen c-Jun und c-Fos von Chiu et al. 1988 beschrieben. Aus diesem Grund wurde die Expression von c-Jun und c-Fos, sowie von Egr-1 nach Pregnenolonsulfat-Aktivierung von TRPM3 analysiert. Die TRPM3-Expression der HEK293-Zellen wurde dazu mit Tetrazyklin induziert und die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Zu den angegebenen Zeiten wurde in einer Western Blot Analyse die Expression der Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse (Abbildung 17) zeigen, dass, sowohl die Biosynthese von c-Jun und c-Fos, als auch Egr-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3 Zellen induziert wird.

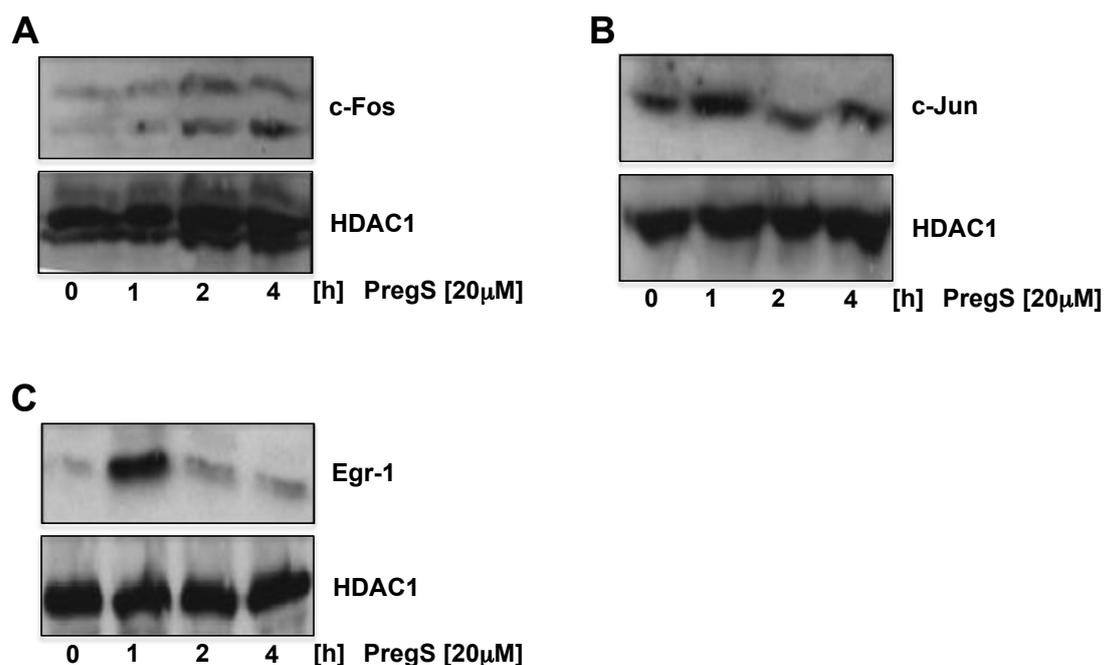


Abbildung 17: Erhöhte Expression von c-Fos und c-Jun und Egr-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen.

A Struktur von Pregnenolonsulfat **B,D** HEK293 Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit besitzen, wurden entweder mit einem rekombinanten Lentivirus das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen (**B**) oder für ein Egr-1-responsives Reporter gen (**E**) kodiert, infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin (1μg/ml) 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat (Konzentrationen 5, 10, 20 und 50 μM) stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt. Die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Gesamt-Proteinkonzentration normiert. **C,D,F** HEK293/TRPM3-Zellen wurden 24h serumreduziert, mit Pregnenolonsulfat (20μM) stimuliert und zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 h nach Stimulation geerntet. Ein unstimulierter Ansatz diente als Kontrolle (Zeitpunkt 0). Die Kernextrakte wurden präpariert und einer Western Blot-Analyse unter Verwendung eines c-Fos- (**C**) bzw. c-Jun- (**D**) oder Egr-1- Antikörpers (**F**) unterzogen. **G** HEK293/TRPM3-Zellen wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin 24h mit PregS stimuliert. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

3.1.5 Das TRPM3-exprimierende Zellsystem HEK293 ist induzierbar und funktional

In einer ersten Untersuchung wurde nun die Funktionalität der Reportergene getestet. Die beiden Reportergene wurden in separaten Experimenten durch lentiviralen Gentransfer stabil ins Chromatin der Zellen integriert um eine möglichst

geordnete nukleosomale Struktur zu gewährleisten und die transkriptionellen regulatorischen Mechanismen zu ermitteln.

TRPM3-exprimierende HEK293-Zellen wurden dazu mit Lentiviren infiziert, die entweder für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen oder für ein Egr-1-responsives Luziferase/Reportergen kodieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für den G-Protein-gekoppelten Designerrezeptor $R_{\alpha q}$ kodierte. Die Zellen wurden dem Liganden Clozapin-N-Oxid (CNO, Kaufmann et al. 2013) stimuliert. CNO ist eine pharmakologisch inaktive Substanz, die ausschließlich den $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Designerrezeptor $R_{\alpha q}$ stimuliert. In Abbildung 18 A ist zu sehen, dass die Stimulation des $R_{\alpha q}$ -Rezeptors mit CNO zu einer deutlichen Erhöhung der transkriptionellen Aktivitäten von Egr-1 und AP-1 in HEK293 Zellen führte.

Desweiteren wurde die Induzierbarkeit/Funktionalität des intrazellulären Signalweges in dem gewählten HEK293/TRPM3-Zellsystem verifiziert. Dazu wurden die Zellen nach Serumreduktion mit dem Phorbolster TPA stimuliert. TPA besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Diacylglycerol und bindet und aktiviert daher die Proteinkinase C. Als ein direktes Resultat dessen werden intrazelluläre Signalkaskaden wie der ERK-Signalweg induziert (Troppmair et al. 1994). Ebenso konnte gezeigt werden, dass TPA eine verstärkte Expression von Egr-1 induziert (Bauer et al. 2005). Es wurde eine deutliche Erhöhung der transkriptioneller AP-1- und Egr-1-Aktivitäten in HEK293/TRPM3-Zellen festgestellt, die mit dem Phorbolster TPA stimuliert worden waren (Abbildung 18 B).

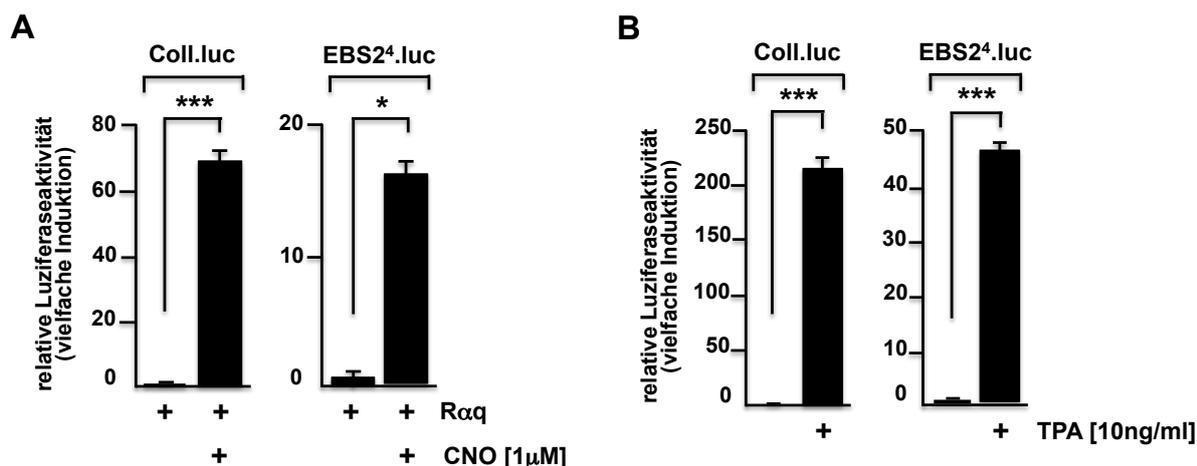


Abbildung 18: Stimulus-regulierte AP-1- und Egr-1-Aktivitäten in HEK293-Zellen.

A, B HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3 Transkriptionseinheit besaßen, wurden mit einem Lentivirus, das ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen bzw. ein Egr-sensitives Reporter gen enthielten, infiziert. **A** Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Rαq-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 24h serumreduziert (0,05% FCS) und anschließend 24h mit CNO stimuliert (1μM). **B** Die Zellen wurden 24h serumreduziert und anschließend mit TPA (10 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert und auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, und als signifikant betrachtet, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001,

Außerdem wurde ein Nrf2-responsives Reporter gen verwendet, das lentiviral ins Chromatin der HEK293/TRPM3-Zellen integriert wurde. Nrf2 ist ein bZIP-Transkriptionsfaktor, der durch antioxidative oder elektrophile Verbindungen aktiviert wird. Im Nukleus dimerisiert Nrf2 mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren und bindet an eine DNA-Sequenz, die als "Stress-response"-Element (StRE) bekannt ist. Die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat stimuliert und die Aktivität des Nrf2-responsiven Reporter gens analysiert. Im Gegensatz zu den AP-1- und Egr-1-responsiven Reporter genen wurde durch Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat das Nrf2-responsive Reporter gen nicht aktiviert (dargestellt in Abbildung 19).

Dies zeigt die Spezifität der verwendeten Egr-1- und AP-1-responsiven Reporter gene.

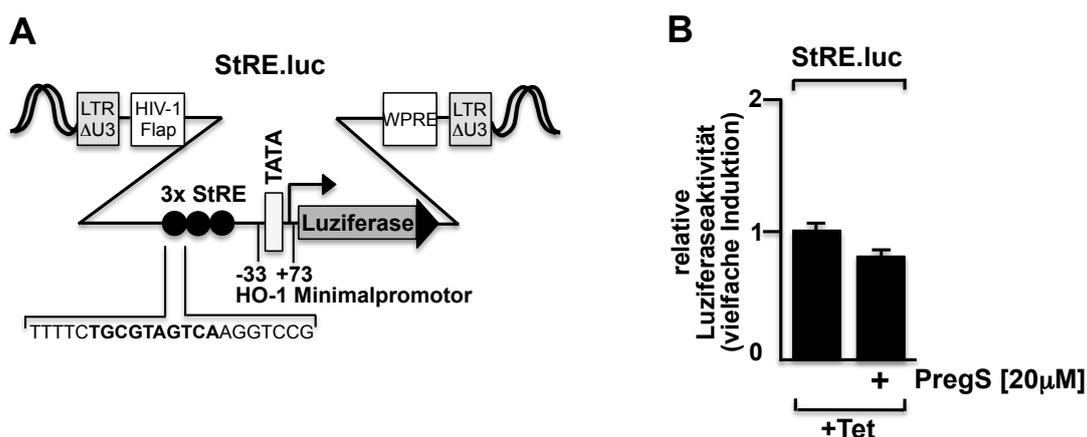


Abbildung 19: Stimulus-regulierte AP-1- und Egr-1-Aktivität in HEK293-Zellen.

A Schematische Darstellung des Nrf2-responsiven Reportergens (StRE.luc). Die Sequenz des Stress-responsiven Elementes ist hervorgehoben. Die regulatorische Domäne besitzt drei Bindestellen für Nrf2 aus dem Hämoxigenasegen oberhalb eines minimalen Hämoxigenasepromotors. **B** HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3 Transkriptionseinheit besaßen, wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Nrf2-reguliertes Reportergen (StRE.luc) kodierte. Die Zellen wurden 24h serumreduziert und anschließend mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 μ M) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, Kernextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Reportergene durch Stimulation mit Pregnenolonsulfat in Abwesenheit von TRPM3 induziert werden. Abbildung 20 zeigt, dass die Pregnenolonsulfat-Stimulation in Abwesenheit von TRPM3 zu keiner erhöhten Aktivität von Egr-1 bzw. AP-1 führt. Dies belegt eine zwingende Expression der TRPM3-Kanäle zur Aktivierung der Reportergene.

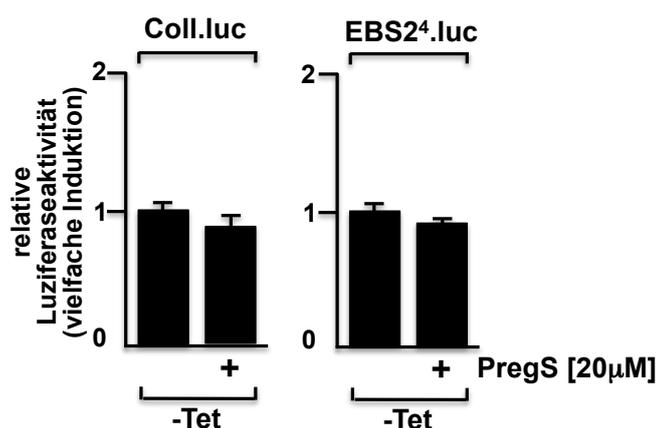


Abbildung 20: Die TRPM3-Expression muss zur Aktivität von Egr-1 und AP-1 gegeben sein.

HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3 Transkriptionseinheit besaßen, wurden mit einem Lentivirus, das ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen bzw. ein Egr-sensitives Reporter gen kodierte, infiziert. Die Zellen wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Kernextrakte präpariert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Proteinkonzentration normiert.

3.1.6 Agonisten und Antagonisten von TRPM3

In der Vergangenheit wurden verschiedene endogene und exogene Verbindungen als Aktivatoren und Inhibitoren von TRPM3 beschrieben. Pregnenolonsulfat, D-Erythrosphingosin und der Inhibitor spannungsgesteuerter L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle Nifedipin wurden als Aktivatoren (Grimm et al. 2005, Wagner et al. 2008, Naylor et al. 2010, Islam et al. 2011). Progesteron, Mefenaminsäure, Rosiglitazone und Polyphenole wie Naringenin als Inhibitoren der TRPM3-Kanal-Aktivierung beschrieben (Naylor et al. 2010, Klose et al. 2011, Majeed et al. 2011, Straub et al. 2013). Erst kürzlich wurde ein weiterer synthetischer Ligand als starker Aktivator identifiziert: Cim0216 (Held et al. 2015). Diese Verbindungen wurden dahingehend analysiert, ob die Aktivierung bzw. Inhibierung von TRPM3 eine Veränderung der Genexpression AP-1-oder Egr-1-regulierter Gene führt.

Alle Experimente zur Analyse der Reporter genaktivität in Bezug auf die Aktivatoren und Inhibitoren von TRPM3 wurden zusammen mit Frau Sandra Rubil durchgeführt und publiziert (Lesch, Rubil & Thiel 2014).

3.1.6.1 Die Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat induziert die AP-1- und Egr-1-regulierte Genexpression

Das Neurosteroid Pregnenolonsulfat wurde als starker Aktivator von TRPM3 identifiziert (Wagner et al. 2008, Drews et al. 2014). Pregnenolonsulfat induziert den Ca^{2+} -Einstrom ins Zellinnere via Aktivierung des TRPM3-Kanals (Wagner et al. 2008, Klose et al. 2011, Lesch et al. 2015); allerdings in unphysiologisch hohen Konzentrationen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Stimulation von endogenen TRPM3 Kanälen mit Pregnenolonsulfat zu einer veränderten Genexpression in Insulinomazellen führt (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011).

Verschiedene Konzentrationen von Pregnenolonsulfat wurden getestet, die zur Aktivierung von AP-1 und Egr-1 führen (dargestellt in Abbildung 21 B). Die Zellen wurden entweder mit einem Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen oder einem EBS2⁴.luc-kodierenden Luziferase-Reportergen infiziert, und zur Induktion der TRPM3-Expression mit Tetrazyklin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Pregnenolonsulfat (PregS) stimuliert. Die Resultate zeigen sowohl eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Egr-1-responsiven, als auch des AP-1-responsiven Reportergens (Abbildung 21). Trotz der Variationen in der relativen Luziferaseaktivität konnte gezeigt werden, dass die TRPM3 Stimulation mit Pregnenolonsulfat das genetische Programm der HEK293/TRPM3-Zellen durch Aktivierung AP-1 und Egr-1-regulierter Gene verändert.

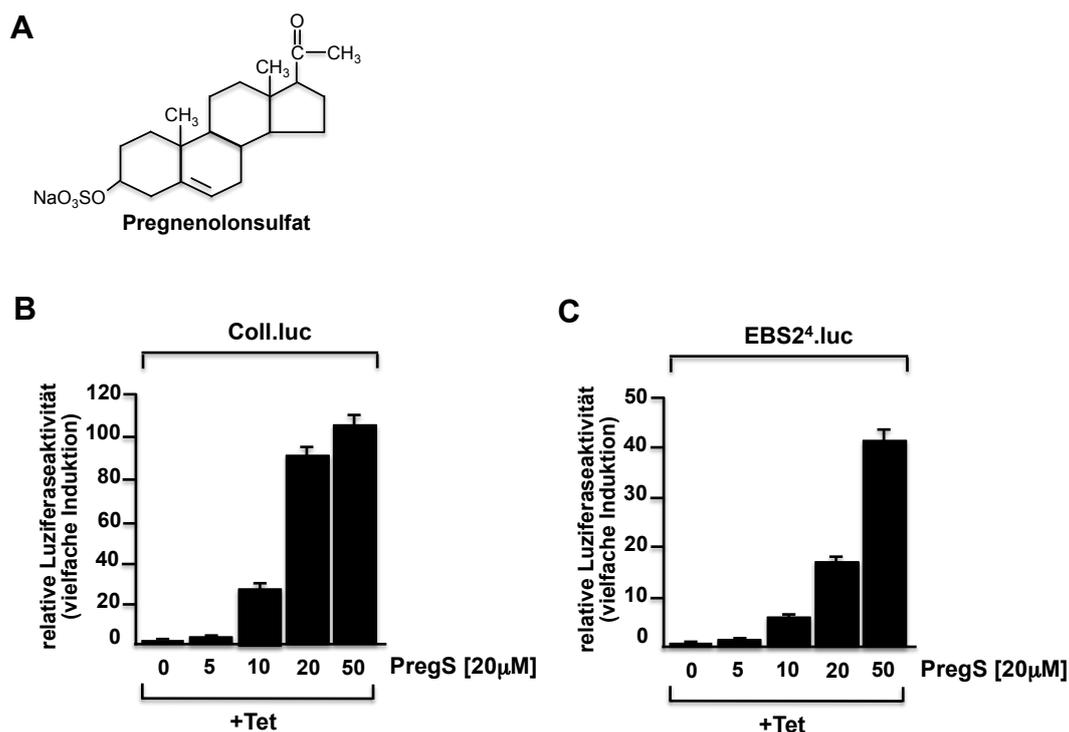


Abbildung 21: Erhöhung der AP-1- und Egr-1-Aktivität in HEK293/TRPM3-Zellen durch Pregnenolonsulfat.

A Struktur von Pregnenolonsulfat **B,C** HEK293 Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit besitzen, wurden entweder mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen (**B**) oder für ein Egr-1-responsives Reporter gen (**C**) kodierte. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat (Konzentrationen 5, 10, 20 und 50 µM) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert.

Das Neurosteroid Pregnenolonsulfat konnte somit als potenter Aktivator von TRPM3 in nicht-physiologisch hoher Konzentration bestätigt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die weiteren Experimente zur Analyse der folgenden Substanzen eine Pregnenolonsulfat-Konzentration von 20 µM gewählt.

3.1.6.2 Der Effekt von Nifedipin und D-Erythrosphingosin auf TRPM3-vermittelte Gentranskription

Der Inhibitor von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen Nifedipin löst eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aus (Wagner et al. 2008, Majeed et al. 2011) und wurde somit als Ligand von TRPM3 beschrieben (Wagner et al. 2008, Drews et al. 2014). D-Erythrosphingosin wurde ebenfalls als Ligand von TRPM3 beschrieben, obwohl die genaue Funktion auf TRPM3 hier noch nicht völlig aufgeklärt werden konnte (Grimm et al. 2005, Wagner et al. 2008, Naylor et al. 2010). Beide Verbindungen, D-Erythrosphingosin und Nifedipin wurden im Folgenden auf einen möglichen Effekt auf die AP-1- und Egr-1-Aktivität hin untersucht. Die HEK293/TRPM3-Zellen wurden dazu mit Tetrazyklin und zusätzlich mit Nifedipin oder D-Erythrosphingosin stimuliert und die Aktivitäten der AP-1- und Egr-1-responsiven Reportergene gemessen.

In Abbildung 22 ist dargestellt, dass die Stimulation von Nifedipin in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen keinen nachweisbaren Effekt auf die Aktivität von AP-1 oder Egr-1 besitzt. Im Vergleich dazu induzierte die Stimulation mit D-Erythrosphingosin eine erhöhte AP-1- und Egr-1-Aktivität in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen.

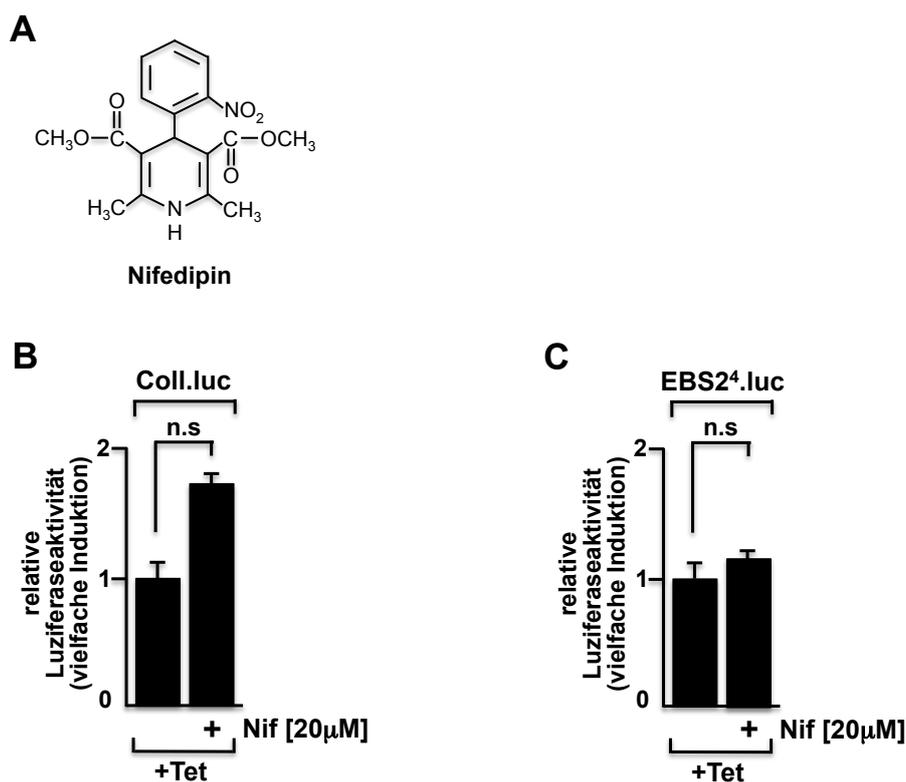


Abbildung 22: Nifedipin besitzt keinen aktivierenden Effekt auf die AP-1- und Egr-1-Aktivität.

A Struktur von Nifedipin (Nif) **B, C**, HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem Lentivirus, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen (**B**) bzw. einem EBS2⁴.luc kodierenden Reportergen (**C**) infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin (1µg/ml) 24h serumreduziert und anschließend mit Nifedipin (Nif, (20µM) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität berechnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Der Versuch wurde als signifikant gewertet, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

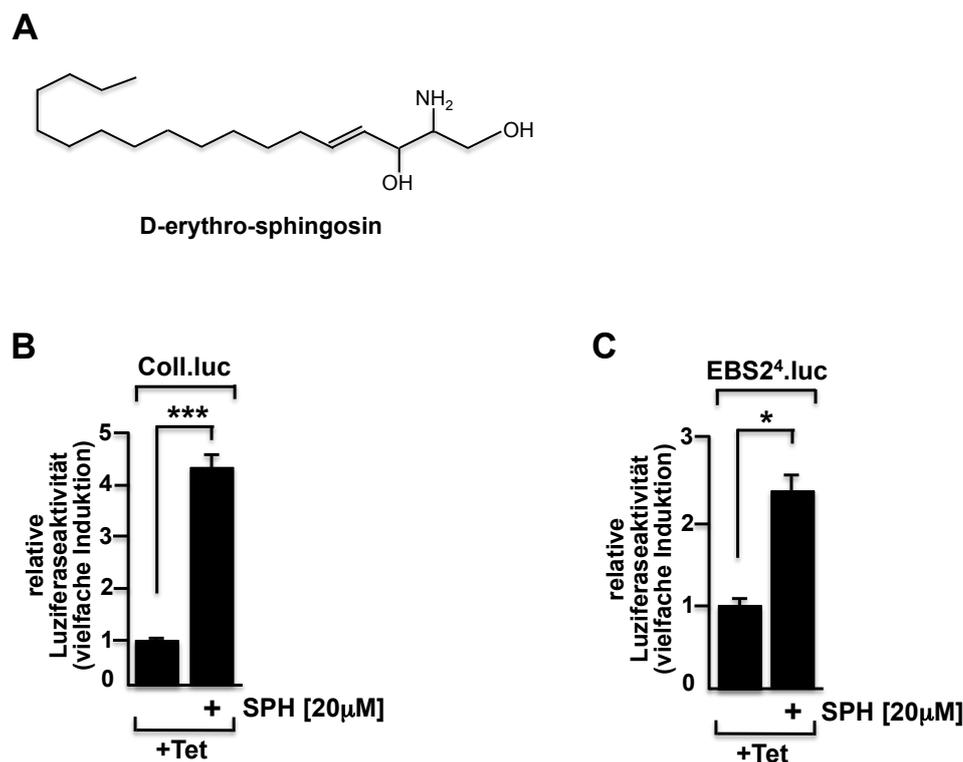


Abbildung 23: D-Erythrosphingosine besitzen keinen aktivierenden Effekt auf die AP-1- und Egr-1 -Aktivität.

A Struktur von D-Erythrosphingosin (SPH) **B, C**, HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen (**B**) oder einem Egr-sensitiven Luziferase-Reportergen (**C**) kodierte. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin (1µg/ml) 24h serumreduziert und 24h mit D-Erythrosphingosin (20µM) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität berechnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Der Versuch wurde als signifikant gewertet, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

Die Experimente wurden wiederholt um einen möglichen Effekt von D-Erythrosphingosin und Nifedipin auf die AP-1 und Egr-1-Aktivität zu testen, der unabhängig von TRPM3 induziert wird. Dazu wurden die Zellen in separaten Experimenten mit den beiden Substanzen stimuliert ohne Zugabe von Tetrazyklin.

Das Ergebnis zeigte keine signifikante Veränderung der AP-1 sowie Egr-1-regulierten Gentranskription, wenn die Zellen mit Nifedipin behandelt wurden. Die Behandlung mit D-Erythrosphingosin hingegen führte zu einer signifikanten Erhöhung der AP-1 bzw. Egr-1-regulierten Transkription (dargestellt in Abbildung 24). Dies deutet darauf hin, dass D-Erythrosphingosin die AP-1- und Egr-1-Aktivität TRPM3-unabhängig stimuliert.

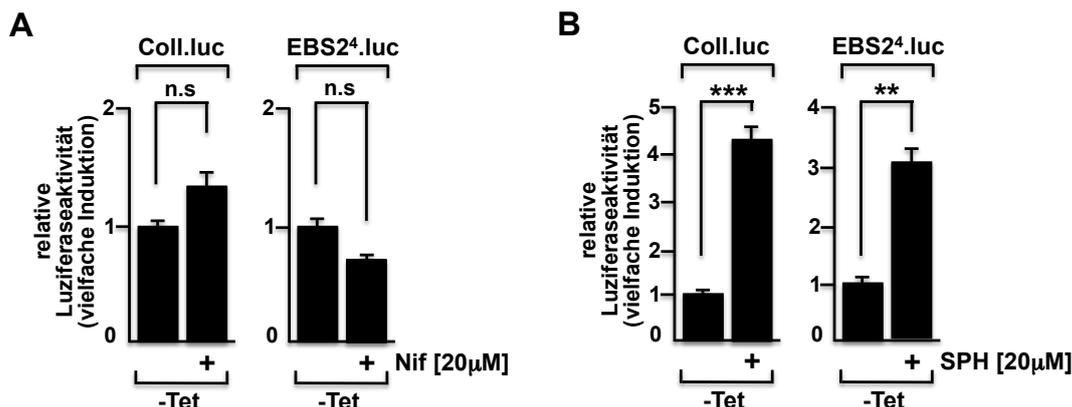


Abbildung 24: In Abwesenheit von TRPM3 besitzt D-Erythrosphingosin einen aktivierenden Effekt auf die AP-1 und Egr-1-regulierte Transkription.

A,B HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem Kollagenase-Promotor/Luziferasegen bzw. mit einem EBS2⁴.luc kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin (1µg/ml) 24h serumreduziert und anschließend in Anwesenheit von entweder Nifedipin (Nif, 20µM) (**A**) oder D-Erythrosphingosin (SPH, 20µM) (**B**) 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität berechnet. Der Versuch wurde aus drei unabhängigen Experimenten als signifikant gewertet, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

3.1.6.3 Pregnenolon und Progesteron beeinflussen die TRPM3-induzierte Aktivierung von AP-1

Es wurde publiziert, dass weder Pregnenolon noch Progesteron in der Lage ist die Egr-1-Expression in Insulinomazellen zu induzieren; im Gegensatz zu Pregnenolonsulfat, der sulfatierten Form des Pregnenolons (Mayer et al. 2011). Desweiteren induzierte Progesteron auch keinen TRPM3-vermittelten Ca²⁺-Einstrom ins Zellinnere (Majeed et al.2012). Zudem wurde gezeigt, dass der Pregnenolonsulfat-induzierte Ca²⁺-Einstrom und die daraus resultierende intrazelluläre Erhöhung des Kalziumlevels via TRPM3 durch Progesteron hemmt (Majeed et al. 2012). Basierend auf diesen Resultaten wurde postuliert, dass der TRPM3-Kanal eine extrazelluläre Bindestelle für eine begrenzte Anzahl von Steroiden besitzt, inklusive Pregnenolon, Pregnenolonsulfat und Progesteron (Majeed et al. 2012). Diese Hypothese wird zusätzlich durch die ähnliche chemische Struktur dieser Steroide bekräftet. Um zu überprüfen, ob Progesteron und Pregnenolon einen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von AP-1 und Egr-1 nach Stimulation des TRPM3-Kanals mit

Pregnenolonsulfat besitzen, wurden HEK293/TRPM3-Zellen mit den entsprechenden Lentiviren infiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Progesteron als auch Pregnenolon die Pregnenolonsulfat-induzierte transkriptionelle Aktivität von AP-1 signifikant beeinträchtigt (Abbildung 25). Im Vergleich dazu konnte kein Effekt von Progesteron oder Pregnenolon auf die transkriptionelle Aktivität von Egr-1 festgestellt werden. Zusätzlich konnte in Abwesenheit des TRPM3-Kanals keine Veränderung der AP-1 oder Egr-1 Aktivität in den HEK293/TRPM3-Zellen festgestellt werden. Diese Daten untermauern die Hypothese, dass der TRPM3-Kanal eine Bindungsstelle für Steroide besitzt.

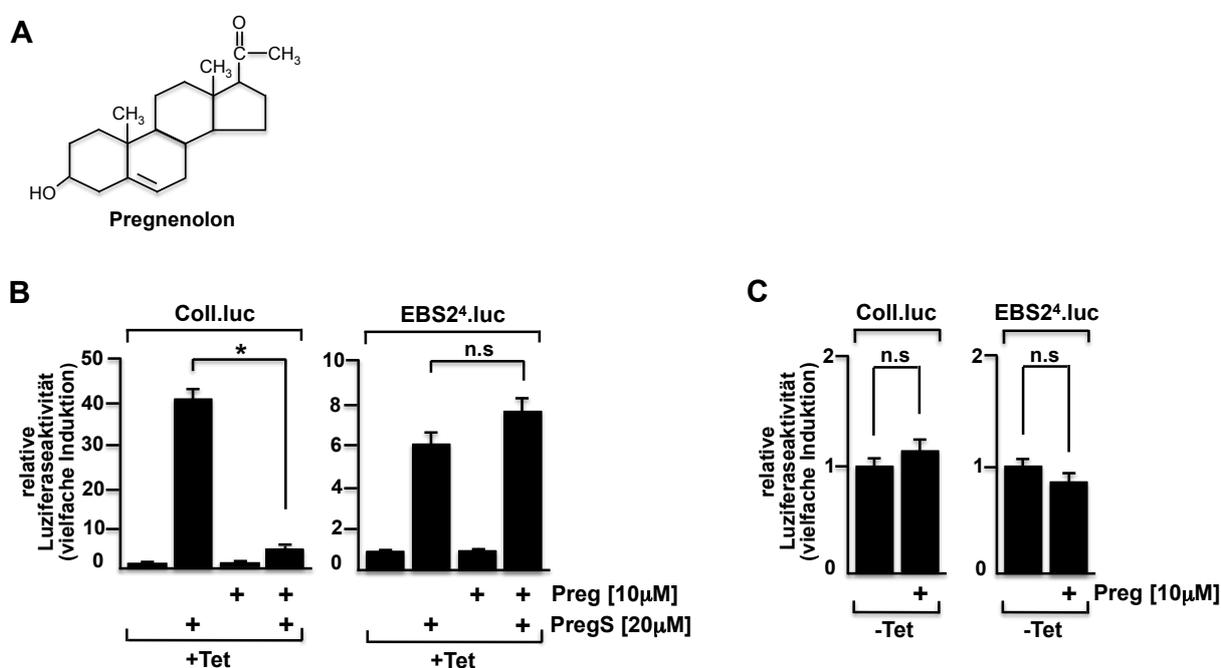


Abbildung 25: Die AP-1-Aktivität wird durch Pregnenolon gehemmt.

A Struktur von Pregnenolon. **B** HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit einem Egr-1-responsiven EBS2⁴.luc- bzw. einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus infiziert, in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat in Anwesenheit von Pregnenolon (10 µM) stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität wurde analysiert und auf die Gesamt-Proteinkonzentration normiert. **C** Die Experimente wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin wiederholt. Die Statistik wurde aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt, und als signifikant betrachtet, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

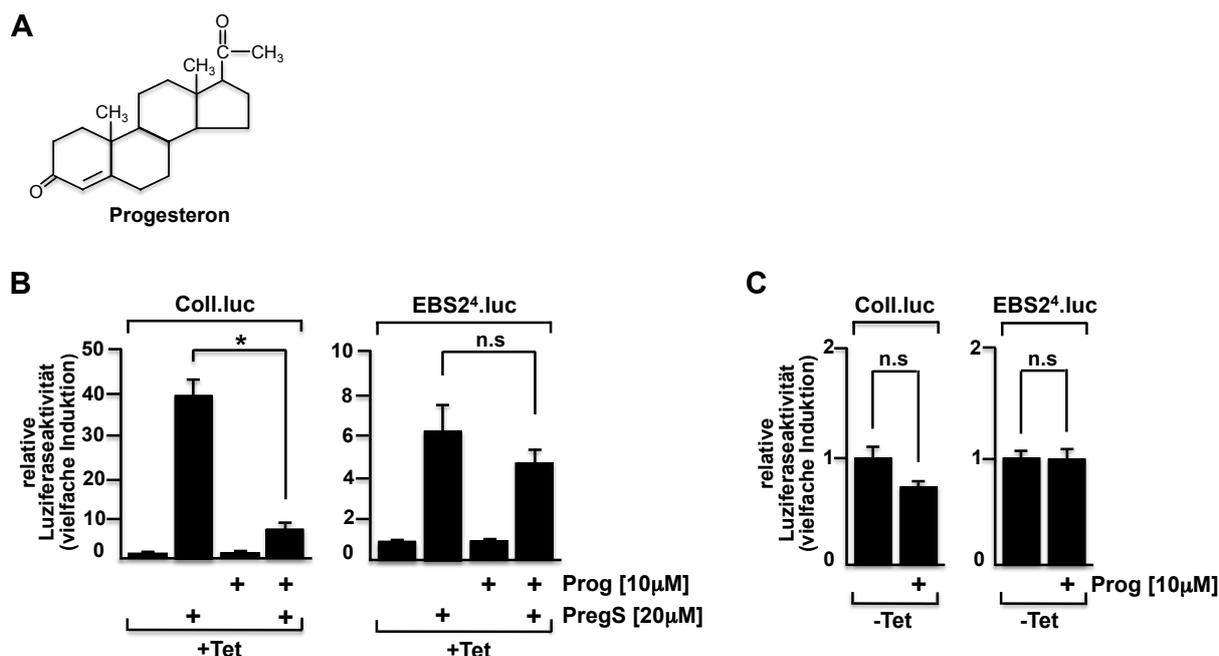


Abbildung 26: Die AP-1-Aktivität wird durch Progesteron gehemmt.

A Struktur von Progesteron. **B** HEK293/TRPM3-Zellen wurden entweder mit einem EBS2⁴.luc-bzw. einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus infiziert, in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat in Anwesenheit von Progesteron (10 µM) stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Gesamt-Proteinkonzentration normiert. **C** Die Experimente wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin wiederholt. Die Statistik wurde aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt, und als signifikant betrachtet, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

3.1.6.4 Mefenaminsäure inhibiert die TRPM3-regulierte Gentranskription

Die selektive Inhibition des TRPM3-vermittelten Ca²⁺-Einstroms in HEK293/TRPM3-Zellen durch das Fenamat Mefenaminsäure wurde von Klose et al. 2011 und Straub et al. 2013 gezeigt. Der Einfluss der Mefenaminsäure auf die TRPM3-vermittelte Gentranskription war bisher noch nicht untersucht worden. Dazu wurden die HEK293/TRPM3-Zellen mit einem AP-1-oder einem Egr-1-sensitiven Luziferase/Reportergen-kodierenden Lentivirus infiziert, mit Tetrazyklin erst serumreduziert und anschließend in Anwesenheit der Mefenaminsäure mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Ergebnisse in Abbildung 26 B zeigten, dass die Pregnenolonsulfat-induzierte AP-1-und Egr-1-Aktivität in HEK293/TRPM3-Zellen

durch Mefenaminsäure fast vollständig geblockt wurde. Im Vergleich dazu konnte keine Wirkung der Mefenaminsäure alleine auf die Aktivität der Reportergene festgestellt werden (Abbildung 27 C).

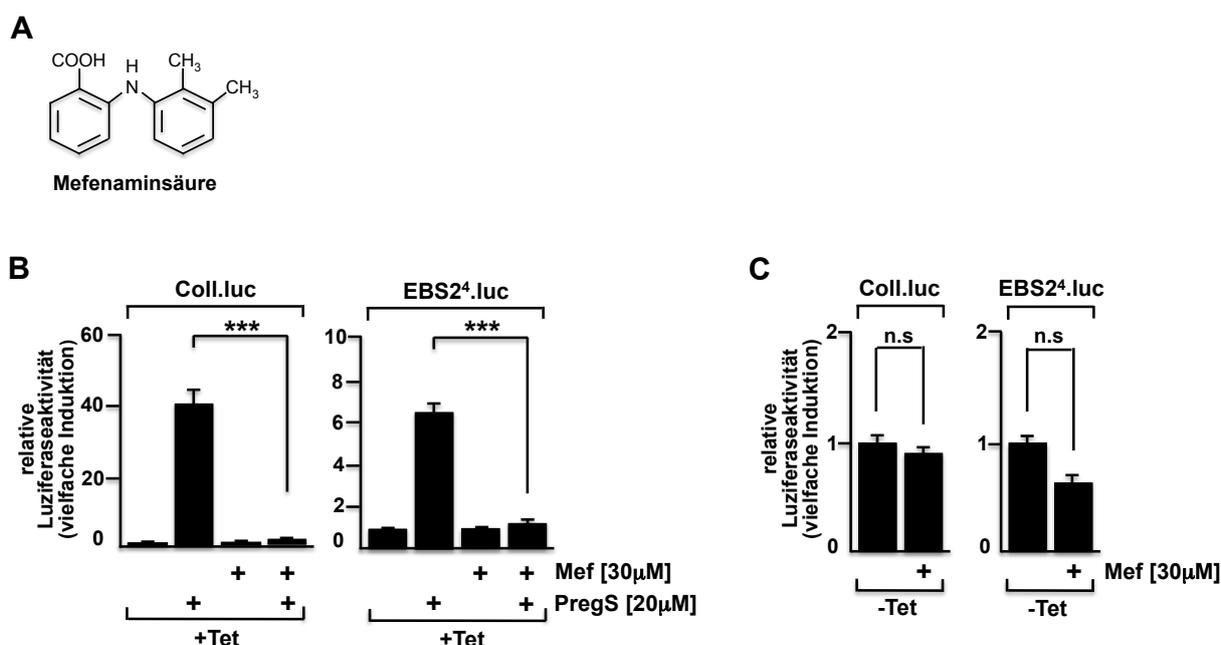


Abbildung 27: Mefenaminsäure inhibiert die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung der AP-1 und Egr-1-Aktivität.

A Struktur des Fenamates Mefenaminsäure. **B,C** HEK293/TRPM3-Zellen, die entweder mit einem Coll.luc bzw. einem EBS2⁴.luc-kodierenden Reportergen infiziert wurden, wurden in An-, (**B**) bzw. Abwesenheit (**C**) von Tetracyclin (1µg/ml) serumreduziert und anschließend mit PregS in Anwesenheit der Mefenaminsäure (Mef, 30µM) stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luciferaseaktivität berechnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, und als signifikant betrachtet, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

3.1.6.5 Rosiglitazone beeinträchtigen die AP-1-, aber nicht die Egr-1-Aktivität, nach Stimulation des TRPM3-Kanals

Der PPAR-γ-Agonist Rosiglitazon aus der Klasse der Thiazolidinedoine inhibiert in HEK293/TRPM3 Zellen den Pregnenolonsulfat-induzierten Ca²⁺-Einstrom und eine

damit einhergehende Erhöhung der Konzentration intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen (Majeed et al. 2011). Es wurde analysiert, ob die Inhibierung durch Rosiglitazone einen Effekt auf die TRPM3-induzierte AP-1 und Egr-1-Aktivität besitzt.

Die Zellen wurden dazu erneut mit einem AP-1-oder einem Egr-1-responsiven Reporter-gen-kodierenden Lentivirus infiziert und mit Tetrazyklin serumreduziert. Anschließend wurden die Zellen mit Rosiglitazonen und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Es konnte festgestellt werden, dass die Stimulation der Zellen mit Rosiglitazon die Aktivität von AP-1 nach Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat reduzierte, nicht aber die Aktivität von Egr-1 (Abbildung 27 B). Außerdem konnte kein Effekt der Rosiglitazon-Stimulation auf die AP-1-und die Egr-1-Aktivitäten in Abwesenheit von Tetrazyklin festgestellt werden (Abbildung 28 C).

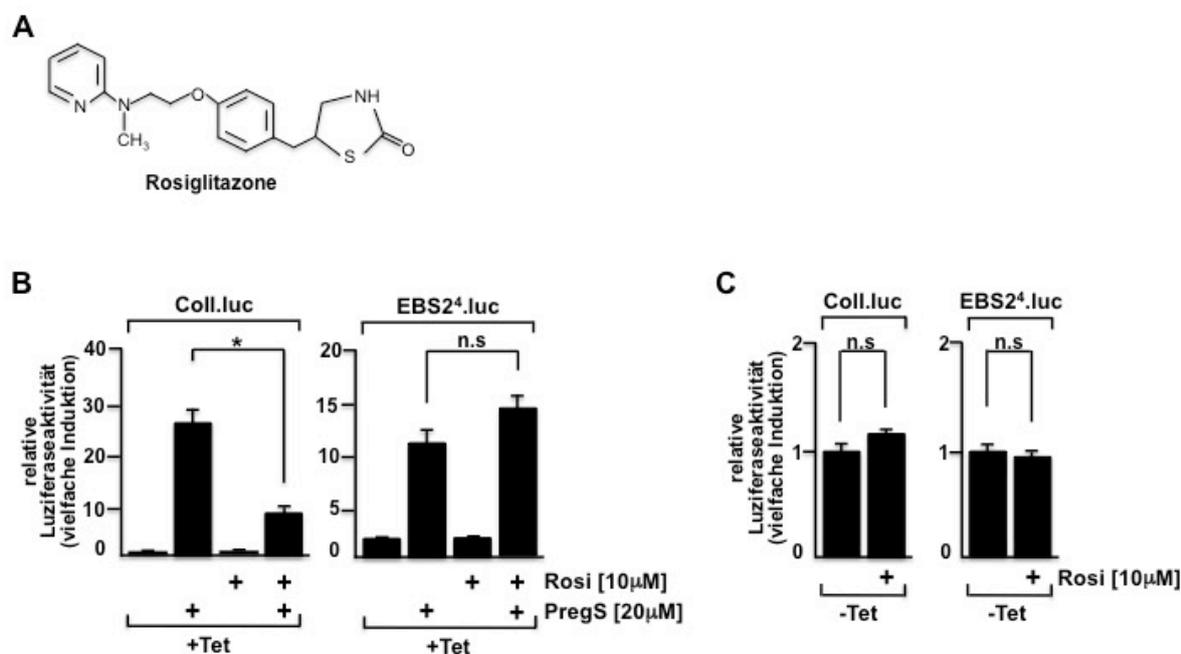


Abbildung 28: Rosiglitazone haben einen negativen Effekt auf die AP-1-Aktivität nach Stimulation des TRPM3 mit Pregnenolonsulfat.

A Struktur der Rosiglitazone. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem Lentivirus infiziert, das für ein AP-1-responsives Reporter-gen oder ein Egr-1-responsives Reporter-gen kodiert, mit Tetrazyklin 24h (1µg/ml) serumreduziert und anschließend in Anwesenheit von Rosiglitazonen (10µM) 24h mit PregS stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität dargestellt. **C** Das Experiment wurde in Abwesenheit von Tetrazyklin wiederholt. Das Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

3.1.6.6 Der Einfluss der Polyphenole Naringenin und Quercetin auf die AP-1 und Egr-1-Aktivität

Das Flavonoid Naringenin wurde als ein Inhibitor von Pregnenolonsulfat-induziertem Ca^{2+} -Einstrom in HEK293/TRPM3-Zellen identifiziert (Straub et al. 2013). In einem Experiment wurde ebenfalls auf der transkriptionellen Ebene untersucht, ob Naringenin die Aktivitäten von AP-1 und Egr-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen verändert. Während eine Naringenin-Stimulation der Zellen den Ca^{2+} -Einstrom via TRPM3 vollständig verhinderte, konnte auf transkriptioneller Ebene nur eine teilweise Beeinträchtigung der Gentranskription beobachtet werden. (Abbildung 29 B). Naringenin alleine hatte keine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf die AP-1- und Egr-1-Aktivitäten.

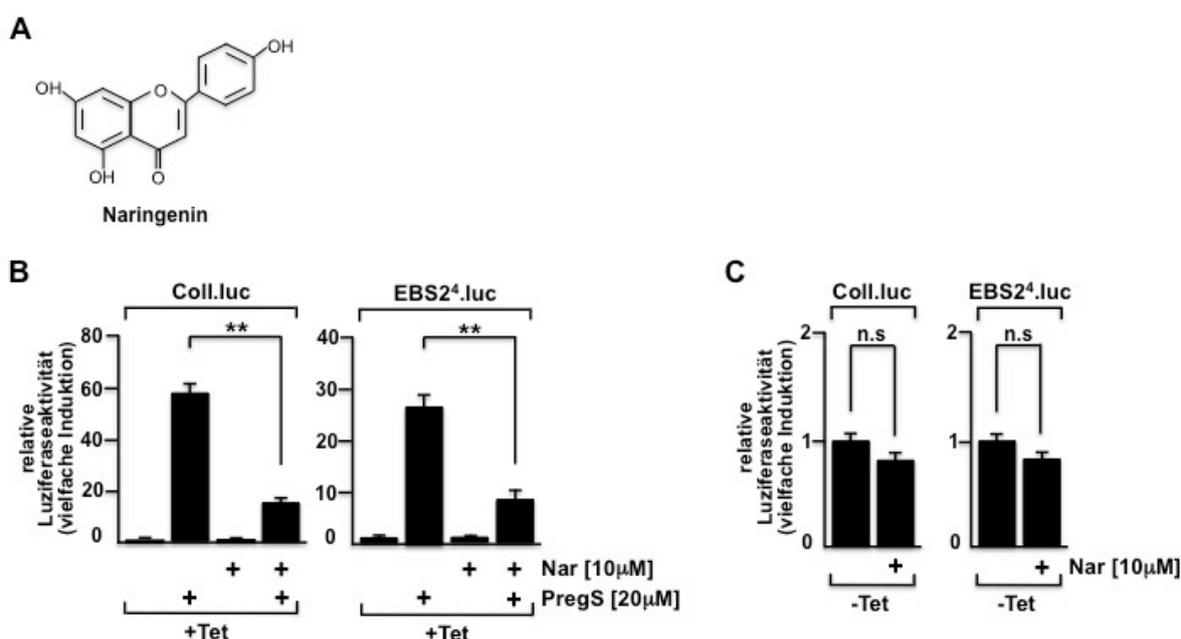


Abbildung 29: Naringenin reguliert negativ die AP-1 und Egr-1 Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3.

A Struktur von Naringenin. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem EBS2⁴.luc bzw. einem Coll.luc- kodierenden Lentivirus infiziert. Nach Zugabe von Tetrazyklin (1µg/ml) und Naringenin (10µM) wurde mit Pregnenolonsulfat stimuliert. **C** Die Experimente wurden in Abwesenheit von Tetrazyklin wiederholt. Die Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luciferaseaktivität dargestellt. Das Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

Aufgrund ähnlicher struktureller Zusammensetzung wurde ebenso die Auswirkung des Flavonoids Quercetin auf die Regulation der Transkription getestet. Es wurde festgestellt, dass eine Simulation der Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen mit Quercetin die AP-1-Aktivität deutlich verringerte, aber im Vergleich dazu die Egr-1-Aktivität geringfügig erhöhte (Abbildung 30 B).

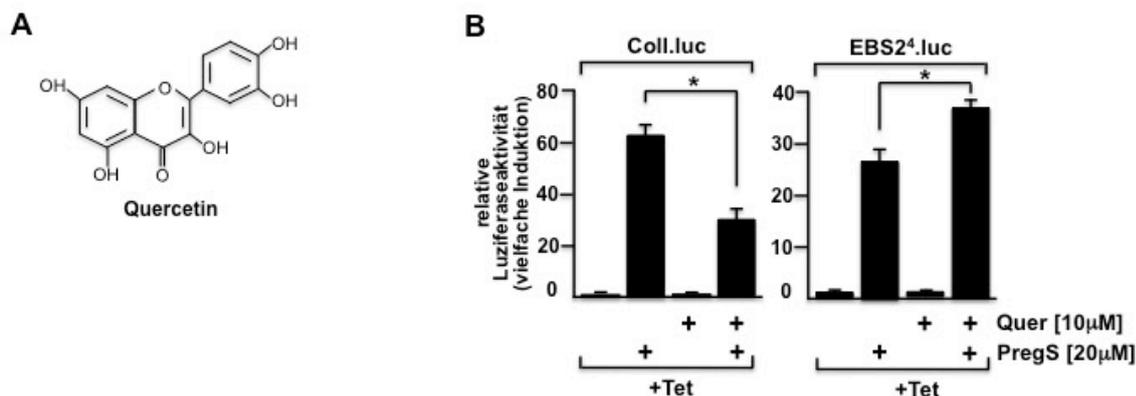


Abbildung 30: Quercetin reguliert die AP-1 und Egr-1 Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3.

A Struktur von Quercetin. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem EBS2⁴.luc bzw. oder einem Kollagenase-Promotor/Luziferasegen kodierenden Lentivirus infiziert. In Anwesenheit von Tetracyclin (1 μg/ml) wurden die Zellen serumreduziert und anschließend in Anwesenheit von Quercetin (10 μM) mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität dargestellt. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten wurde als signifikant gewertet, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

3.1.6.7 Die TRPM3-regulierte Aktivierung von AP-1 und Egr-1 wird durch BD1047 geblockt

Es wurde publiziert, dass der Sigma-1-Rezeptor Antagonist BD1047 den Ca²⁺-Einstrom via TRPM3 blockierte. In einer Patch-Clamp Analyse konnte der inhibitorische Effekt von BD1047 bei Stimulation des TRPM3 mit Pregnenolonsulfat bestätigt werden (Amer et al.2012). Der Effekt von BD1047 auf die TRPM3-vermittelte Gentranskription wurde daher untersucht. Dazu wurden HEK293/TRPM3-

Zellen entweder mit einem Kollagenase-Promotor/Luziferasegen-oder einem Egr-1-responsiven Lentivirus infiziert und die Zellen anschließend mit Pregnenolonsulfat stimuliert. In Abbildung 30 ist zu sehen, dass BD1047 die PregS-induzierte AP-1-und Egr-1-Aktivitäten in HEK293/TRPM3 Zellen fast vollständig inhibierte (Abbildung 31 B).

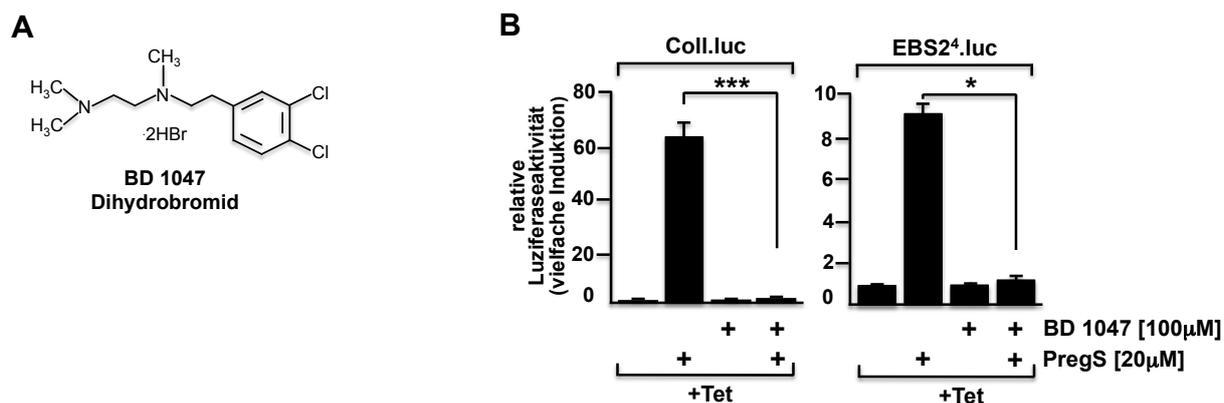


Abbildung 31: BD1047 beeinträchtigt die Pregnenolonsulfat-induzierte Transkription AP-1 und Egr-1-regulierter Gene

A Struktur des Sigma-1-Antagonisten BD1047. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem Lentivirus, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen bzw. für ein Egr-1-responsives kodierte, infiziert. Die Zellen wurden mit Zugabe von Tetrazyklin (1µg/ml) 24h serumreduziert und anschließend 24h mit BD1047 (100µM) und mit PregS stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität auf die gesamte Proteinkonzentration normiert. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten wurde als signifikant gewertet, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Mefenaminsäure von den hier getesteten Inhibitoren am effektivsten die TRPM3-induzierten AP-1 und Egr-1-Aktivitäten wirkt.

3.1.7 Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 , Egr-1 und Elk-1 durch Pregnenolonsulfat benötigt TRPM3-Kanäle

In Insulinomazellen steigert die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat die Aktivierung von AP-1 (Müller et al. 2011) und erhöht die Expression von c-Jun und c-Fos, den beiden Hauptkomponenten des AP-1-Komplexes (Müller et al. 2011). In dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob die Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 in HEK293/TRPM3-Zellen ebenfalls zur erhöhten Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1, Egr-1 führt. Zusätzlich stellte sich diese Frage ebenso für Elk-1, einem Bestandteil des ternären Komplexfaktors, der durch Egr-1 reguliert wird.

3.1.7.1 Die Expression des TRPM3-Kanals ist notwendig für die Pregnenolonsulfat-vermittelte Aktivierung von AP-1

Die bisherigen pharmakologischen Untersuchungen kamen zu dem Resultat, dass der TRPM3-Kanal zur Pregnenolonsulfat-induzierten AP-1-vermittelter Transkription zwingend erforderlich ist. Dies wurde nun auf genetischer Ebene untersucht. Es wurde eine TRPM3-spezifische „small-hairpin“ (sh)-RNA exprimiert. Die Resultate zeigen, dass die Aktivierung von AP-1 deutlich verringert wurde (siehe Abbildung 32). Dies zeigt die essentielle Bedeutung von TRPM3 als Bindeglied zwischen Pregnenolonsulfat-Stimulation und Aktivierung der Transkription des AP-1-responsiven Reportergens.

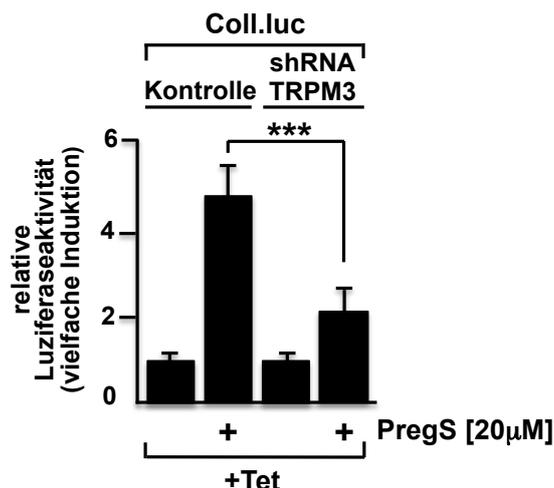


Abbildung 32: Die Expression einer TRPM3-spezifischen shRNA reduziert die Aktivierung von AP-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen.

HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, das die Luziferase unter der Kontrolle eines Kollagenasepromotors exprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für eine TRPM3-spezifische shRNA kodierte. Zur Kontrolle diente ein Lentivirus, das mit Hilfe des Transferplasmids pLL3.7 generiert wurde. Die Zellen wurden mit Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat (20 µM) stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert. Das Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn bei einem n=3: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

Sowohl auf pharmakologischer, z.B. mit Mefenaminsäure und anderen TRPM3-Inhibitoren, als auch auf genetischer Ebene mittels Expression einer spezifischen shRNA gegen TRPM3 konnte eine notwendige Beteiligung des TRPM3-Kanals und seiner Aktivierung in der Aktivierung von AP-1 und Egr-1-kontrollierten Genen gezeigt werden.

3.1.8 Ca²⁺ ist der essentielle sekundäre Botenstoff bei der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von TRPM3

Der TRPM3-Kanal ist ein Ca²⁺-permeabler Ionenkanal. Die Messung des Ca²⁺-Einstroms und der erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration diente oft als Indikation für einen aktivierten TRPM3-Kanal. Untersuchungen in neuronalen Zellen

zeigten, dass die Menge an einströmenden Ca^{2+} -Ionen nicht immer ausreicht um eine Signalkaskade zur Änderung der Genexpression auszulösen (Gallin und Greenberg 1995). Eine Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat induziert in Insulinomazellen einen Ca^{2+} -Einstrom, der zu einer erhöhten Aktivität von Egr-1 führt. Durch Chelatisieren der Ca^{2+} -Ionen kann diese Aktivität in Insulinomazellen beeinträchtigt werden (Mayer et al. 2011). Insulinomazellen exprimieren TRPM3- und L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und sind daher als Modellsystem zur Analyse TRPM3-vermittelter Signaltransduktion ungeeignet. Um sicherzustellen bei der Analyse der TRPM3-induzierten Signalkaskade eine Interferenz durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle auszuschließen, wurden HEK293/TRPM3-Zellen verwendet. Diese Zellen besitzen keine L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle.

Um herauszufinden, ob die TRPM3-Stimulation mit Pregnenolonsulfat in dem in dieser Arbeit verwendeten Zellsystem zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und zur Erhöhung der AP-1-Aktivität führt, wurde ein Versuchansatz gewählt, bei dem sowohl auf pharmakologischer als auch auf genetischer Ebene freie Ca^{2+} -Ionen geblockt werden.

3.1.8.1 Die Steigerung der AP-1 Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen benötigt eine erhöhte Konzentration intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen

Die Aktivierung des TRPM3-Kanals wird oft mit Hilfe von Indikatoren zur Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels oder durch die Änderung der Membranspannung gemessen, wobei eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit der Aktivität von TRPM3 gleichgesetzt wird. Die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat induzierte in pankreatischen β -Zellen einen verstärkten Kalziumeinstrom (Wagner et al. 2008).

Aus diesem Grund wurde die Rolle extra- und intrazellulären Ca^{2+} durch Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von TRPM3 in HEK293-Zellen auf die AP-1-Aktivität analysiert werden. Um die extrazellulären Ca^{2+} -Ionen abzufangen und somit einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom zu verhindern, wurde der Ca^{2+} -Chelator EGTA verwendet. Um erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen abzupuffern, wurde

BAPTA-AM als Chelator verwendet. In einem Experiment wurden native HEK293-Zellen und HEK293-Zellen verwendet, in denen durch Zugabe von Tetrazyklin die TRPM3-Expression induziert wurde. Die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat stimuliert und der Ca^{2+} -Einstrom mit Hilfe des Ca^{2+} -komplexierenden Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 gemessen. In Abbildung 33 A ist der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dargestellt. Abbildung 33 B zeigt den statistischen Vergleich des Fura-2-Anteils. Die Resultate zeigen, dass die Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 in einer deutlich erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultierte (Abbildung 33 B, schwarze und graue Balken). Die Zugabe von BAPTA-AM verringerte die Reaktion, die nach Pregnenolonsulfat-Aktivierung von TRPM3 stattfand. In den nativen Zellen wurde diese sogar vollständig aufgehoben (als rote Balken und Linie dargestellt). Ein ähnliches Resultat wurde durch die Zugabe von EGTA gefunden (als grüne Balken und Linie dargestellt).

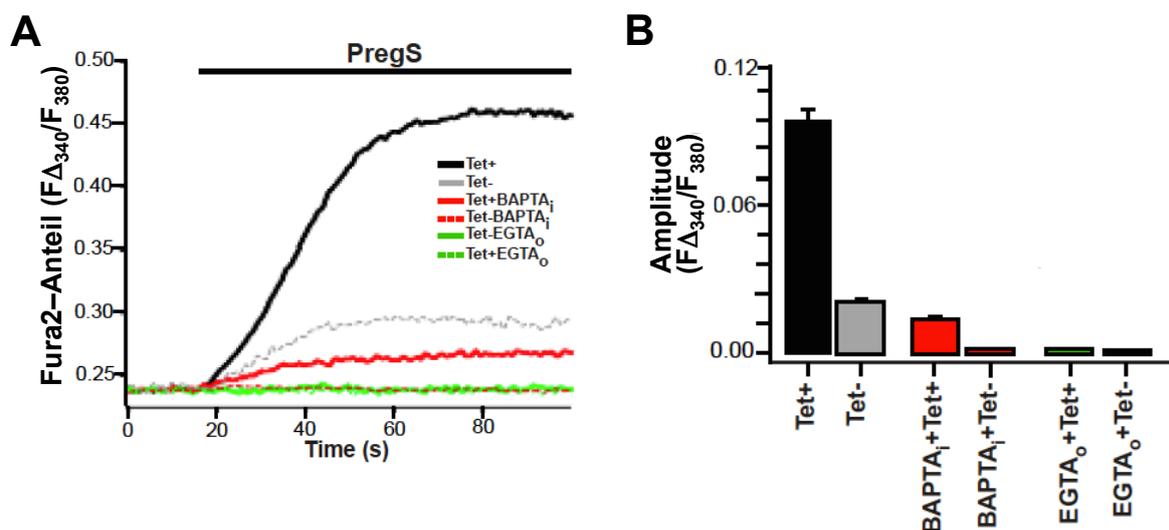


Abbildung 33: Die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen benötigt einen Ca^{2+} -Einstrom.

A Die Ca^{2+} -Antwort nach Pregnenolonsulfat-Stimulation in nativen (Tet-) und TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen (Tet+) wurde verglichen. Die Zellen wurden mit Fura-2 geladen. Die TRPM3-Expression wurde 24h vor der Durchführung des Experiments durch Zugabe von Tetrazyklin ($1\mu\text{M}$) induziert. Der Fura-2-Anteil einzelner TRPM3-exprimierender (dicke Linien) oder nativer (gestrichelte Linien) Zellen ist gezeigt. **B** Darstellung der statistischen Zusammenfassung einer größeren Zellpopulation.

In TRPM3-exprimierenden HEK293 konnte ein vermehrter Kalziumeinstrom ins Zytosol nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat gemessen wurde (Abbildung 33 A). Reicht dieser erhöhte Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus, um eine Signalkaskade zur Induktion AP-1-vermittelter Gentranskription auszulösen? Um dies zu analysieren, wurde der gleiche Versuchsansatz gewählt, unter Verwendung eines AP-1-responsiven Reportergens.

In Abbildung 34 A ist gezeigt, dass die AP-1 Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation des TRPM3 in Kalzium-freiem Medium, das mit EGTA versetzt wurde, vollständig inhibiert wurde. Das beweist, dass der Einstrom von Kalzium entscheidend ist, um die Pregnenolonsulfat-induzierte Stimulation von TRPM3 mit der verstärkten Aktivität von AP-1 in Verbindung zu bringen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass für die AP-1 vermittelte Transkription nach Aktivierung des TRPM3-Kanals erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen erforderlich sind. In Abbildung 33 ist dargestellt, dass die AP-1-Aktivität nach PregS-Stimulation deutlich verringert ist, wenn dem Kulturmedium der hochselektive membranpermeable Kalziumchelator BAPTA-AM zugesetzt wurde.

Bei Zugabe von EGTA wurde ein ähnliches Resultat festgestellt. Daraus kann man schließen, dass sowohl der Kalziumeinstrom, als auch der resultierende Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ausschlaggebend für eine TRPM3-vermittelte AP-1-Aktivität. Dieses Ergebnis wird untermauert durch die Messung des Ca^{2+} -Einstroms, der in Zusammenarbeit mit der AG Lipp durchgeführt wurden.

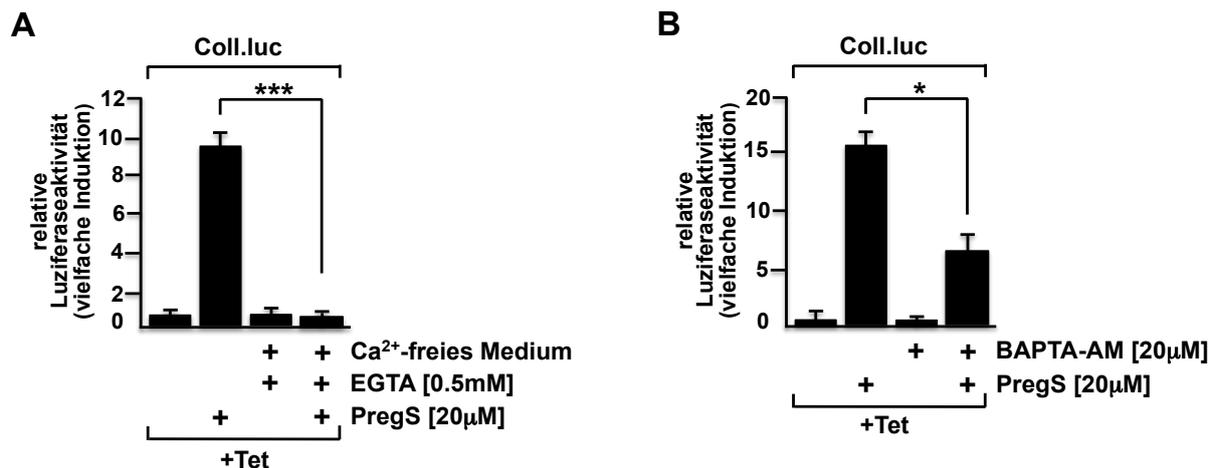


Abbildung 34: Die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3 Zellen erfordert einen Ca²⁺-Einstrom in die Zellen.

A HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Coll.luc-Reportergen kodiert. Die Zellen wurden mit Tetrazyklin 24h in serumreduziertem DMEM bzw. Ca²⁺-freiem Medium mit EGTA (0,5mM) versetzt, serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurde mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Coll.luc-Reportergen kodiert. Die Zellen wurden mit Tetrazyklin 24h in serumreduziert, anschließend 3-6 h mit BAPTA-AM (20µM) vorinkubiert und 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Als signifikant wurde gewertet, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

Durch Einsatz der extra- und intrazellulär wirkenden Ca²⁺-Chelatoren BAPTA-AM und EGTA resultierte die TRPM3-Stimulation mit Pregnenolonsulfat in einer verminderten AP-1-Aktivität. Das lässt darauf schließen, dass der Ca²⁺-Einstrom essentiell ist zur Aktivierung von AP-1.

In weiteren Experimenten wurde dies auf genetischer Ebene überprüft.

3.1.8.2 Die Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin A-Mutante verringert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1

Bisher konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Signalweg zur Aktivierung von AP-1 einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und einer daraus resultierenden Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bedingt. Durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels wird die Proteinphosphatase Calcineurin aktiviert (Rusnak & Mertz 2000). Calcineurin ist eine Proteinphosphatase vom Typ 2B, die spezifisch Serin- und Threoninreste am Substrat dephosphoryliert (Stewart et al. 1982, Crabtree 1999, 2001). Sie setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen; der katalytischen Untereinheit A (CnA), die eine Bindestelle für Calmodulin und die Untereinheit B besitzt, und die Untereinheit B (CnB), die 4 Ca^{2+} -Ionen mittels ihrer vier EF-Hand-Motive binden kann. Bei Aktivierung dephosphoryliert und inaktiviert sie spezifische Transkriptionsfaktoren. Die Überexpression von Calcineurin in humanen Neuroblastomazellen verringerte die AP-1-Aktivität nach Stimulation von M3 muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (Rössler et al. 2008).

Im Folgenden wurde die Frage untersucht, ob Calcineurin in die Signalkaskade eingreift, die die Aktivierung des TRPM3-Kanals mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 verknüpft.

Um die Rolle von Calcineurin in der Signalkaskade zur AP-1-Aktivierung zu messen, wurde ein Kollagenase/Promotor-Luziferase-Reportergen verwendet. Zusätzlich wurden die HEK293/TRPM3-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine konstitutiv aktive ΔCnA -Mutante kodierten (Abbildung 35 B). In dieser Mutante wurden die C-terminale autoinhibitorische Domäne und die Calmodulin-Bindestelle deletiert. Die Aktivität von ΔCnA ist somit unabhängig von Ca^{2+} -Ionen. Die Struktur von CnA und der mutierten Form ΔCnA ist in Abbildung 35 A gezeigt. Die Zellen wurden mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der AP-1-Aktivität in denjenigen Zellen, die ΔCnA exprimierten. Dies lässt darauf schließen, dass Calcineurin Teil der Signalkaskade ist, die den TRPM3-Kanal mit der AP-1-Aktivität verknüpfen. Ca^{2+} -aktivierte Calcineurin reguliert somit negativ die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1.

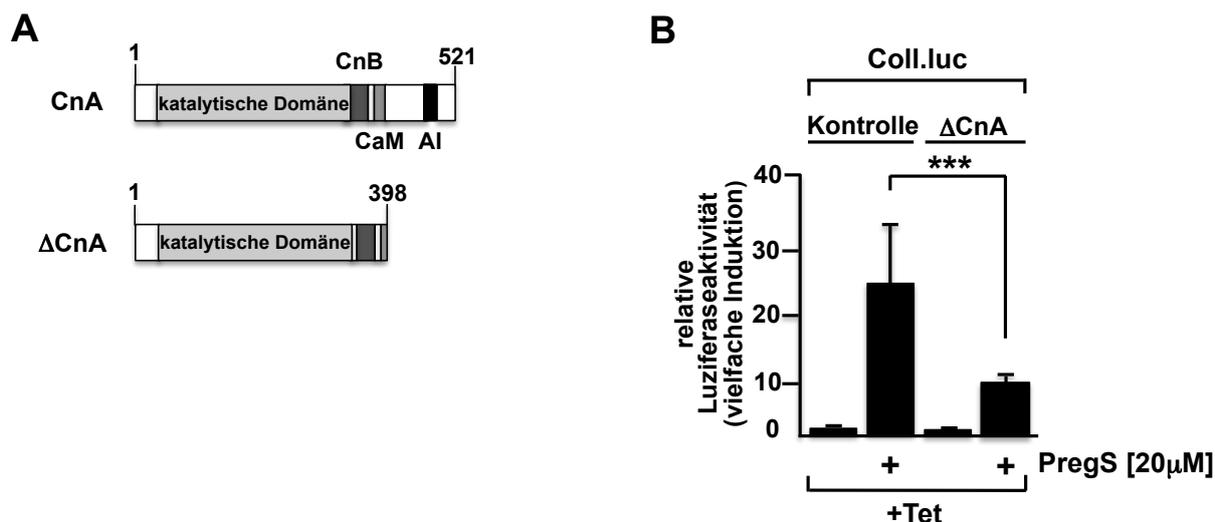


Abbildung 35: Die Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin A-Mutante blockiert die Signalkaskade zur Aktivierung von AP-1.

A Schematische Darstellung von Calcineurin A und der konstitutiv aktiven Mutante Δ CnA. Die Phosphatase besitzt die C-terminale autoinhibitorische Domäne (AI), die CnB-, und die Calmodulin (CaM)-Bindestelle. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden doppelinfiziert mit einem Lentivirus, das für ein Coll.luc-Reportergen kodierte und einem Lentivirus, das für die Calcineurin-Mutante Δ CnA kodierte. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der keine kodierende Region für ein Transgen enthielt. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die Signifikanz wurde ermittelt und als * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ dargestellt.

Ähnliche Ergebnisse konnten durch die Expression eines Δ CnA-EGFP-Fusionsproteins erzielt werden (Abbildung 36). Die Expression des EGFPs konnte hauptsächlich im Zytosol nachgewiesen werden. Dies bestätigt die zytoplasmatische Lokalisation des Calcineurins (Guerini et al. 1997).

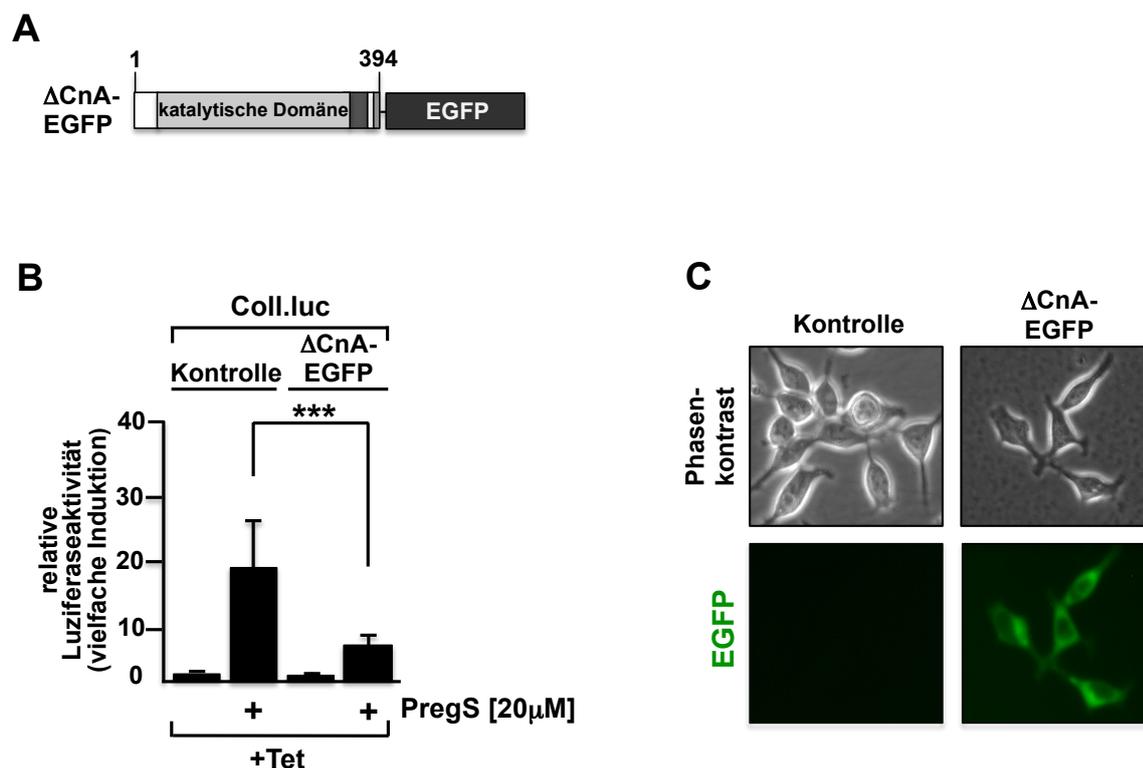


Abbildung 36: Die Expression eines Δ CnA-EGFP-Fusionsproteins verringert die TRPM3-vermittelte Aktivierung von AP-1.

A Schematische Darstellung von Δ CnA-EGFP. Das Fusionsprotein besteht aus einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A und EGFP. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden doppelinfiziert mit einem Lentiviren, die für ein Coll.luc-Reportergen kodierten und Lentiviren, die für Δ CnA-EGFP kodierten. Zur Kontrolle diente ein Lentivirus, das für kein Transgen kodiert. Die Zellen wurden serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Als signifikant wurde gewertet, wenn *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ***= $P < 0.001$. **C** Expression des Fusionsproteins Δ CnA-EGFP in HEK293/TRPM3. HEK293/TRPM3 Zellen wurden entweder mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für das Fusionsprotein kodiert oder einem Lentivirus, der mit Hilfe des Transfervektors pFUW hergestellt wurde, infiziert. Die Zellen wurden 4 Tage inkubiert und die Fluoreszenz detektiert.

3.1.8.3 Die Expression von Calcineurin B verringert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1

Die regulatorische Untereinheit B (CnB) von Calcineurin besitzt vier EF-Hand-Bindemotive für Ca^{2+} -Ionen. Strukturell hat sie eine hohe Ähnlichkeit zu dem Ca^{2+} -Rezeptorprotein Calmodulin. Bei Bindung von Kalzium an Calmodulin aktiviert dieses eine Reihe von Zielmolekülen, zu denen auch Calcineurin zählt.

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Calcineurin-Untereinheit A die Signaltransduktion negativ reguliert. Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss von Calcineurin B auf die TRPM3-vermittelte Aktivierung von AP-1 analysiert. Dazu wurde Calcineurin B in HEK293/TRPM3-Zellen überexprimiert. In Abbildung 37 C ist zu sehen, dass die verstärkte Expression von CnB eine deutliche Verringerung der AP-1-Aktivität nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat zur Folge hat. Die Expression des Flag-gekoppelten CnBs wurde mit spezifischen Antikörpern überprüft (Abbildung 37 B).

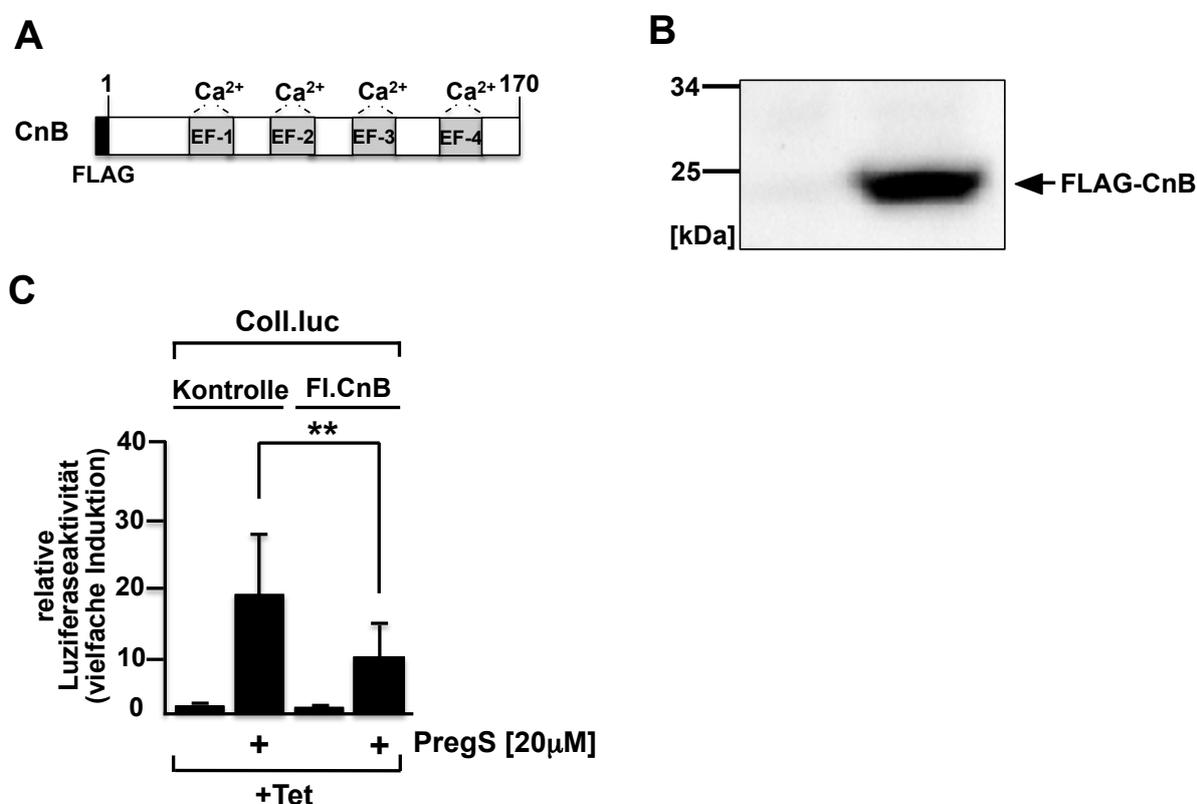


Abbildung 37: Die verstärkte Expression von CnB in 293/TRPM3-Zellen verringert die Aktivität von AP-1.

A Schematische Darstellung von Calcineurin B. Die vier EF-Hand-Motive zur Ca^{2+} -Bindung sind dargestellt. **B** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem FLAG-CnB-kodierenden Lentivirus oder zur Kontrolle einem Lentivirus, das mit dem Transfervektor pFUW generiert wurde infiziert und 3 Tage inkubiert. Die Zellextrakte wurden präpariert und die Expression des FLAG-getaggen CnB mit Hilfe eines Antikörpers gegen den FLAG-Tag im Western Blot nachgewiesen. **C** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Coll.luc-Reporter gen und zusätzlich mit einem CnB-kodierenden Lentivirus infiziert, das zusätzlich ein FLAG-Tag besitzt. Zur Kontrolle diente ein Lentivirus ohne kodierende Region für ein Transgen. Die Zellen wurden serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Als signifikant wurde gewertet, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

3.1.9 Der ERK-Signalweg dient zur Signalübertragung bei der TRPM3-vermittelten Transkription

3.1.9.1 Die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat induziert die Aktivierung von ERK1/2

Die Phosphorylierung der MAP-Kinase „extracellular signal-regulated protein kinase-1 und -2“ (ERK 1/2) ist in Insulinomazellen ein substantieller Bestandteil der Signalkaskade, die die Stimulation des TRPM3-Kanals mit der gesteigerten Aktivität von Egr-1 verbindet (Mayer et al. 2011, Thiel et al. 2013).

Um die Phosphorylierung von ERK1/2 zu analysieren, wurden TRPM3-exprimierende HEK293-Zellen mit Pregnenolonsulfat stimuliert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und das phosphorylierte ERK1/2 via Western Blot detektiert. Das Ergebnis zeigt, dass ERK1/2 bereits zehn Minuten nach Stimulation phosphoryliert wurde (Abbildung 38).

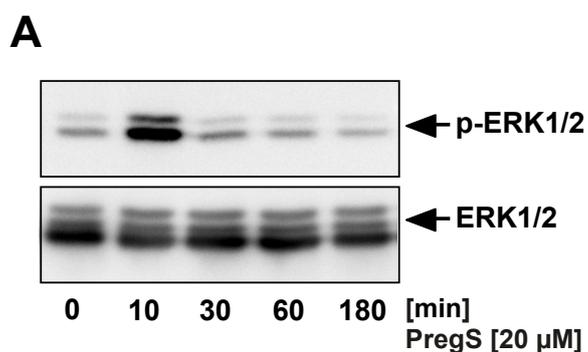


Abbildung 38: Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat induziert die Phosphorylierung von ERK1/2.

A HEK293/TRPM3-Zellen, wurden 24 h in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und danach mit Pregnenolonsulfat (20 µM) stimuliert. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0, 10, 30, 60 und 180 Minuten nach Stimulation geerntet. Ganzzellextrakte wurden präpariert und in einem Western Blot analysiert. Es wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierte aktive Form pp42 von ERK verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen ERK verwendet.

3.1.9.2 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2 -Signalweges reduziert die AP-1-Aktivität in HEK293/TRPM3-Zellen

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird aus einem Heterodimer aus c-Fos und c-Jun gebildet (Chiu et al. 1988, Curran & Franza 1988). Er bindet spezifisch an das TPA-responsive Element (TRE) (Steinmüller et al. 2001) diverser Gene. Der Kollagenase-Promotor enthält diese Sequenz und wurde aus diesem Grund zur Analyse der AP-1-Aktivität verwendet. Die Stimulation von Insulinomazellen mit Pregnenolonsulfat induzierte die ERK-Signalkaskade. Daher stellte sich die Frage, ob der ERK-Signalweg in der Signalübermittlung zur Induktion der AP-1-Aktivierung involviert ist. TRPM3-exprimierende Zellen wurden dazu mit einem Kollagenase/Promotor-Luziferasegen infiziert und vor Pregnenolonsulfat-Stimulation mit PD98059 behandelt. PD98059 ist ein selektiver Inhibitor der „mitogen-activated protein kinase kinase-1 und -2“ (MEK1/2) und blockiert die Aktivierung der MAP Kinase ERK1/2 (Rosen et al. 1994, Alessi et al. 1995).

Die Resultate in Abbildung 39 zeigen bei Zugabe von PD98059 eine signifikant reduzierte AP-1-Aktivität der HEK293/TRPM3-Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat. Dies untermauert die wichtige Rolle von ERK in der Signalkaskade, die nach TRPM3-Stimulation die Aktivierung von AP-1 induziert.

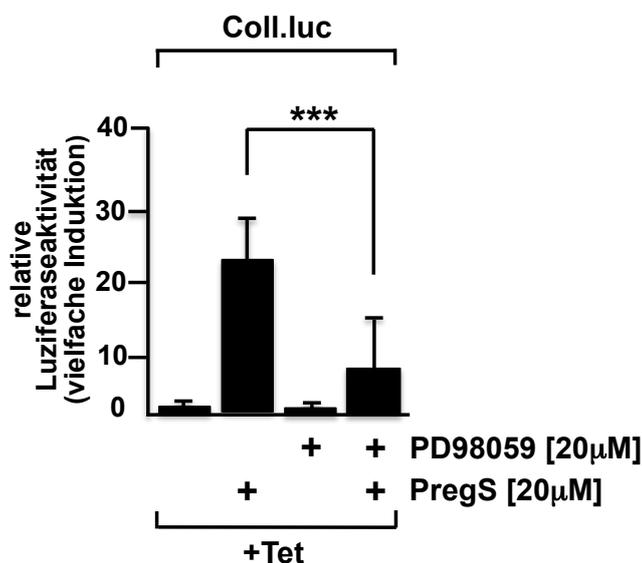


Abbildung 39: PD98059 blockt die Pregnenolonsulfat-induzierte AP-1-Aktivität in HEK293/TRPM3-Zellen.

HEK293/TRPM3-Zellen, die mit einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus infiziert wurden, wurden serumreduziert und nach 3 h Vorinkubation mit PD98059 (50 µM) mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20

μM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn $* = P < 0.05$; $** = P < 0.01$; $*** = P < 0.001$.

3.1.9.3 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2 -Signalweges blockt die Biosynthese von c-Jun in HEK293/TRPM3-Zellen.

Es wurde bereits publiziert, dass die Expression des bZIP-Transkriptionsfaktors c-Jun in Insulinomazellen und pankreatischen β -Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat hochreguliert wird (Müller et al. 2011). Daher stellte sich die Frage, ob der ERK-Signalweg ebenfalls für die Induktion der c-Jun-Biosynthese nach Aktivierung des TRPM3-Kanals involviert ist. Die TRPM3-exprimierenden Zellen wurden zunächst mit PD98059 behandelt und dann mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die c-Jun-Expression wurde anhand einer Western Blot-analyse mit spezifischen c-Jun-Antikörpern analysiert. Die Resultate zeigten eine Inhibierung der c-Jun-Biosynthese bei Behandlung der Zellen mit PD98059 nach Stimulation des TRPM3 mit Pregnenolonsulfat..

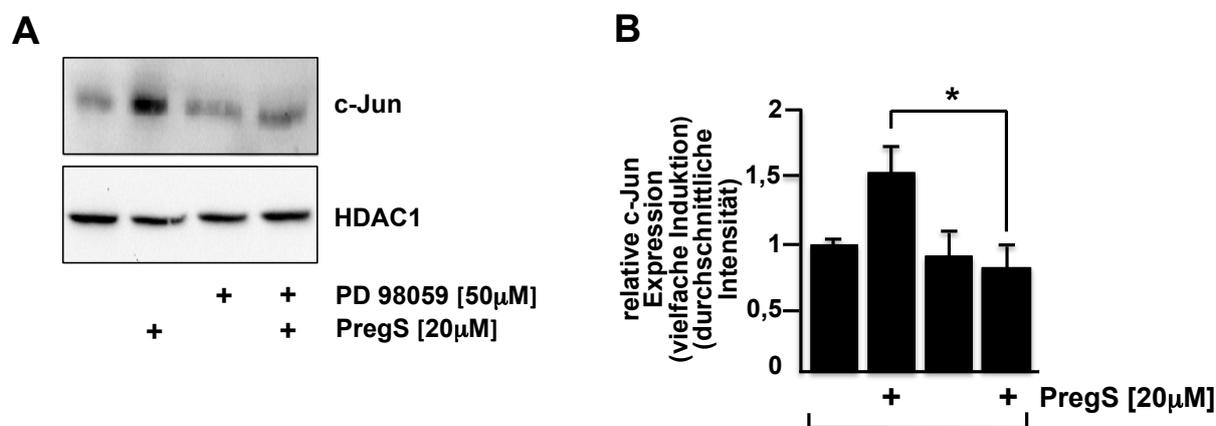


Abbildung 40: PD98059 blockt die Pregnenolonsulfat-induzierte Biosynthese von c-Jun in HEK293/TRPM3-Zellen.

A HEK293/TRPM3-Zellen wurden 24 h serumreduziert, 24 h vorinkubiert mit PD98059 und anschließend mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und c-Jun bzw. HDAC1 als Ladekontrolle mit spezifischen Antikörpern in einem Western Blot nachgewiesen. **B** Quantifizierung der c-Jun Expression. Die Intensität des c-Jun-Signals im Western Blot wurde auf die HDAC1-Ladekontrolle normiert. Die Daten wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn $* = P < 0.05$; $** = P < 0.01$; $*** = P < 0.001$.

3.1.9.4 Die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2-Signalweges blockt ebenfalls die c-Fos-Promotoraktivität in HEK293/TRPM3-Zellen

AP-1 kann auch aus einem Heterodimer aus c-Jun und c-Fos gebildet werden (Chiu et al. 1988, Curran & Franza 1988). Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Expression von c-Fos untersucht.

TRPM3-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für den humanen cFos-Promotor (hcFos) kodierten. Dies diente zur Darstellung der cFos-Promotoraktivität. Um den ERK-Signalweg zu inhibieren, wurden die Zellen mit PD98059 inkubiert.

Das Ergebnis zeigt, dass die Hemmung des ERK-Signalwegs zu einer signifikanten Abschwächung der PregS-induzierten Aktivierung des cFos-Promotors führte.

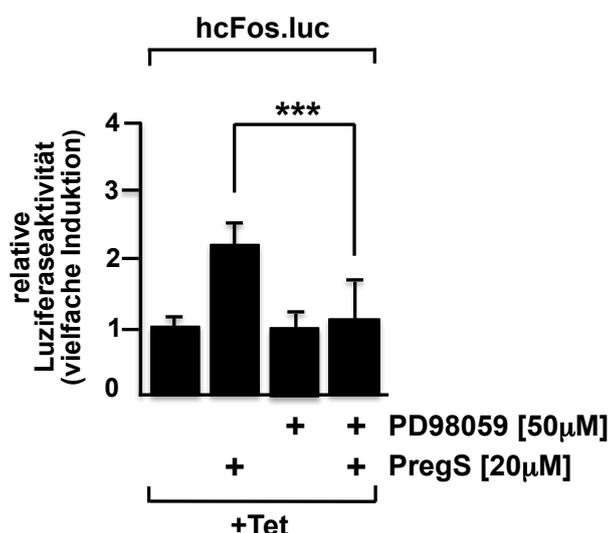


Abbildung 41: PD98059 blockt die Pregnenolonsulfat-induzierte Promotoraktivität von c-Fos in HEK293/TRPM3-Zellen.

A HEK293/TRPM3-Zellen, wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines humanen c-Fos-Promotors kodiert. Die Zellen wurden mit Tetrazyklin serumreduziert, 3 h mit PD98059 (50 µM) inkubiert und mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 µM) stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten gelten als signifikant, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

Durch die verringerte Biosynthese von c-Jun und die erniedrigte c-Fos-Promotoraktivität lässt sich die reduzierte AP-1-Aktivität erklären.

3.1.9.5 Die Expression einer spezifischen shRNA gegen ERK verringert die AP-1 Aktivität nach Stimulation von HEK293 Δ B-Raf:ER-Zellen mit 4-OHT

In den bisherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Aktivierung des ERK-Signalwegs bei der Verknüpfung der Pregnenolonsulfat-bedingten TRPM3-Aktivierung mit der Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors eine essentielle Rolle spielt. Um eine direkte und gezielte Aktivierung des ERK-Signalweges zu induzieren, wurde eine HEK293 Δ B-Raf:ER-Zelllinie verwendet, die ein Δ B-Raf:ER-Östrogenrezeptor-Fusionsprotein, einer aktivierbaren Form der Proteinkinase B-Raf, stabil exprimiert. Die modulare Struktur von B-Raf und der Mutante Δ B-Raf, sowie die Wirkungsweise des Hormonrezeptorkomplexes ist schematisch in Abbildung 42 dargestellt. B-Raf besteht aus drei funktionalen Domänen: den beiden N-terminal-lokalisierten regulatorischen Domänen CR1 und CR2 und der C-terminalen Proteinkinasedomäne CR3. CR1 ist eine Cystein-reiche Domäne, die zur Bindung von aktiviertem Ras dient. CR2 ist eine Serin-und Threonin-reiche Domäne, die negativ die biologische Aktivität der katalytischen Domäne reguliert. Raf wird durch Bindung von Ras und zusätzlich durch Phosphorylierung aktiviert. Eine Punktmutation in der Bindedomäne (G525R) bewirkt eine konstitutiv aktive Form von Raf, die als Folge ERK konstitutiv aktiviert. Um das Fusionsprotein Δ B-Raf:ER zu generieren, wurde die katalytische Domäne von B-Raf an die Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER) fusioniert. Die Aktivität wird jedoch durch Bindung des Hitzeschockproteins 90 an der Kinasedomäne blockiert und somit im inaktiven Zustand gehalten (schematisch dargestellt in Abbildung 41 B). Erst in Anwesenheit des Hormons Östrogen wird das HSP90 verdrängt und es kommt zur konstitutiven Aktivierung von B-Raf (Thiel et al. 2009) und des MAPK-Signalweges. Die Verwendung der Östrogenrezeptormutante ER^{Tamoxifen Mutant} (ERTM) lässt eine Induktion des MAPK-Signalweges durch den synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) zu. Der ERK-Signalweg kann durch Stimulation der Zellen mit 4-OHT aktiviert werden (Pritchard et al 1995, Al-Sarraj et al. 2005). Das Δ B-Raf:ERTM-System dient somit zur gezielten Aktivierung von Raf und der Untersuchung des ERK-Signalwegs.

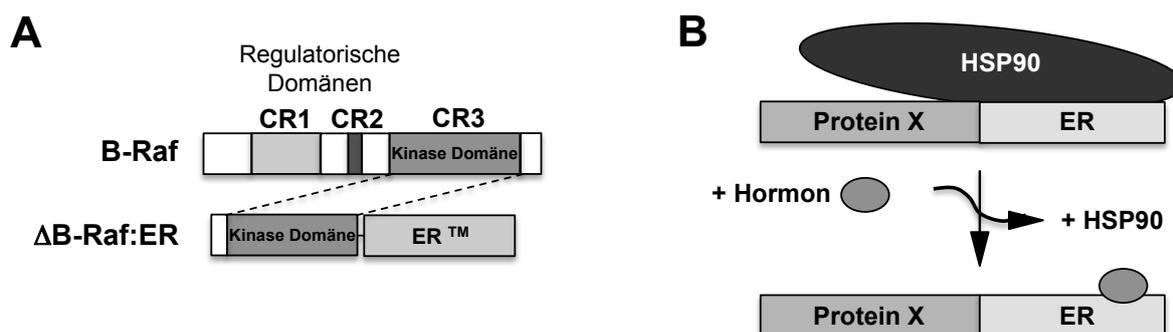


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Δ BRaf:ERTM-Fusionsproteins und dessen Funktionsweise.

A Modulare Struktur von B-Raf und der konstitutiv aktiven Form Δ B-Raf:ER. Die funktionalen Domänen von B-Raf (CR1-3) sind gezeigt. CR1 dient als Bindestelle für Ras an der Zellmembran, CR2 reguliert negativ die biologische Aktivität der katalytischen Domäne. CR3 umfasst die Proteinkinasedomäne. Das Fusionsprotein Δ B-Raf:ERTM wurde durch Anfügen der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors an die CR3-Domäne von B-Raf generiert. **B** Das Hitzeschockprotein 90 blockiert durch sterische Wechselwirkung die Bindestelle des Hormons. Durch Zugabe von Östrogen bindet dieses an den mutierten Rezeptor (ERTM), das HSP90 dissoziiert ab und es kommt zur Aktivierung des Proteins (Abbildung aus Thiel und Rössler 2005).

Um zu überprüfen, dass die ERK-spezifischen shRNAs den ERK-Signalweg inhibieren können, wurde zuerst ein Kontrollversuch in HEK293/ Δ B-Raf:ER-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie exprimiert das Δ B-Raf:ERTM-Fusionsprotein. Durch Stimulation mit 4-OHT wird der ERK-Signalweg konstitutiv aktiviert.

Die Zellen wurden dazu mit Lentiviren infiziert, die für ein Coll.luc-Reporter gen kodierten und zusätzlich mit Lentiviren, die für ERK-spezifische shRNAs kodierten. Zur Kontrolle wurden Lentiviren verwendet, die mit dem Leervektor pLL3.7 hergestellt wurden. Die HEK293/ Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) stimuliert. Dies bewirkt eine gesteigerte AP-1-Aktivität (Kaufmann et al 2013). Die Ergebnisse zeigten, dass die AP-1-Aktivität in den Zellen, die ERK-spezifische shRNAs exprimierten, deutlich verringert (in Abbildung 43 zu sehen). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass der ERK-Signalweg durch die Expression von ERK-spezifischen shRNAs geblockt wurde.

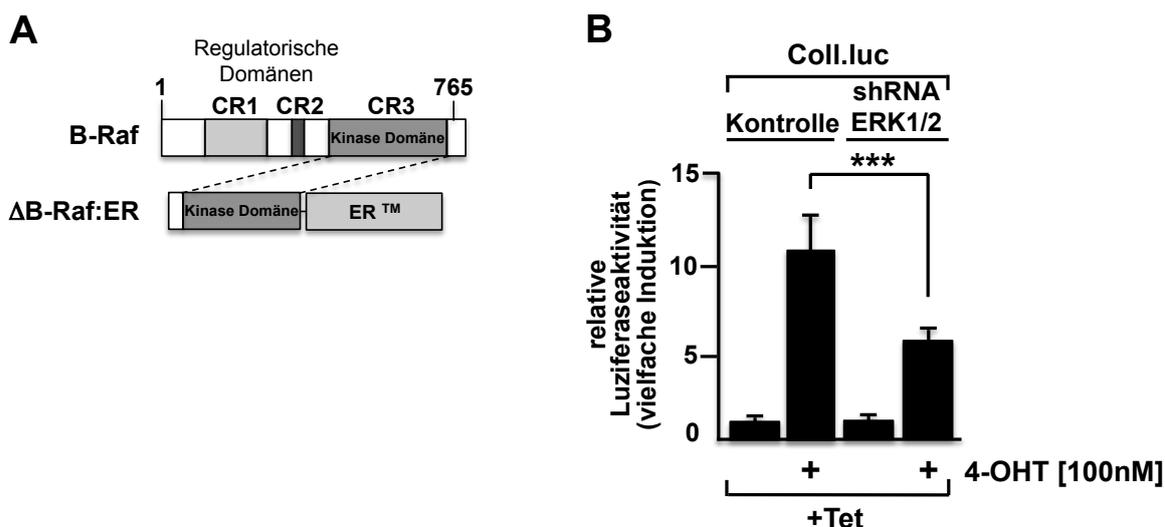


Abbildung 43: Die Expression von ERK1/2-spezifischen shRNAs verringert die B-Raf-induzierte Aktivierung von AP-1.

A Modulare Struktur von B-Raf und der konstitutiv aktiven Form Δ B-Raf:ER. **B** HEK293/ Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit einem Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter-gen-kodierenden Lentivirus und zusätzlich mit Lentiviren infiziert, die für ERK1/2-spezifische shRNAs kodieren. Die Zellen wurden serumreduziert und 24 h mit 4-OHT (100 nM) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität analysiert und normiert.

Da die ERK-spezifischen shRNAs den ERK-Signalweg inhibieren, wurden sie zur Analyse des ERK-Signalwegs in dem TRPM3-Modellsystem angewandt.

3.1.9.6 Die Inhibierung der ERK1/2-Expression vermindert die PregS-induzierte Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen

In HEK293-Zellen existieren zwei Isoformen von ERK; ERK1 und 2. Um die bisherigen Ergebnisse auch auf genetischer Ebene zu bestätigen, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem die Expression von ERK durch Expression spezifischer shRNAs inhibiert wurde. Dazu wurden die HEK293/TRPM3-Zellen mit Kollagenase/Promotor-Luziferase-Reporter-gen-kodierenden Lentiviren und zusätzlich mit einem Lentivirus infiziert, das für eine ERK-spezifische shRNA kodiert. Zur Kontrolle wurde ein Lentivirus verwendet, das mit Hilfe des Transfervektors pLL3.7 generiert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Hemmung des ERK-

Signalweges die AP-1-Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 signifikant verringert ist (Abbildung 44)

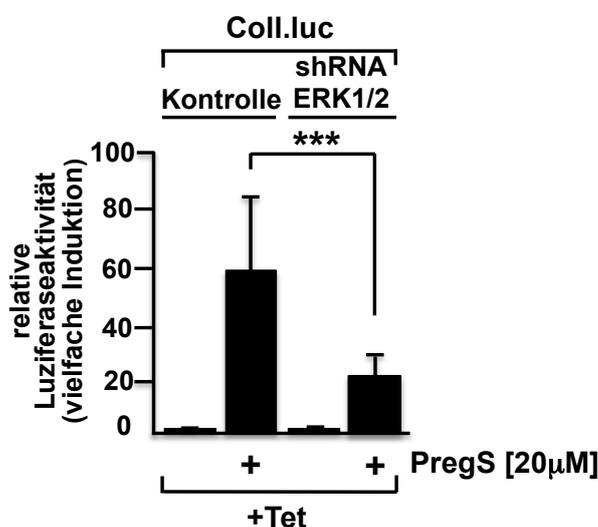


Abbildung 44: Inhibierung der ERK1/2-Expression durch eine shRNA vermindert die Aktivität von AP-1 nach Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat.

HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit einem Coll.luc-Reportergen-kodierenden Lentivirus und einem Lentivirus, das für eine ERK1/2-spezifische shRNA kodierte, infiziert. Die Zellen wurden serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 µM) stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten wurden als signifikant gewertet, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

Die vorherigen Ergebnisse zeigten eine Reduktion der AP-1-Aktivität wenn der ERK-Signalweg durch PD98059 oder durch Expression ERK-spezifischer shRNAs inhibiert wird. Dies bekräftigt ERK als einen wichtigen Bestandteil der Signaltransduktionskaskade, die die Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 mit der Aktivität des AP-1-Transkriptionsfaktors verbindet.

3.1.9.7 Die Proteinphosphatase MKP-1 interferiert mit der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation des TRPM3 Kanals in HEK293/TRPM3-Zellen

Die MAP-Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1) dephosphoryliert und inaktiviert die MAP Kinasen ERK, p38 und JNK im Zellkern (Shapiro und Ahn 1998, Slack et al. 2001). Phosphoryliertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern und induziert dort die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Chen et al 1992). Es wurde bereits publiziert, dass die Aktivierung der MAP Kinasen eine Steigerung der AP-1 Aktivität zur Folge hat (Karin 1995, Whitmarsh und Davis, 1996, Kaufmann et al. 2013), und die Expression von MKP-1 die Gentranskription AP-1 regulierter Gene abschwächt (Rössler et al. 2008, Rössler und Thiel 2009, Thiel et al. 2012). Zusätzlich verringerte MKP-1 die Pregnenolonsulfat-induzierte verstärkte Expression von Egr-1 in Insulinomazellen (Mayer et al. 2011). Zudem konnte in dem vorangegangenen Experiment gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition von ERK1/2 mit PD98059 zu einer verringerten Aktivierung von AP-1 führt (Lesch et al. 2016).

Im Folgenden wurde aufgeklärt, ob phosphoryliertes ERK im Zellkern zur Aktivierung an AP-1-regulierter Transkription benötigt wird. Um dies aufzuklären, wurde durch lentiviralen Gentransfer die MAP-Kinase-Phosphatase-1 im Zellkern exprimiert und die Auswirkung anhand eines Reporterassays überprüft. Dazu wurden HEK293/TRPM3-Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für MKP-1 kodierte.

Die Resultate zeigen, dass die Expression von MKP-1 die Pregnenolonsulfat-aktivierten Transkription AP-1-regulierter Gene nach Aktivierung des TRPM3-Kanals in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen verringert (siehe Abbildung 45). Dieses Ergebnis belegt, dass die Beteiligung von aktiviertem ERK innerhalb des Zellkerns erforderlich ist, um die Signalkaskade nach Stimulation des TRPM3-Kanals mit der AP-1 regulierten Gentranskription zu verknüpfen.

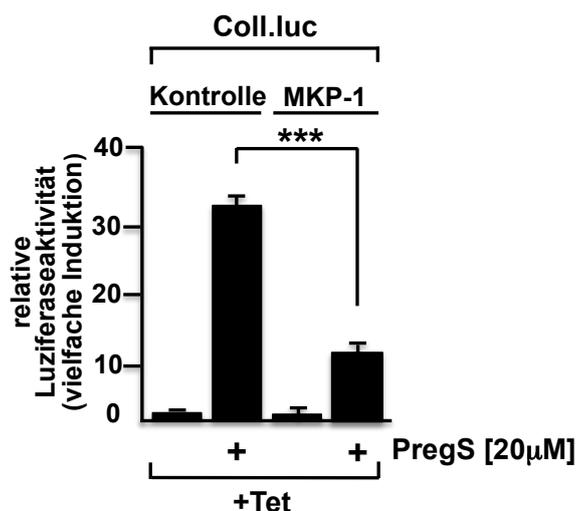


Abbildung 45: Die Expression von MKP-1 inhibiert die Pregnenolonsulfat-induzierte AP-1-Aktivität.

HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Coll.luc-Reportergen kodierte. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem MKP-1-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

3.1.9.8 Die Expression von MKP-5 interferiert mit der TRPM3-induzierten Aktivierung von AP-1

Die MAP-Kinase Phosphatase MKP-1 dephosphoryliert die Kinasen p38, die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und ERK. MKP-5 dephosphoryliert hingegen ausschließlich JNK und p38 (Tanoue et al. 1999). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob JNK1/2 oder p38 ebenso wichtiger Teil der Signalkaskade ist, die nach Stimulation des TRPM3 zur erhöhten AP-1-Aktivität führt.

Dazu wurden HEK293/TRPM3-Zellen mit einem AP-1-responsiven Reportergen und einem MKP-5-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Ergebnisse in Abbildung 46 zeigten, dass die Expression von MKP-5 nach Stimulation von TRPM3 zu einer deutlich verringerten AP-1-Aktivität führt.

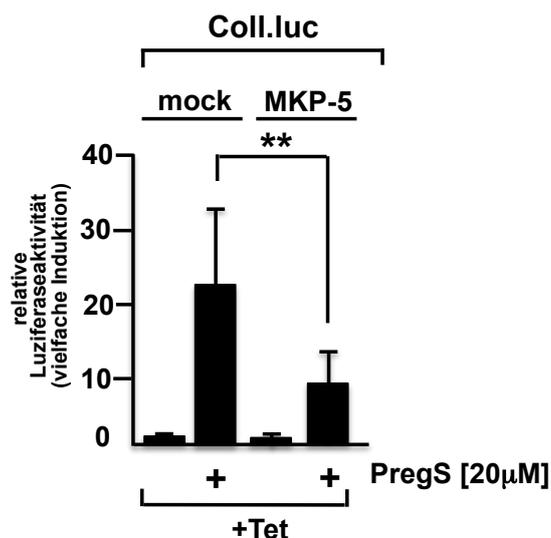


Abbildung 46: Die Expression von MKP-5 reduziert die AP-1-Aktivität nach PregS-Stimulation.

A HEK293/TRPM3-Zellen wurden gleichzeitig mit einem AP-1-responsiven-Reporter gen kodierenden Lentivirus und zusätzlich mit einem Lentivirus infiziert, das für die MAP-Kinase Phosphatase 5 (MKP-5) kodiert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin serumreduziert und mit PregS stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität auf die Proteinmenge normiert. Das Ergebnis wurde als signifikant eingestuft, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ ist.

3.1.10 Der JNK-Signalweg dient ebenfalls als Vermittler AP-1 regulierter Genexpression nach PregS-Stimulation des TRPM3

Die vorangegangenen Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von JNK oder p38 als Teil der Signalkaskade nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 hinsichtlich der AP-1-Aktivierung hin. Dies wurde im Folgenden genauer analysiert. Die Expression von c-Jun ist ein essentieller Bestandteil in der Verbindung zwischen Aktivierung von TRPM3 mit einer erhöhten AP-1-Aktivität (Lesch et al. 2015), da c-Jun ein wichtiges Substrat von JNK darstellt. JNK wird durch die Mitogen-aktivierte/extrazellulär Signal-responsive Kinase Kinase (MEK) Kinase-1 reguliert.

3.1.10.1 Die pharmakologische Inhibierung des JNK-Signalweges durch den JNK-Inhibitor SP600125 reduziert die Aktivierung von AP-1 nach TRPM3-Stimulation

Um die Rolle von JNK in der TRPM3-vermittelten Signalkaskade zu überprüfen, wurde zunächst SP600125, ein pharmakologischer Inhibitor von JNK verwendet (Bennett et al. 2001). Dazu wurden HEK293/TRPM3-Zellen mit einem AP-1-responsiven Lentivirus infiziert und vor PregS-Stimulation mit dem Inhibitor behandelt. Das Ergebnis, dargestellt in Abbildung 47, zeigt eine deutliche Verringerung der AP-1-Aktivität bei Behandlung der TRPM3-Zellen mit SP600125.

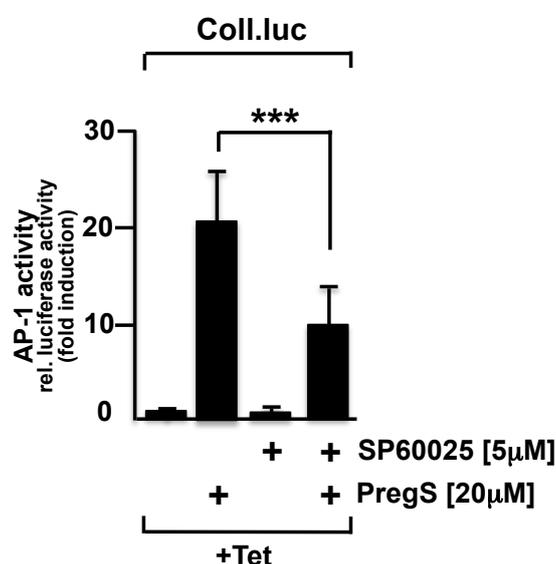


Abbildung 47: Die Behandlung der HEK293/TRPM3-Zellen mit SP600125 inhibiert die AP-1-Aktivität nach PregS-Stimulation.

A HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit einem AP-1-responsiven-Reportergen kodierenden Lentivirus infiziert, in Anwesenheit von Tetrazyklin serumreduziert und vor Stimulation mit PregS 3h mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luziferaseaktivität auf die Proteinmenge normiert. Dargestellt als signifikant, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

3.1.10.2 Die Expression JNK-spezifischer shRNAs inhibiert die AP-1-Aktivität nach TRPM3-Stimulation

Da SP600125 JNK inhibiert, aber auch dafür bekannt ist, andere Kinasen (Bain et al. 2003) zu inhibieren, wurde die JNK Signalkaskade genetisch blockiert. Es wurde eine JNK1/2-spezifische shRNA exprimiert. Um die Funktionalität des JNK-Signalwegs zu überprüfen, wurde in den HEK293/TRPM3-Zellen eine konstitutiv aktive Mutante von MEKK1 exprimiert: MEKK1 Δ . Dadurch wird der JNK-Signalweg konstitutiv angeschaltet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der MEKK1-Mutante zu einer erhöhten Transkription AP-1-regulierter Gene führt. Die Expression der shRNA verringerte die Aktivität von AP-1 in HEK293/TRPM3 -Zellen bei gleichzeitiger Expression von MEKK1 Δ (Abbildung 48 A). In Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen wurde ebenfalls die AP-1-Aktivität durch die Expression der shRNA vermindert (gezeigt in Abbildung 47 B). Dies lässt darauf schließen, dass eine Aktivierung des JNK-Signalweges ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade darstellt, die die Aktivierung des TRPM3-Kanals mit einer erhöhten Aktivität von AP-1 darstellt.

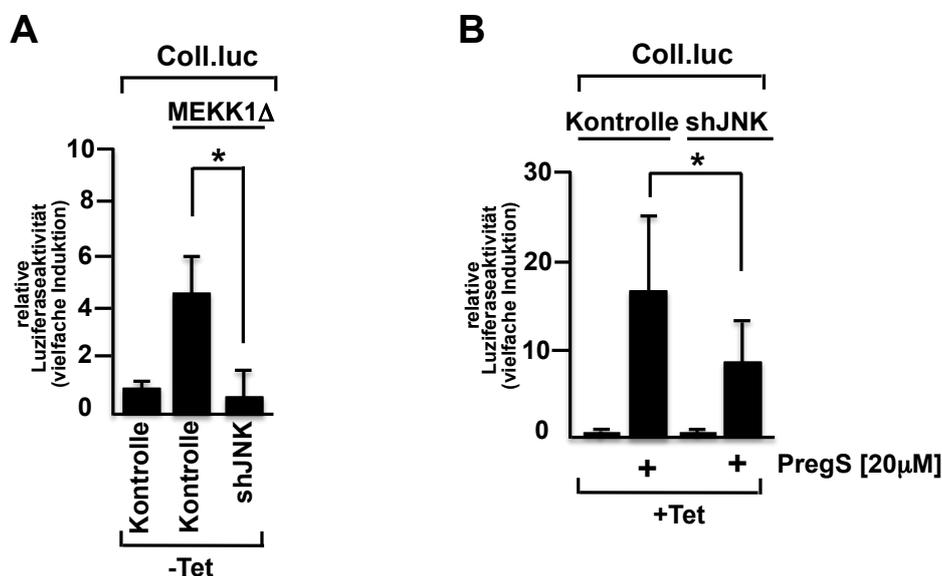


Abbildung 48: Die Expression JNK-spezifischer shRNAs blockt die AP-1-Aktivität nach PregS-Stimulation in HEK293/TRPM3-Zellen.

A HEK293/TRPM3-Zellen wurden dreifach infiziert mit einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus, einem MEKK1 Δ -kodierenden -und einer JNK-spezifischen shRNA-kodierenden Lentivirus. Die Zellen wurden nach 24h serumreduziert und die relative Luziferaseaktivität bestimmt. **B** HEK293/TRPM3-

Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Coll.luc-Reportergen kodierten. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die für die JNK1/2-spezifische shRNAs kodierten. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin serumreduziert, mit Pregnenolonsulfat stimuliert und die relative Luziferaseaktivität bestimmt. Als Kontrolle diente ein Lentivirus, der mit dem Transfervektor pFUW generiert wurde. Die Experimente wurden als signifikant dargestellt, wenn *= P < 0.05; **= P < 0.01; ***= P < 0.001.

3.1.11 Die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung der Transkription in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen bedarf der Aktivierung von AP-1

3.1.11.1 Die dominant-negative Mutante c-Jun Δ N blockiert die Aktivierung von AP-1 durch MEKK1 und MKK6

Die biologische Wirksamkeit der c-Jun-Mutante: c-Jun Δ N wurde überprüft. Um dies zu demonstrieren, wurde in HEK293/TRPM3-Zellen konstitutiv aktive Mutanten der Proteinkinasen MEKK1 oder MKK6 exprimiert. MEKK1 und MKK6 aktivieren beide den JNK-Signalweg. Zusätzlich wurde die dominant-negative Mutante von c-Jun Δ N exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass in denjenigen Zellen, die MEKK1 Δ oder MKK6E exprimierten, bei gleichzeitiger Expression von c-Jun Δ N die Aktivierung von AP-1 verringert war. Zur Kontrolle der Infektionsrate wurden die HEK293/TRPM3-Zellen mit einem Lentivirus, das für c-Jun-spezifische shRNAs kodierte, infiziert, und die Expression des gekoppelten EGFP dokumentiert.

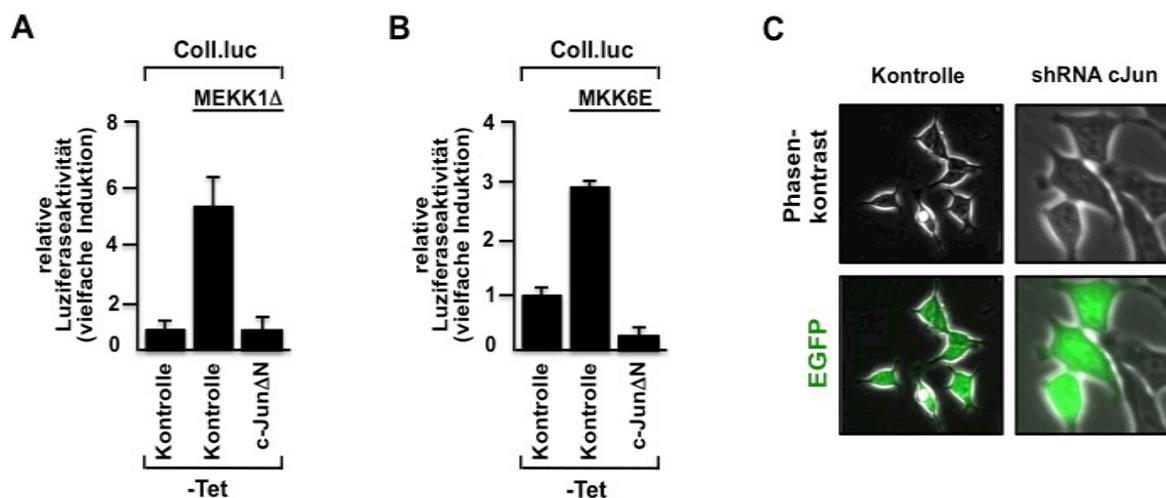


Abbildung 49: Die AP-1-Aktivierung durch MEKK1D und MKK6E-ist durch c-Jun Δ N verringert.

A. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus, und einem Lentivirus, das für eine konstitutiv aktive Mutante von MEKK1 (**A**) bzw. MKK6 (**B**) kodierte, infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem cJun Δ N-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 24h serumreduziert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen und normiert. **C** Zur Kontrolle wurden der Expression wurden HEK293/TRPM3 Zellen mit einem Lentivirus, das für eine cJun-spezifische shRNA kodierte, infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem pLL3.7-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert und die Expression von EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3.1.11.2 c-Jun ist für die Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen erforderlich

Um die Rolle von c-Jun in der Regulation der AP-1-Aktivität zu untersuchen, wurde eine dominant-negative Form von c-Jun verwendet; c-Jun Δ N. Die Struktur von c-Jun und vergleichsweise von c-Jun Δ N ist in Abbildung 50 A zu sehen. Da der Mutante c-Jun Δ N die Aktivierungsdomäne fehlt, kann sie zwar mit Proteinen der bZIP-Familie dimerisieren und an die DNA binden, aber keine Transkription initiieren. Die Mutante blockt die Bindung des Wildtyp-c-Juns an die DNA. HEK293-Zellen die unter Tetrazyklinzugabe den TRPM3 Kanal exprimieren, wurden mit einem Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter-gen-kodierenden Lentivirus und zusätzlich mit einem, für c-Jun Δ N-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden serumreduziert, stimuliert und die Luciferaseaktivität gemessen. Das Ergebnis zeigt eine verminderte Transkription AP-1-regulierter Gene nach Stimulation des TRPM3 in HEK293 Zellen,

wenn die dominant-negative Mutante c-Jun Δ N exprimiert wurde. Dies belegt eine Beteiligung von c-Jun oder ein Dimerisierungspartner von c-Jun an der Regulation der AP-1 Aktivität beteiligt ist.

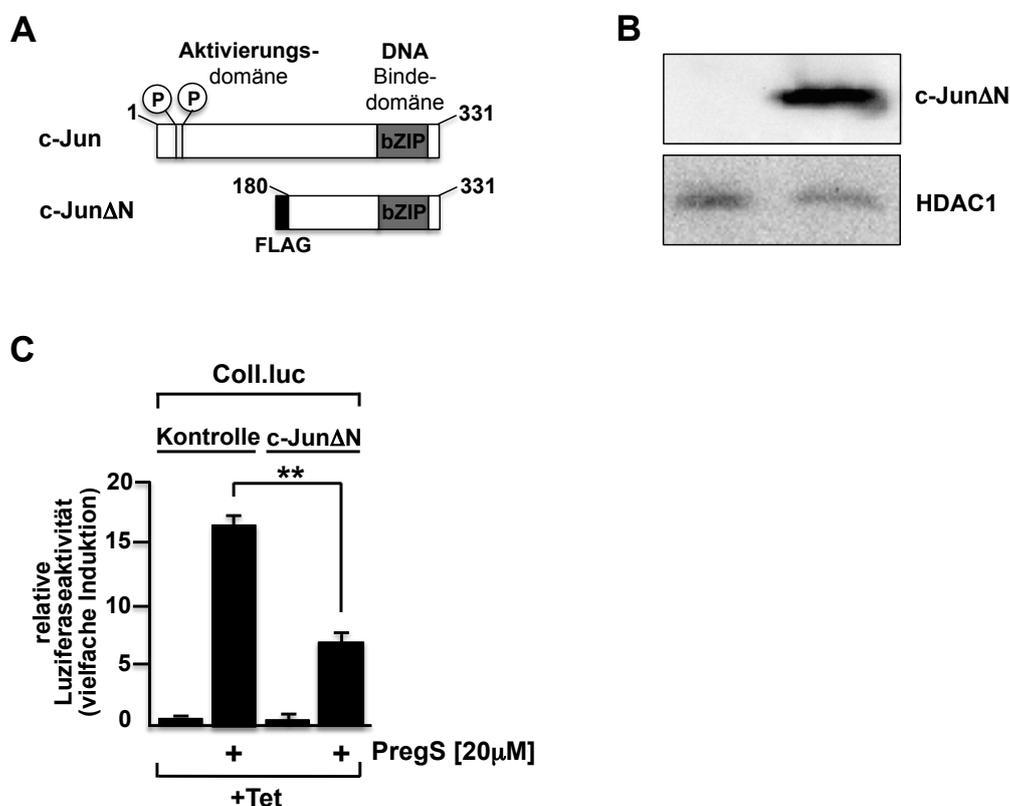


Abbildung 50: Der bZIP-Transkriptionsfaktor c-Jun ist erforderlich für die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1 regulierter Gene.

A Schematische Darstellung des bZIP-Transkriptionsfaktors c-Jun und der dominant-negativen Form c-Jun Δ N. c-Jun Δ N besitzt die Aminosäuren 188 bis 331 von c-Jun zur Dimerisierung und DNA-Bindung und einen FLAG-Tag zum immunologischen Nachweis. Die NH₂-terminale Aktivierungsdomäne fehlt hingegen. **B** Western Blot Analyse der Expression der dominant-negativen Mutante c-Jun Δ N. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für c-Jun Δ N kodiert und 3 Tage inkubiert. Kernextrakte wurden präpariert und mittels Western Blot unter Verwendung eines M2-FLAG-Antikörpers analysiert. **C** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Coll.luc-Reportergen kodierten. Zusätzlich wurde ein Lentivirus zur Infektion verwandt, das für eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors c-Jun; c-Jun Δ N, kodierte. Als Kontrolle diente ein Lentivirus, das mit dem Leerplasmid pFUW generiert wurde. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

Um diese Resultate zu untermauern, wurden HEK293/TRPM3-Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentiviren infiziert, die für c-Jun spezifische shRNAs kodierten. Danach wurden die Zellen serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Analyse der AP-1-Aktivität zeigte, dass die Expression der c-Jun-spezifischen shRNA die AP-1-Aktivität fast vollständig inhibierte. Dies zeigt, dass c-Jun nötig ist, um die Aktivierung von TRPM3 mit der gesteigerten AP-1-Aktivität in Verbindung zu bringen.

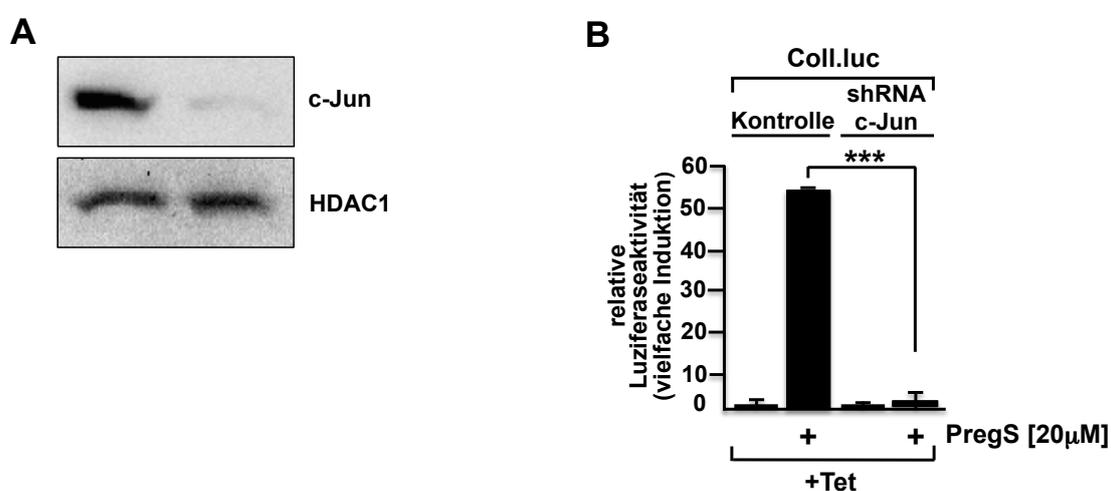


Abbildung 51: Die Expression von c-Jun-spezifischen shRNAs verringern die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1.

A HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für c-Jun-spezifische shRNAs kodierten. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem pLL3.7-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert, Kernextrakte präpariert und c-Jun in einer Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen c-Jun bzw. HDAC1 als Ladekontrolle nachgewiesen. **B** HEK293/TRPM3-Zellen wurden infiziert mit einem rekombinanten Lentivirus, das für Reporter gen kodiert, das die Luziferase unter der Kontrolle eines Kollagenasepromotors kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das für spezifische c-Jun-shRNAs kodiert. Zur Kontrolle diente ein Lentivirus, das mit Hilfe des Transferplasmids pLL3.7 generiert wurde. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

3.1.11.3 Die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des TRPM3 Kanals induziert ein verstärktes transkriptionelles Aktivierungspotential von ATF2

Um zu untersuchen, ob ATF2 ebenfalls in der TRPM3-induzierten Signalkaskade involviert ist, die zur Transkription AP-1-regulierter Gene führt, wurde das transkriptionelle Aktivierungspotential von ATF2 getestet. Dazu wurde ein GAL4-ATF2-Fusionsprotein verwendet, das die Phosphorylierungs-abhängige Aktivierungsdomäne von ATF2 und die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 besaß. Um die biologische Aktivität des GAL4-ATF2 Fusionsproteins zu bestimmen, wurde durch lentiviralen Gentransfer ein GAL4-responsives Promotor/Luziferase-Reportergen in das Chromatin der HEK293/TRPM3 Zellen integriert. Außerdem wurden die Zellen mit einem GAL4-ATF2 kodierenden Lentivirus infiziert. In Abbildung 51 ist zu sehen, dass das transkriptionelle Aktivierungspotential von ATF2 in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen signifikant erhöht war, die zuvor mit Pregnenolonsulfat stimuliert wurden.

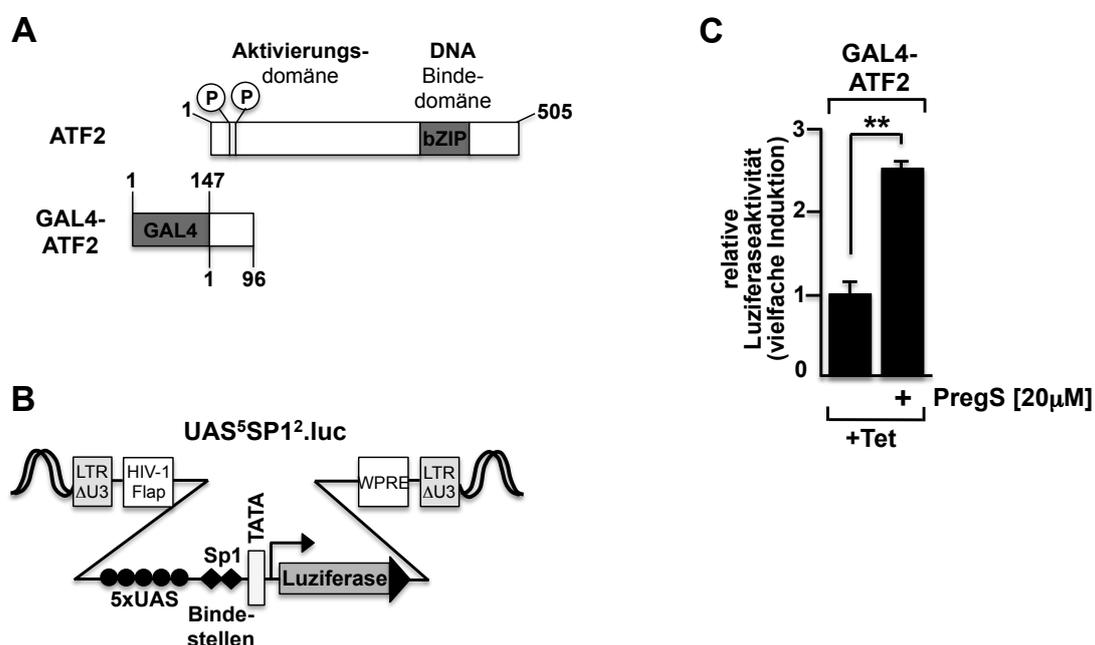


Abbildung 52: Das transkriptionelle Aktivierungspotential von ATF2 ist in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3 Zellen erhöht.

A Schematische Darstellung des bZIP-Transkriptionsfaktors ATF2 und des Fusionsproteins GAL4-ATF2. ATF2 besitzt eine N-terminale, Phosphorylierungs-abhängige Aktivierungsdomäne, die durch p38, JNK und ERK aktiviert werden und eine DNA-Bindedomäne. Das GAL4-ATF2-Fusionsprotein

besteht aus der N-terminalen DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4, die an die N-terminale Aktivierungsdomäne von ATF2 von der Aminosäuren 1-96 fusioniert wurde. **B** Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors kodiert, der aus zwei Sp1-Bindestellen, einer TATA-Box und einem Initiatorelement besteht. Dem Minimalpromotor sind fünf Bindestellen für GAL4 vorgelagert. **C** HEK293/TRPM3 Zellen wurden doppelt infiziert mit einem GAL4-responsiven Luziferase-Reportergen und einem GAL4-ATF2 kodierenden Lentivirus. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert.

3.1.11.4 Die dominant-negative Mutante ATF2 Δ N blockiert die Aktivierung von AP-1 durch MEKK1 und MKK6

Um die biologische Aktivität der ATF2-Mutante ATF2 Δ N zu überprüfen wurden die HEK293/TRPM3-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für die dominant-negative Variante ATF2 Δ N kodierten. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren, die für konstitutiv aktive Mutanten der Proteinkinasen MEKK1 bzw. MKK6 kodierten, infiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Expression von ATF2 Δ N die MKK6- und die MEKK1-induzierte Aktivierung von AP-1 reduziert war. Die Infektionsrate der HEK293/TRPM3-Zellen wurde durch Expression von EGFP kontrolliert, indem die Zellen mit einem Lentivirus infiziert wurden, das für eine ATF2-spezifische shRNA kodierte.

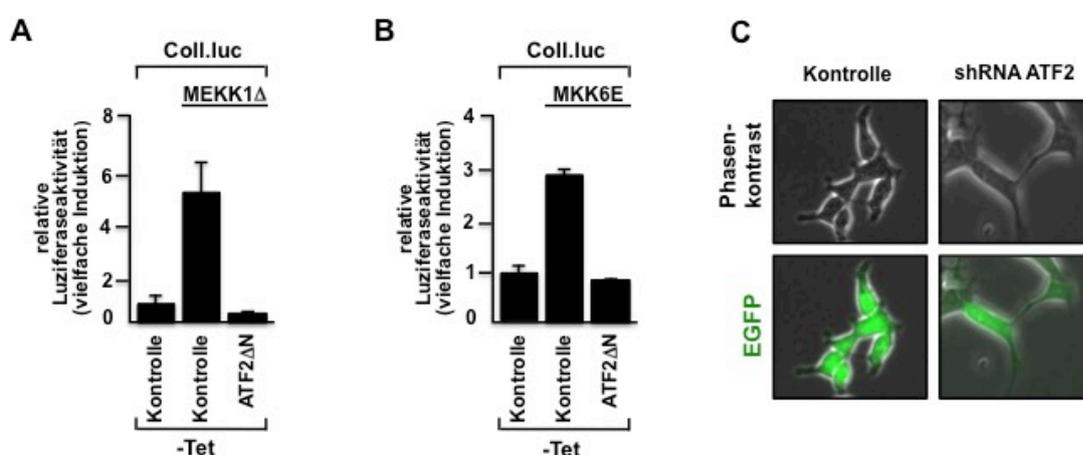


Abbildung 53: Die AP-1-Aktivierung durch MKK6 und MEKK1 wird durch ATF2 Δ N inhibiert

A. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Coll.luc-kodierenden Lentivirus, und mit einem Lentivirus, das für eine konstitutiv aktive Mutante von MEKK1 (**A**) bzw. MKK6 (**B**) kodierte, infiziert.

Zusätzlich wurden die Zellen mit einem ATF2 Δ N-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 24h serumreduziert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen und normiert. C HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für eine ATF2-spezifische shRNA kodierte. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem pLL3.7-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert und die Expression von EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3.1.11.5 ATF2 ist für die Aktivierung von AP-1 in HEK293/TRPM3-Zellen erforderlich

Der transkriptionelle Regulator AP-1 kann ebenfalls aus einem Heterodimer aus c-Jun und ATF2 gebildet und durch Phosphorylierung aktiviert wird (Steinmüller und Thiel 2003). Um die Rolle von ATF2 in der Regulation der AP-1-Aktivität in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen beurteilen zu können, wurde die dominant-negative Form von ATF2, ATF2 Δ N genannt, verwendet. Die Struktur von ATF2 und der ATF2-Mutante sind in der Abbildung 53 A gezeigt. Die Mutante ATF2 Δ N besitzt die bZIP-Domäne zur Dimerisierung und Bindung an die DNA, es fehlt jedoch die N-terminale Domäne zur transkriptionellen Aktivierung. Die Mutante blockiert die Bindungsstelle für AP-1 und inhibiert dadurch die Transkription AP-1-regulierter Gene. Die HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit Lentiviren, die für ein Kollagenase-Promotor/Luziferasegen und zusätzliche mit Lentiviren, die für die dominant-negative Mutante ATF2 Δ N kodierten, infiziert. In Abbildung 54 ist zu sehen, dass die Expression von ATF2 Δ N die AP-1-vermittelte Gentranskription signifikant reduzierte. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass ATF2 eine Rolle in der Signalkaskade spielt, die nach Aktivierung des TRPM3-Kanals zur Aktivierung der Transkription über AP-1 führt.

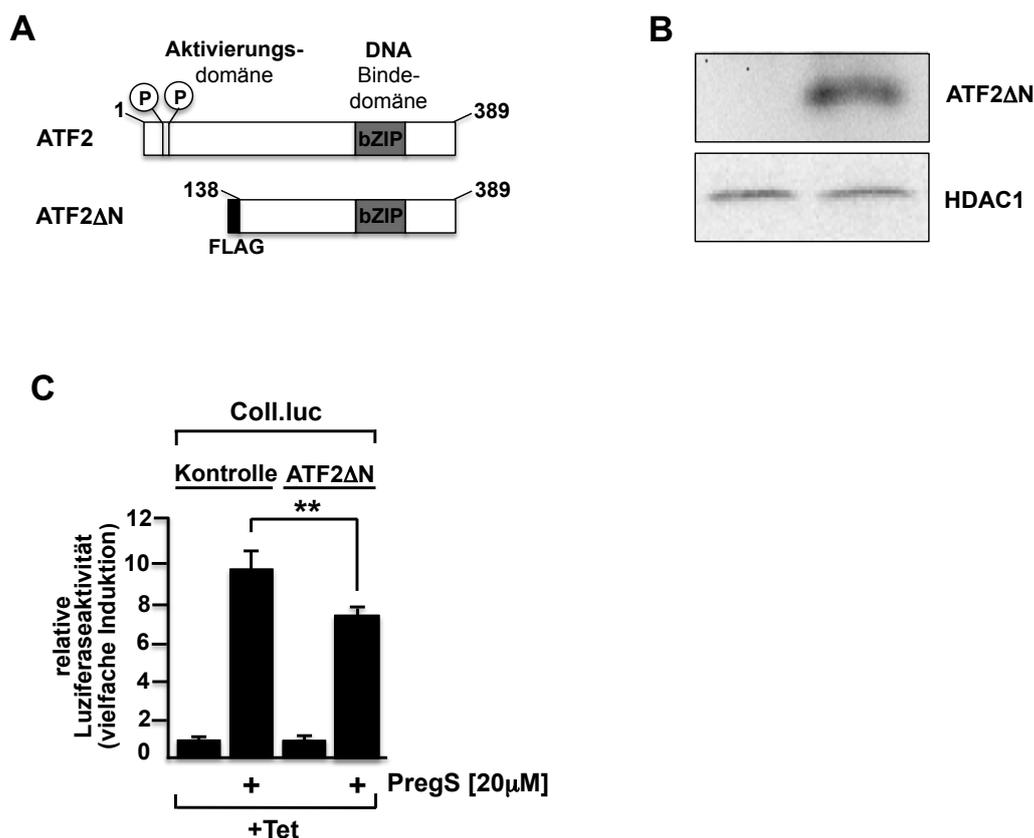


Abbildung 54: Der bZIP-Transkriptionsfaktor ATF2 ist erforderlich für die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von AP-1 regulierter Gene.

A Schematische Darstellung des bZIP-Transkriptionsfaktors ATF2 und der dominant-negativen Form ATF2ΔN. Die Mutante besitzt die DNA-Bindedomäne, aber die N-terminale Aktivierungsdomäne fehlt. Zur Detektion mittels Antikörper ist außerdem ein FLAG-Tag vorhanden. **B** Nachweis der Expression der dominant-negativen Mutante ATF2ΔN. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für ATF2ΔN kodiert und für 3 Tage inkubiert. Kernextrakte wurden präpariert und mittels Western Blot mit einem M2-FLAG Antikörper analysiert. **C** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, das für Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das für eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors ATF2; ATF2ΔN, kodiert. Als Kontrolle diente ein Lentivirus ohne kodierende Region für ein Transgen. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luciferaseaktivität wurde analysiert und auf die Proteinkonzentration normiert.

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurden ATF2-spezifische shRNAs eingesetzt. In Abbildung 55 A ist dargestellt, dass die Konzentration von ATF2 nach Expression der ATF2-spezifische shRNAs signifikant vermindert war. Um zu klären, ob ATF2 in der Signalkaskade involviert ist, die die Stimulation von TRPM3 mit der Induzierung der AP-1-vermittelten Transkription verbindet, wurden die Zellen mit einer shRNA gegen

ATF2 kodierenden Lentivirus infiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das mit dem Transfervektor pLL3.7 generiert wurde. Die Resultate zeigten, dass die Aktivierung AP-1 von AP-1 durch Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat deutlich durch die Expression der shRNAs reduziert wurde. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass ATF2 ein Teil der Signalkaskade, die die Aktivierung von TRPM3 mit verstärkter AP-1-Aktivität in HEK293 Zellen verbindet.

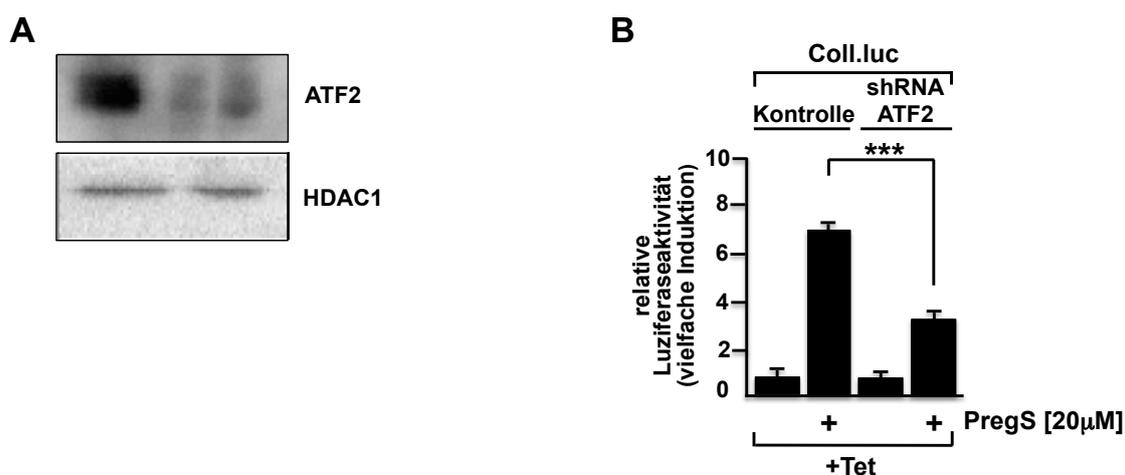


Abbildung 55: Die Expression ATF2-spezifischer shRNAs reduziert die Pregnenolonsulfat-induzierte AP-1-Aktivität.

A Der ATF2 Pegel ist bei Expression der shRNA gegen ATF2 verringert. Die HEK293/TRPM3-Zellen wurden mit einem shRNA kodierenden Lentivirus infiziert und drei Tage kultiviert. Als Kontrolle diente ein pLL3.7 kodierender Lentivirus. Die Kernextrakte wurden präpariert und mit Hilfe eines Western Blots unter Zuhilfenahme eines Antikörpers gegen ATF2 analysiert. Als Kontrolle wurde HDAC1 verwendet. **B** HEK293/TRPM3-Zellen wurden infiziert mit einem rekombinanten Lentivirus, das für Kollagenase-Promotor/Luziferasegen kodiert und zusätzlich mit einem Lentivirus, das für eine ATF2-spezifische shRNA kodierte. Zur Kontrolle wurde ein Lentivirus verwendet, das mit Hilfe des Transferplasmids pLL3.7 generiert wurde. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin 24h serumreduziert und 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität dargestellt.

3.1.11.6 Pregnenolonsulfat erhöht das transkriptionelle Aktivierungspotential des ternären Komplexfaktors Elk-1 in HEK293/TRPM3 Zellen

Der ternäre Komplex wird aus einem SRF-Dimer zusammen mit Elk-1 (Ets-like protein 1) gebildet, Dieser Komplex fungiert als transkriptioneller Regulator von Genen, die eine Serum-response-Bindestelle im Promotor besitzen, wie z.B Egr-1 und c-Fos. Der ternäre Komplexfaktor reguliert zudem AP-1 durch die Kontrolle der c-Fos Expression (Müller et al. 2010, Thiel et al. 2012). Durch die Verwendung eines GAL-4-Elk-Fusionsproteins (in Abbildung 55 dargestellt) wurde das transkriptionelle Aktivierungspotential von Elk-1 untersucht. Dieses Fusionsprotein besteht aus der DNA-Bindedomäne von Gal-4 und der Aktivierungsdomäne von Elk-1. Das GAL-4-Elk-Fusionsprotein besitzt die, durch Phosphorylierung aktivierte, regulatorische Domäne zur Aktivierung der Transkription, jedoch fehlt die DNA- und die SRF-Bindestelle. Die verkürzte Form des Elk-1 wird zusammen mit dem N-terminalen DNA-Bindedomäne von GAL-4 aus der Hefe exprimiert. Als Kontrolle wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der N-terminalen Aktivierungsdomäne von Sp-1 und der GAL-4-DNA -Bindedomäne (GAL-4-Sp1) exprimiert. Dieses System bietet den Vorteil, dass eine Interferenz mit anderen transkriptionell-regulatorischen Proteinen verhindert wird, da GAL4 nicht an Promotorelemente von Säugerzellen binden kann. Mit Hilfe dieser beiden Fusionsproteine wurde die biologische Aktivität von GAL4-Elk und GAL4-Sp1 analysiert.

Zu diesem Zweck wurde durch lentiviralen Gentransfer ein GAL-4-responsives Reporter gen stabil ins Chromatin der HEK293/TRPM3 Zellen integriert. Die Ergebnisse zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität von Elk-1 in HEK293/TRPM3-Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat deutlich erhöht war. Im Gegensatz dazu war die Aktivität des GAL4-Sp1-Fusionsproteins nach Stimulation nicht verändert (siehe Abbildung 56). Durch die Stimulation mit D-Erythrosphingosin wurde das gleiche Ergebnis festgestellt (Abbildung 56 D). Die erhöhte transkriptionelle Aktivität von Elk-1 konnte in TRPM3-exprimierenden Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat durch die Zugabe von Mefenaminsäure fast vollständig inhibiert werden, während die Zugabe von Rosiglitazonen keinen Effekt zeigte (Abbildung 57).

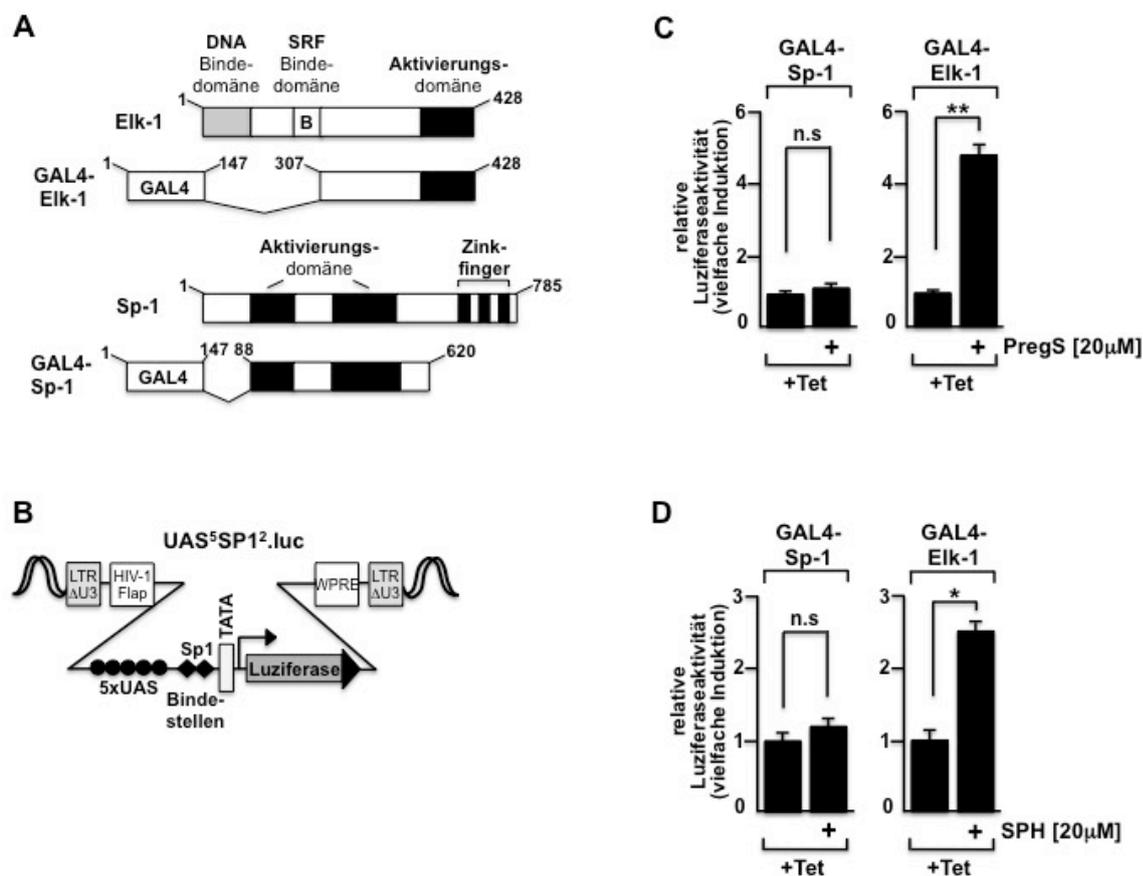


Abbildung 56: Erhöhte transkriptionelle Aktivität von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3 Zellen.

A Schematische Darstellung von Elk-1 und GAL4-Elk-1; sowie Sp1 und GAL4-Sp1. **B** Schematische Darstellung der Transkriptionseinheit des GAL4-responsiven Reportergens. **C, D** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem GAL-4-responsiven Reportergen und gleichzeitig entweder mit einem GAL4-Elk-1 oder GAL4-Sp1-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin serumreduziert und anschließend mit Pregnenolonsulfat (**C**) bzw. D-Erythrosphingosin (SPH, 20µM, **D**) stimuliert. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ***= $P < 0.001$.

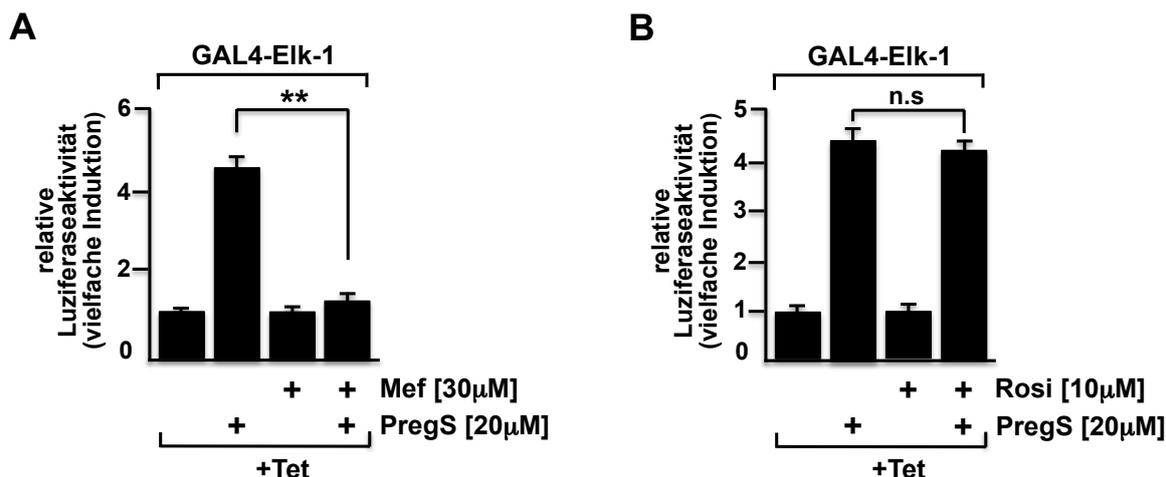


Abbildung 57: Mefenaminsäure blockt die erhöhte Aktivität von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3 Zellen.

A Das Experiment wurde in Anwesenheit von entweder Mefenaminsäure (**A**) oder Rosiglitazonen (**B**) wiederholt. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem GAL4-responsiven Reporter gen und gleichzeitig entweder mit einem GAL4-Elk-1-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetrazyklin serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert in Anwesenheit von Mefenaminsäure (Mef, 30µM, **A**) bzw. Rosiglitazonen (Rosi, 20µM, **B**) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und die relative Luziferaseaktivität berechnet. Die Daten wurden als signifikant dargestellt, wenn * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

3.1.11.7 Die Hemmung ternärer Komplexfaktoren verhindert die Aktivierung von AP-1 in TRPM3 exprimierenden HEK293 Zellen

Vor Kurzem wurde gezeigt, dass die Expression von REST/Elk-1, einer Elk-1-Mutante, die Aktivierung von Egr-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinomazellen abschwächt (Mayer et al. 2011). Dies weist darauf hin, dass Elk-1 oder ähnliche Proteine aus der Familie der ternären Komplexfaktoren die Pregnenolonsulfat-induzierte intrazelluläre Signalkaskade, die durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen initiiert wird, mit der Transkription von Egr-1 in Verbindung bringen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die ternären Komplexfaktoren den Transkriptionsfaktor AP-1 über die Expression von c-Fos regulieren (Müller et al. 2010, Thiel und Rössler 2011, Thiel et al. 2012).

Aus diesem Grund wurde die Frage aufgeworfen, ob die ternären Komplexfaktoren ebenfalls die AP-1-Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation des TRPM3

regulieren. Zu diesem Zweck wurde eine dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1, REST/Elk-1 Δ C, exprimiert. Die Expression dieser Mutante verhindert eine redundante Wirkung zwischen den ähnlichen Proteinen der TCF-Familie (Cesari et al. 2004). Die modulare Struktur von REST/Elk-1 Δ C ist in Abbildung 66 dargestellt. Die Expression der Elk-1-Mutante wurde durch die Infektion der HEK293 Zellen mit einem REST/Elk-1 Δ C-kodierenden Lentivirus sichergestellt und das Protein mit Hilfe einer Western Blot Analyse unter Verwendung eines M2-FLAG-Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 58 B). Abbildung 58 C zeigt, dass die Expression von REST/Elk-1 Δ C die Aktivierung von AP-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293TRPM Zellen fast vollständig unterband. Dies bedeutet, dass die ternären Komplexfaktoren unerlässlich in der Verbindung von TRPM3 Aktivierung und der AP-1-kontrollierten Gentranskription sind.

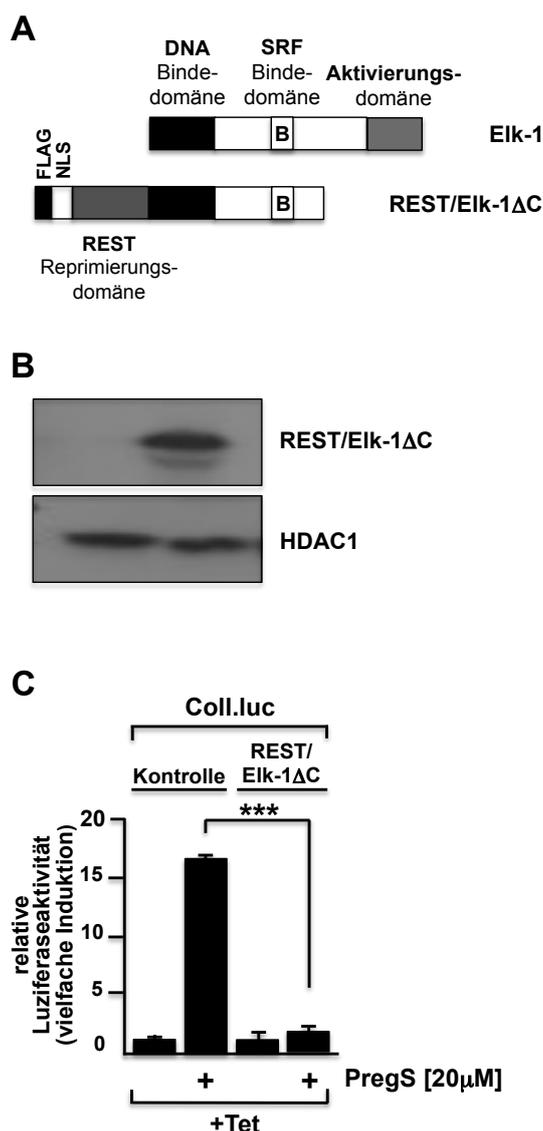


Abbildung 58: Ternäre Komplexfaktoren (TCF) sind zwingend relevant für die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung AP-1 regulierter Transkription.

A Schematische Darstellung des ternären Komplexfaktors Elk-1 und der dominant-negativen Form REST/EIk-1ΔC. Die dominant-negative Form besitzt die DNA-Bindedomäne und die Bindungsstelle für SRF-Proteine. Zusätzlich enthält sie ein Kernlokalisierungssignal und einen FLAG-Tag zum immunologischen Nachweis. Die N-terminale Repressordomäne des transkriptionellen Repressors REST wurde anfusioniert. Die C-terminale Aktivierungsdomäne von Elk-1 fehlt der Mutante. **B** Expression der dominant-negativen Mutante REST/EIk-1ΔC. HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit einem REST/EIk-1ΔC-kodierenden Lentivirus infiziert, Kernextrakte präpariert und mittels Western Blot analysiert. **C** HEK293/TRPM3 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Coll.luc-Reportergen kodierten. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das für REST/EIk-1ΔC kodierte. Als Kontrolle diente ein FUW-kodierender Lentivirus. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tetracyclin 24h serumreduziert und anschließend 24h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Kernextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität wurde analysiert und normiert.

3.2 Die Funktion Stimulus-reponsiver Transkriptionsfaktoren in β -Zellen

Ein bekanntes Zielgen von Elk-1 ist Egr-1, dessen Expression von Elk-1 über seine fünf „Serum-response“-Elemente gesteuert wird (Thiel und Cibelli 2002, Bauer et al. 2005). Zusätzlich ist Elk-1 in Insulinomazellen und in pankreatischen β -Zellen die endogene TRPM3-Kanäle exprimieren, der Hauptregulator in der Pregnenolonsulfat-induzierten Aktivierung von Egr-1 (Mayer et al. 2011). In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Egr-1 auch in stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen erhöht ist. Die Biosynthese von Egr-1 konnte in Insulinomazellen durch die Expression einer dominant-negativer Mutante von Elk-1 inhibiert werden (Mayer et al. 2011). Das deutet darauf hin, dass die TRPM3-induzierte Aktivierung von Egr-1 auf der Aktivität von Elk-1 beruht. Pdx-1, ein Homeoboxprotein, das in β -Zellen in der Regulation der Insulinbiosynthese beteiligt ist, wird durch Egr-1 reguliert (Brissova et al. 2002, Andrali et al. 2002). Außerdem konnten durch TRPM3-Stimulation in Insulinomazellen erhöhte Insulin-mRNA Konzentrationen und Aktivierung des Insulinpromotors nachgewiesen werden (Mayer et al. 2011). Elk-1 wird in den β -Zellen durch Glukose aktiviert (Bernal-Mizrachi et al. 2001, Müller et al. 2012). Die genaue Funktion von Elk-1 in den β -Zellen ist dennoch unklar. In Experimenten mit doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr1/Zn-Mäusen, die die dominant-negative Mutante Egr1/Zn zur Blockierung aller Egr-Proteine exprimiert, zeigten diese Tiere eine verschlechterte Glukoseantwort und einen diabetischen Phänotyp.

3.2.1 Verwendung von transgenen REST/Elk-1 Δ C-Mäusen

Die Bedeutung von Elk-1 wurde in einem Mausmodell analysiert, in dem die Expression einer dominant-negativen Form von Elk-1; REST/Elk-1 Δ C durch Induktion mit Doxyzyklin spezifisch in den β -Zellen des Pankreas exprimiert wurde. In Insulinomazellen konnte gezeigt werden, dass Elk-1 die Expression von Egr-1-

reguliert (Mayer & Thiel 2009). Zudem reguliert der ternäre Komplex die Stimulus-induzierte Genexpression in den β -Zellen des endokrinen Pankreas (Bernal-Mizrachi et al. 2001, Glauser und Schlegel 2007). In Säugerzellen existieren drei Proteine der TCF-Familie mit redundanter Funktion (Elk-1, SAP-1 und SAP-2 (Elk-3)). Zunächst wurde die Expression der TCFs, sowie des „serum-response“-Faktors (SRF) in den pankreatischen β -Zellen untersucht (Abbildung 59).

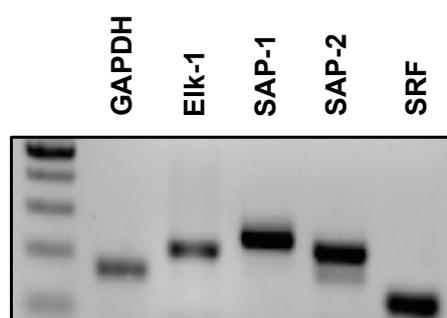


Abbildung 59: Expression aller TCFs in pankreatischen Inselzellen homozygoter REST/Elk-1 Δ C-Mäusen.

A RT-PCR-Nachweis der Expression der TCF-Proteine: Elk-1, SAP-1 und SAP-2, sowie SRF in pankreatischen β -Zellen homozygoter [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäuse. Die Inseln des Pankreas wurden isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. In einer RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer wurden die jeweiligen mRNAs nachgewiesen. Als Kontrolle diente die Expression von GAPDH.

In einer *in vivo* Studie in Elk-1-knock-out Mäusen konnte kein signifikanter phänotypischer Unterschied zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden (Cesari et al. 2004). Der Funktionsverlust wird hier durch die redundanten Proteine der TCF-Familie SAP-1 und SAP-2 ausgeglichen (Cesari et al. 2004). In Elk-1^{-/-}-Mausmodellen war aus diesem Grund kein Phänotyp zu erkennen (Cesari et al. 2004). Die Verwendung einer Elk-1^{-/-}-Linie kam daher nicht in Frage. Zur Vermeidung dieser funktionellen Redundanz zwischen den Proteinen der TCF-Familie wurde in dieser Arbeit eine dominant-negative Mutante von Elk-1, REST/Elk-1 Δ C gewählt, um die Funktionen aller TCF's in den pankreatischen Inseln zu untersuchen. Abbildung 60 A zeigt die Struktur von Elk-1 und der Mutante REST/Elk-1 Δ C. Die REST/Elk-1 Δ C-Mutante besitzt die Domänen zur DNA-Bindung und zur Interaktion mit den

SRF-Proteinen. Es fehlt jedoch die C-terminale Aktivierungsdomäne des Wildtyp-Elk-1. Außerdem beinhaltet die Mutante die N-terminale Repressordomäne des transkriptionellen Repressors REST. Aufgrund der Fähigkeit dieser Mutante zur DNA-Bindung und Interaktion mit den SRF-Dimeren konnte sichergestellt werden, dass die biologische Aktivität aller redundanten TCF-Proteine blockiert wurde. Abbildung 6059 B zeigt schematisch, wie die Mutante die DNA-Bindung von TCF-Transkriptionsfaktoren blockiert.



Abbildung 60: Modulare Struktur und Wirkungsweise von REST/Elk-1 Δ C .

A Schematische Darstellung des ternären Komplexfaktors Elk-1 und der dominant-negativen Form REST/Elk-1 Δ C. Die dominant-negative Form besitzt die DNA-Bindedomäne und die Bindungsstelle für SRF-Proteine. Zusätzlich enthält sie ein Kernlokalisierungssignal und einen FLAG-Tag zum immunologischen Nachweis. Die N-terminale Repressordomäne des transkriptionellen Repressors REST wurde anfusioniert. Die C-terminale Aktivierungsdomäne von Elk-1 fehlt der Mutante. **B** Wirkungsweise der Mutante REST/Elk-1 Δ C. Die Mutante bindet an die DNA TCF-responsiver Gene, blockiert die Bindungsstellen für Wildtyp-TCF-Proteine und verhindert so die Transkription.

3.2.2 Generierung von doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäusen

Um die Funktionen von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell geschaffen, bei dem die dominant-negative Mutante REST/Elk-1 Δ C des Wildtyp-Transkriptionsfaktors Elk-1 induzierbar und ausschließlich in den β -Zellen des Pankreas exprimiert werden kann. Die Expression der Transkriptionsfaktor-Mutante erfolgte hierbei Tetrazyklin-abhängig unter der

Kontrolle eines reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators. Die Induktion dieses System bietet den Vorteil, eventuelle Entwicklungsdefizite oder Nebenwirkungen auf den Organismus zu umgehen.

Zur Generierung einer doppel-transgenen induzierbaren Mauslinie wurden zwei Mauslinien gekreuzt. Zum einen die Mauslinie [tetO]₇REST/EIk-1ΔC, die die REST/EIk-1ΔC Mutante und das Enzym β-Galaktosidase unter der Kontrolle eines bidirektionalen Promotors Tetrazyklin-abhängig exprimiert. Die Expression der β-Galaktosidase dient zur histochemischen Detektion. Zum anderen eine Mauslinie, die einen reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-II-Promotors (RIP) exprimiert. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Expression des Transgens induzierbar und gewebsspezifisch exprimiert werden kann. Die Induktion erfolgte durch Zugabe des Tetrazyklin-Analogons Doxyzyklin in das Trinkwasser der Tiere. Das Kreuzungsschema zur Erzeugung der doppel-transgenen Mäuse und der Vektor zur Generierung der [tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäuse durch Pronukleusinjektion ist in Abbildung 61 B dargestellt. Die [tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mauslinie wurde von Oliver Rössler in Zusammenarbeit mit der Universität Heidelberg durch Pronukleusinjektion generiert. Nach Erhalt von vier Founderlinien wurde in einer Western Blot Analyse die Expression von REST/EIk-1ΔC in Fibroblasten nach Induktion mit Doxyzyklin untersucht. Die Mauslinien 1, 3 und 4 zeigten keine deutlichen Unterschiede in der β-Gal-Expression. Die Mauslinie 5 zeigte die höchste Expression des Transgens, ließ sich aber nicht effizient vermehren. Die Mauslinie 1 ließ sich am besten vermehren. (Rössler und Thiel 2016). Anhand dieser ersten experimentellen Untersuchungen wurde für weitere Analysen die Mauslinie 1 verwendet.

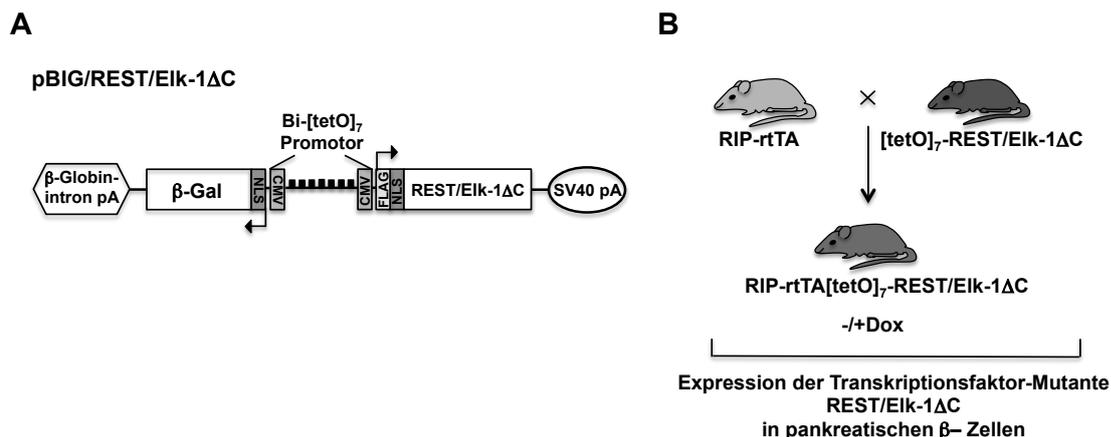


Abbildung 61: Generierung der doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST-EIk-1ΔC -Mauslinie

A Darstellung der Transkriptionseinheit zur gleichzeitigen Expression der REST/EIk-1ΔC Mutante und der β-Galaktosidase unter Kontrolle eines bidirektionalen Promotors. **B** Schematische Darstellung der Generierung der doppelt-transgenen Mäuse. Die Mauslinie RIP-rtTA, die den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Insulin-II-Promotors der Ratte (RIP) exprimiert, wurde mit Mäusen gekreuzt, die eine dominant-negative Mutante des EIk-1-Transkriptionsfaktors: REST/EIk-1ΔC, exprimieren. Die Expression erfolgt nur in Anwesenheit von Doxyzyklin gewebspezifisch in den endokrinen β-Zellen des Pankreas.

Die Anwesenheit der beiden Transgene REST/EIk-1ΔC und β-Galaktosidase, sowie die Expression des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators wurde vor experimenteller Verwendung der Tiere in einer Genotypisierungs-PCR unter Verwendung spezifischer Primer (in Tabelle 2 aufgelistet) überprüft. Dazu wurde DNA aus Ohrbiopsien von drei Wochen alten Mäusen gewonnen. Abbildung 62 zeigt eine, für alle Transgene positive Genotypisierung der RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäuse.

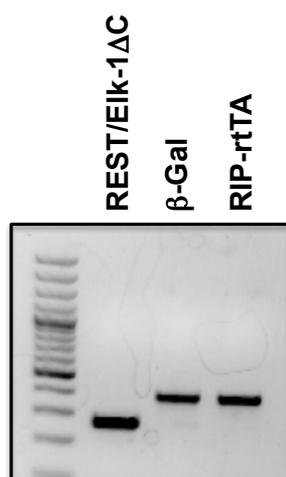


Abbildung 62: Die Transgene REST/EIk-1 Δ C, β -Galaktosidase und rtTA werden exprimiert.

RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1 Δ C-Mäusen wurde im Alter von 3 Wochen Gewebebiopsien aus dem Ohr entnommen. Die DNA wurde extrahiert, in einer PCR mit spezifischen Primern analysiert und mittels 1,5%igen Agarosegels, versetzt mit 1% Ethidiumbromid aufgetragen. Die Banden wurden unter UV-Licht detektiert.

Die positiv getesteten, transgenen Tiere wurden zur experimentellen Analyse von Elk-1 im endokrinen Pankreas weiterverwendet.

3.2.3 Doxzyklin-abhängige Expression der dominant-negativen Transkriptionsfaktormutante REST/EIk-1 Δ C in pankreatischen β -Zellen

Zunächst wurde histochemisch die induzierbare und gewebsspezifische Expression der Elk-1-Mutante, REST/EIk-1 Δ C, in den Inselzellen des Pankreas doppeltransgener RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1 Δ C -Mäuse überprüft. Von doppeltransgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1 Δ C -Mäusen, denen über das Trinkwasser Doxzyklin über einen Zeitraum von 10-12 Wochen verabreicht wurde, wurden die Inseln isoliert und die RNA in einer RT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten doppeltransgene Mäuse, denen Sukrose über das Trinkwasser verabreicht wurde. Das Resultat zeigte, dass REST/EIk-1 Δ C nur in den Inseln der Mäuse nachzuweisen war, die

Doxyzyklin bekamen, nicht aber in der Kontrollgruppe (Abbildung 63 A). Zusätzlich konnte in einer Analyse der isolierten Inseln (Abbildung 63 B) bzw. der Kryoschnitte des gesamten Pankreas (Abbildung 63 C), die mit X-Gal gefärbt wurden, gezeigt werden, dass die β -Galaktosidase nur in den Inseln des Pankreas derjenigen Mäuse, die Doxyzyklin bekamen, exprimiert wurde. In den Inseln der Kontrolltiere konnte in beiden Fällen keine Expression des Transgens festgestellt werden. Als Kontrolle der Gewebsspezifität wurde zusätzlich die Milz entnommen und angefärbt (Abbildung 63 D). Es konnte auch hier keine Expression der β -Galaktosidase nachgewiesen werden.

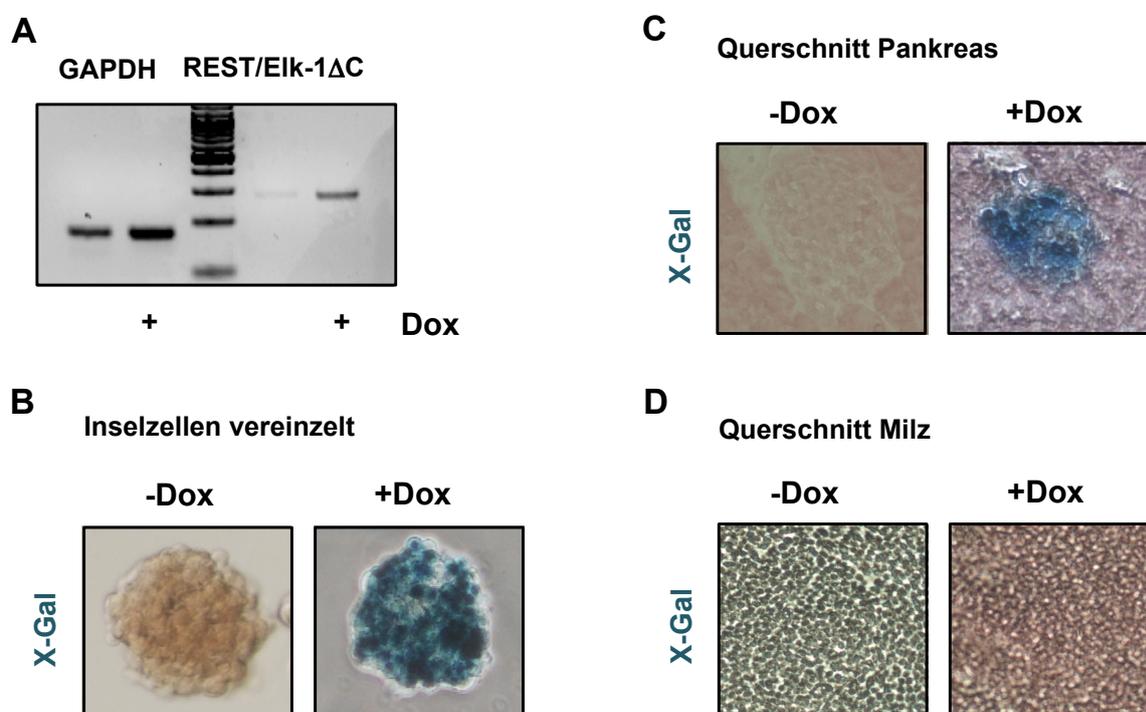


Abbildung 63: Die REST/EIk-1ΔC und β -Galaktosidase-Transgenexpression in RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäusen erfolgt nur nach Gabe von Doxyzyklin.

A Nachweis der isolierten mRNA aller TCFs und SRF mittels RT-PCR von doppelt-transgenen Mäusen, die in An-(+Dox) oder Abwesenheit (-Dox) von Doxyzyklin gehalten wurden. Als Kontrolle wurde die Expression der GAPDH detektiert. **B** Histochemischer Nachweis der Expression von REST/EIk-1ΔC in isolierten, X-Gal-gefärbten Inseln aus dem Pankreas in Kurzzeitkultur. Die Inseln doppelt-transgener RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäuse wurden isoliert und anhand einer Blaufärbung durch eine X-Gal-Färbung sichtbar gemacht. **C** Histochemischer Nachweis der Expression des Transgens in X-Gal-gefärbten Gewebeschnitten. Das gesamte Pankreas wurde entnommen und die Kryoschnitte wurden über Nacht einer X-GAL-Färbung unterzogen. Als

Gegenfärbung wurde eine Kernechtrotfärbung der Zellkerne und des Zytosols durchgeführt. **D** Zur Kontrolle diente eine X-GAL-Färbung von Kryoschnitten der Milz.

3.2.4 Die Expression von REST/Elk-1 Δ C in RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C -Mäusen führt zu einem diabetischen Phänotyp

In Experimenten mit doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr1/Zn-Mäusen, die die dominant-negative Mutante Egr1/Zn zur Blockierung aller Egr-Proteine exprimiert, zeigten diese Tiere eine verschlechterte Glukoseantwort und einen diabetischen Phänotyp. Die Expression von Egr-1 wird durch den ternären Komplexfaktor Elk-1 kontrolliert (Thiel und Cibelli 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 in RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C-Mäusen eine veränderte Glukoseantwort zeigt. Um dies zu untersuchen, wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt, bei dem den doppelt-transgenen Mäusen nach einer Nahrungskarenz von mindestens 6 Stunden durch intraperitoneale Injektion eine Glukoselösung injiziert wurde und der Blutzuckerspiegel über einen Zeitraum von zwei Stunden kontrolliert wurde. Zur Quantifizierung wurden die Blutglukosekonzentration der verschiedenen Zeitpunkte dargestellt. Dazu wurde die als Fläche unter der Kurve berechnet und als „area under the curve, AUC“ dargestellt (Abbildung 64). Die Ergebnisse zeigen, dass in den REST/Elk-1 Δ C-exprimierenden Mäusen ein deutlich höherer Blutglukosewert über einen längeren Zeitraum (über 180 min) zu messen war und dieser ebenfalls schwächer abfiel, verglichen mit Mäusen, die kein Doxyzyklin erhielten. Als Kontrolle wurden homozygote [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C-Mäuse verwendet, bei denen kein signifikanter Unterschied in den Blutglukosekonzentrationen zwischen unbehandelten oder mit Doxyzyklin behandelten Testgruppen festgestellt wurde. Das lässt darauf schließen, dass die Aktivität von Elk-1 in der Regulation der Glukosehomöostase eine zentrale Rolle einnimmt.

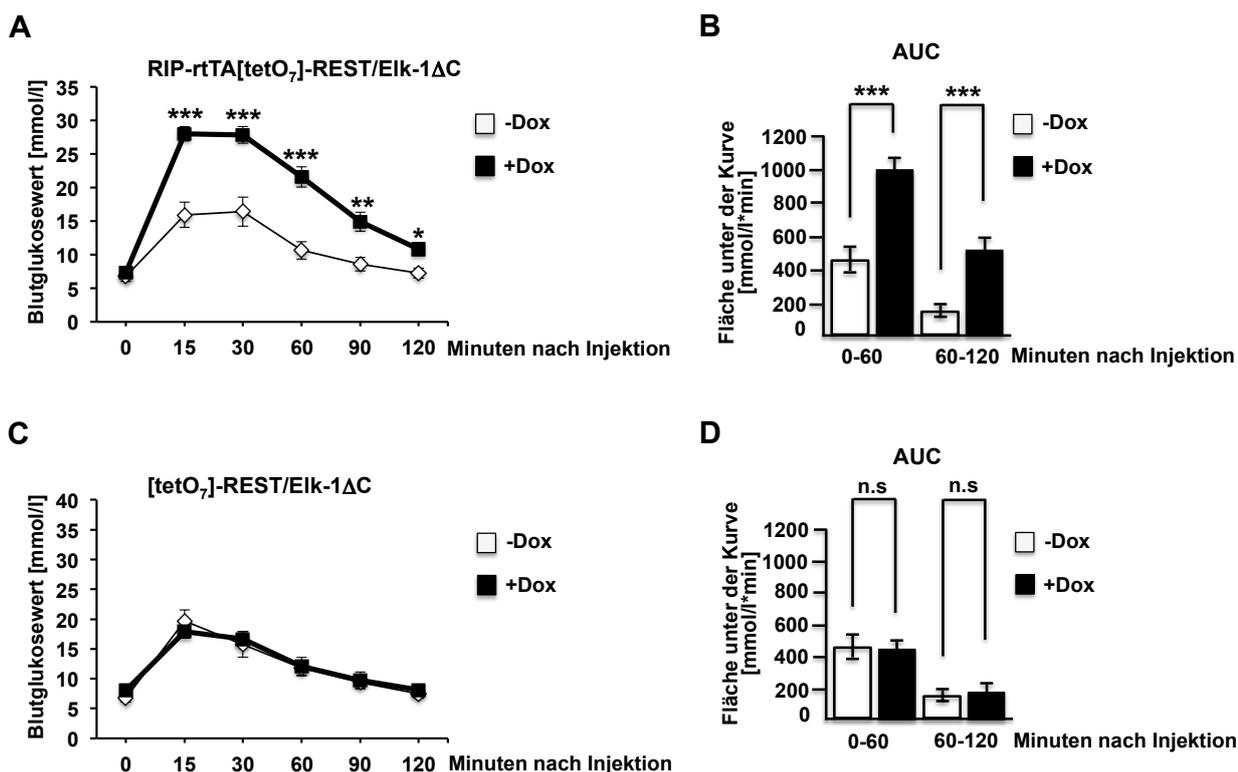


Abbildung 64: Die REST/EIk-1ΔC-Expression induziert in RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäusen eine erhöhte Blutglukosekonzentration nach Glukose-Injektion.

A Intraperitonealer Glukosetoleranztest von RIP-rtTA/[tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäusen, die mit Doxyzyklin (+Dox) behandelt wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse (-Dox). Die Tiere wurden für mindestens 6h einer Nahrungskarenz unterzogen. Anschließend wurde durch Injektion intraperitoneal eine Glukoselösung [2mg Glukose/kg Körpergewicht] verabreicht und die Blutglukosekonzentrationen im Serum vor (Zeitpunkt 0) und nach Injektion zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90 und 120 min erfasst und aufgetragen. **B** Die Fläche unter der Kurve (AUC, „area under the curve“) der Blutglukosekonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkte wurde berechnet und im Balkendiagramm dargestellt. **C** Glukosetoleranztest von homozygoten [tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäusen in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin. **D** Die Fläche unter der Kurve der Blutglukosekonzentrationen homozygoter [tetO]₇REST/EIk-1ΔC-Mäuse. Fehlerbalken wurden als \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler) in **A**, **C** dargestellt. Fehlerbalken in **B**, **D** als \pm SD (standard deviation, Standardabweichung). Es wurden 15 Mäuse beider Versuchsgruppen analysiert und ausgewertet. Signifikanz: *** wenn $p < 0,001$, ** wenn $p < 0,01$, * wenn $p < 0,05$.

3.2.5 Verringerte Inselgröße in REST/EIk-1ΔC-exprimierenden Mäusen

Morphometrische Analysen der Größe pankreatischer Inselzellen in doppeltransgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen zeigten eine signifikant verringerte

Größe der Inseln in den Mäusen, die die Egr1/Zn-Mutante exprimierten, im Vergleich zu den Kontrolltieren (Müller et al. 2012). Die Tatsache, dass die Egr-1-Expression durch Elk-1 reguliert wird (Thiel und Cibelli 2002), warf im Folgenden die Frage auf, ob die Expression der REST/Elk-1 Δ C-Mutante ebenfalls zu kleineren Inseln führt. Dazu wurden 10-12 Wochen alte, doppelt-transgene Mäuse verwendet, die Doxyzyklin über das Trinkwasser bekamen. Als Kontrolle dienten Tiere, die Sukrose in das Trinkwasser bekamen. Das gesamte Pankreas wurde isoliert und Paraffinschnitte des Kopf-, Mittel-, sowie des Schwanzteils des Organs angefertigt und die Inselgröße bestimmt. Um eine Doppelinterpretation einer Insel zu verhindern, wurde jeder 6. Schnitt ausgewertet. Die Resultate zeigten eine deutliche Verringerung der Größe der Langerhans'schen Inselzellen derjenigen Mäuse, die die REST/Elk-1 Δ C-Mutante exprimierten, verglichen mit den Kontrolltieren (gezeigt in Abbildung 64). Zusätzlich konnte bei den RIP/REST/Elk-1 Δ C-Kontrolltieren eine durchschnittliche Inselgröße von etwa 97 μm^2 gemessen werden. Dies entspricht der durchschnittlichen Inselgröße von 100-200 μm in Säugetieren (Jo et al. 2007).

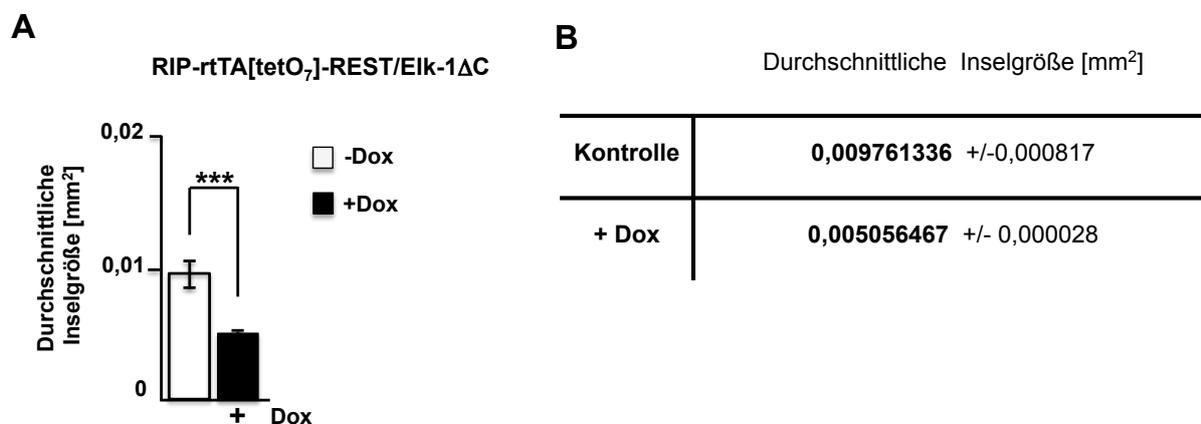


Abbildung 65: Verringerte Größe Langerhans'scher Inseln in REST/Elk-1 Δ C-exprimierenden Mäusen.

A Vergleichende Darstellung der Inselgröße in Doxyzyklin-behandelten REST/Elk-1 Δ C-exprimierenden Mäusen (+Dox) und Kontrolltieren (-Dox) in einem Balkendiagramm in mm². Das Pankreas von 10-12 Wochen alten Mäusen wurde entnommen, und 5 μM dicke Paraffinschnitte des Kopf-Schwanz- und Mittelstücks des Pankreas angefertigt. Die Gesamtfläche der Inseln wurde von jedem 6. Schnitt von 3 unabhängigen Experimenten morphometrisch analysiert und in einem Balkendiagramm verglichen. **B** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

4 Diskussion

4.1 Der TRPM3-Kanal

4.1.1 Die Pharmakologie des TRPM3-Kanals

Agonisten und Antagonisten des TRPM3-Kanals, die eine TRPM3-vermittelte Signaltransduktion initiieren

Die Verfügbarkeit von TRPM3-spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren ist notwendig um die biologischen Funktionen von TRPM3 in verschiedenen Zelltypen aufklären zu können. Die bisher verwendeten Methoden zielten darauf ab, durch Messen des TRPM3-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in das Zellinnere die Aktivität des TRPM3-Kanals zu beurteilen. Verschiedene Verbindungen wurden auf diese Weise als Agonisten bzw. Antagonisten von TRPM3 postuliert. Analysen in neuronalen Zellen zeigten jedoch, dass ein Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol nicht zwangsläufig mit der Induktion einer Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade einhergehen (Deisseroth et al. 1998). Aus diesem Grund wurde von mir ein anderes Messsystem eingesetzt, das auf der TRPM3-induzierten Genregulation basiert. Die bisher verwendete Methode der Messung des Ca^{2+} -Einstroms als Indikator für die TRPM3-Aktivierung funktioniert nur unter der Voraussetzung, dass der TRPM3-Kanal Ca^{2+} -responsiv ist. Es existieren verschiedene TRPM3-Spleißvarianten, die keine Responsivität für Ca^{2+} zeigten (Oberwinkler et al. 2005).

Das Neurosteroid Pregnenolonsulfat wurde als Aktivator von TRPM3 beschrieben, das einen Ca^{2+} -Einstrom in Insulinomazellen und pankreatischen β -Zellen induziert (Wagner et al. 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Pregnenolonsulfat als TRPM3-Ligand transkriptionelle Änderungen in Insulinoma- und β -Zellen zu induzieren (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011). Insulinoma- und β -Zellen exprimieren neben TRPM3-Kanälen auch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und sind aus diesem Grund als Modellsystem zur Analyse TRPM3-induzierter Signaltransduktion ungeeignet. In dieser Arbeit wurde eine TRPM3-exprimierende HEK293-Zelllinie verwendet. Diese Zellen exprimieren keine L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Es wurde bereits publiziert, dass Pregnenolonsulfat in den TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen einen Ca^{2+} -

Einstrom induzierte, der unabhängig von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen war (Wagner et al. 2008, Majeed et al. 2010). Diese Beobachtung zeigt, dass der TRPM3-Kanal in einem heterologen System als Liganden-aktivierter ionotroper Rezeptor wirkt und bei Aktivierung ein Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol erfolgt. Auf Grundlage dessen wurde in dieser Arbeit mit dem HEK293/TRPM3-Zellsystem gearbeitet. Die beschriebenen Daten zeigen, dass Pregnenolonsulfat in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom induziert, der ausreicht um eine Signaltransduktion auszulösen, die bis zur Regulation der AP-1- und Egr-1-Aktivität führt. Bei der Analyse TRPM3-induzierter Gentranskription ist Pregnenolonsulfat daher die erste Wahl. Da Pregnenolonsulfat kein natürlicher Ligand von TRPM3 ist, induzierte es erst in unphysiologischen Konzentration, ab 20 μM , die Aktivierung von AP-1 und Egr-1.

Es wurden weitere Liganden von TRPM3 beschrieben, die von mir analysiert wurden. Das Dihydropyridin Nifedipin ist ein Inhibitor spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle. Aufgrund der Messung des Ca^{2+} -Einstroms wurde es als Aktivator von TRPM3 beschrieben (Wagner et al. 2008). In dem in dieser Arbeit verwendeten HEK293/TRPM3-Zellsystem führte die Stimulation von TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen mit Nifedipin zu keiner transkriptionellen Aktivierung, weder von Egr-1 noch von AP-1. Das zeigt, dass Nifedipin kein Ligand von TRPM3 ist. Diese Resultate werden durch Experimente mit Dorsalwurzelganglien (DRGs) aus TRPM3-knock-out-Mäusen bestätigt. In den DRGs TRPM3-defizienter Mäuse konnte bei Stimulation mit Nifedipin ein Ca^{2+} -Einstrom ins Zellinnere festgestellt werden (siehe Abbildung 66, aus Vriens et al. 2011). Diese Daten zeigen, dass Nifedipin einen TRPM3-unabhängigen Ca^{2+} -Einstrom auslöst und stützen die Hypothese, dass Nifedipin keine Wirkung auf TRPM3-Kanäle besitzt. Nifedipin wirkt in diesem Fall auf den strukturell ähnlichen TRPA1-Kanal (Vriens et al. 2011).

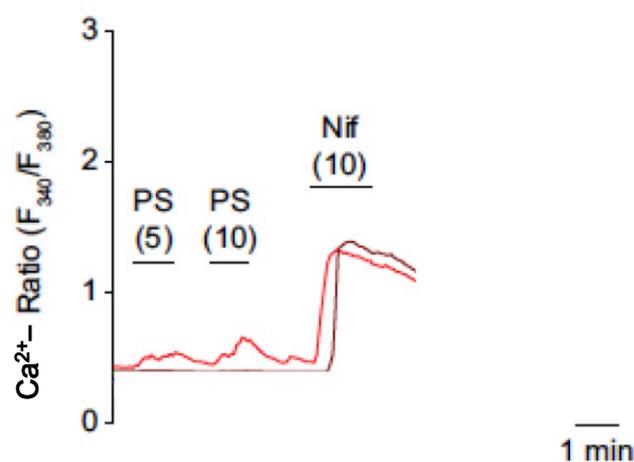


Abbildung 66: Nifedipin löst in Dorsalwurzelganglien von TRPM3^{-/-}-Mäusen einen TRPM3-unabhängigen Ca²⁺-Einstrom aus.

Der Ca²⁺-Einstrom in Dorsalen Wurzelganglien (DRGs) aus TRPM3^{-/-}-Mäusen wurde analysiert. Eingeströmte Ca²⁺-Ionen wurden mit dem Farbstoff Fura-2 komplexiert und gemessen. Der Fura-2-Anteil ist dabei gleichzusetzen mit der Konzentration intrazellulärer Ca²⁺-Ionen. Die DRGs wurden mit Pregnenolonsulfat in den Konzentrationen von 5 und 10 μM (rote Linie), oder mit 10 μM Nifedipin (dunkelrote Linie) stimuliert und der Ca²⁺-Einstrom gemessen. (Abbildung aus Vriens et al. 2011, modifiziert)

D-Erythrosphingosin wurde als Aktivator von TRPM3 beschrieben, aufgrund seiner Fähigkeit, einen Ca²⁺-Einstrom zu induzieren (Grimm et al. 2003, Wagner et al. 2008, Naylor et al. 2010). Diese Verbindung wurde auf die Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktion und transkriptioneller Aktivierung überprüft. Die Behandlung der TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen mit D-Erythrosphingosin zeigte zwar eine Erhöhung der Egr-1- und AP-1-Aktivitäten, aber auch bereits in den Zellen, die keine TRPM3-Kanäle exprimierten. Das zeigt, dass der D-Erythrosphingosin-induzierte Ca²⁺-Einstrom ausreicht um eine Signalkaskade zu induzieren, allerdings TRPM3-unabhängig. Diese Resultate stimmen mit den Daten aus Experimenten überein, in denen D-Erythrosphingosin in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen einen Ca²⁺-Einstrom induzierte, aber in murinen Zellen nur einen geringfügigen Effekt auf TRPM3 hatte. In den murinen Zellen, die keinen TRPM3-Kanal exprimierten, war zusätzlich ein stärkerer Effekt bei dem Ca²⁺-Einstrom zu messen (Wagner et al. 2008). D-Erythrosphingosin wirkt somit TRPM3-unabhängig und ist kein TRPM3-Ligand.

Erst kürzlich wurde ein weiterer synthetischer Ligand als starker TRPM3-Aktivator

publiziert: CIM0216 (Held et al. 2015). In TRPM3-exprimierenden somatosensorischen Neuronen übersteigt CIM0216 als TRPM3-Aktivator Pregnenolonsulfat deutlich in Affinität zu TRPM3 und Effizienz des ausgelösten Ca^{2+} -Einstroms (Held et al. 2015). Es stellte sich jedoch heraus, dass CIM0216 in HEK293/TRPM3-Zellen nur ähnlich oder weniger effektiv in der Aktivierung TRPM3-vermittelter Gentranskription war. Was die TRPM3-induzierte Aktivierung von AP-1 betrifft, war die Stimulation mit Pregnenolonsulfat doppelt so wirkungsvoll als die mit CIM0216 (Rubil et al. 2017).

Verschiedene Verbindungen wie z.B. Mefenaminsäure, Progesteron, Rosiglitazone, BD1047 und die Flavanoide Naringenin und Quercetin wurden als Antagonisten von TRPM3 beschrieben, da sie einen Ca^{2+} -Einstrom via TRPM3 inhibierten (Naylor et al. 2010, Klose et al. 2011, Majeed et al. 2011, 2012, Straub et al. 2013). Diese Verbindungen wurden dahingehend überprüft, ob sie auch eine inhibitorische Wirkung auf Pregnenolonsulfat-stimulierte TRPM3-Kanäle haben. Es wurde bereits publiziert, dass Mefenaminsäure den Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Einstrom via TRPM3 selektiv blockt und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration basale Konzentrationen erreicht (Klose et al. 2011). Bei der Analyse der transkriptionellen Regulation in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen stellte sich heraus, dass auch die TRPM3-induzierte Aktivierung von Egr-1 und AP-1 signifikant inhibiert wurde. In dem gleichen Zellsystem konnte zudem gezeigt werden, dass die von TRPM3-induzierte Aktivierung von AP-1 nach Stimulation mit CIM0216 durch Mefenaminsäure inhibiert wird (Rubil et al. 2017).

Es wurde postuliert, dass der Sigma-1-Rezeptor Antagonist BD1047 den TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom blockiert. In einer Patch-Clamp Analyse wurde der inhibitorische Effekt von BD1047 bei Stimulation des TRPM3 mit Pregnenolonsulfat bestätigt (Amer et al. 2012). Der Effekt von BD1047 auf die TRPM3-vermittelte Gentranskription wurde daher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass BD1047 die Aktivitäten von Egr-1 und AP-1 nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 inhibierte. BD1047 stellte sich, wie die Mefenaminsäure, als ebenso effektive Verbindung zur Inhibierung von TRPM3-vermittelter Gentranskription heraus. In Experimenten mit Endothelzellen wurde gezeigt, dass durch BD1047 ein Histamin-induzierter Ca^{2+} -Einstrom geblockt wurde (Amer et al. 2012). Die Inhibierung des Ca^{2+} -Einstroms wurde ebenso für TRPC5 gezeigt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass

BD1047 eine direkte Wirkung auf Rezeptor-oder chemisch-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle hat und nicht spezifisch auf TRPM3-Kanäle (Amer et al 2012). Die genauen molekularen Mechanismen der Interaktion von BD1047 mit den verschiedenen Ca^{2+} -Kanal-Typen sind noch nicht völlig aufgeklärt.

Die getesteten Substanzen Progesteron, Pregnenolon, Rosiglitazone und Naringenin oder Quercetin wurden ebenfalls als TRPM3-Inhibitoren postuliert (Majeed et al. 2012, Straub et al. 2013). In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazone und die Flavanoide Naringenin und Quercetin die AP-1-Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293/TRPM3-Zellen verringerten. Der inhibitorische Effekt auf die AP-1-Aktivität war aber deutlich schwächer, verglichen mit dem der Mefenaminsäure. Weiterhin wurde die Egr-1-Aktivität durch die Zugabe von Progesteronen oder Rosiglitazonen nicht beeinträchtigt. Rosiglitazone, Progesterone und Naringenin und Quercetin blocken somit nicht nur den TRPM3-bedingten Ca^{2+} -Einstrom, sondern auch die Auslösung einer Signalkaskade und somit die Gentranskription. Im Vergleich zu Pregnenolonsulfat, das als extrazellulärer Ligand TRPM3 aktiviert (Wagner et al. 2008), haben Progesterone, Rosiglitazone und Naringenin eine/n Auswirkung/Angriffspunkt innerhalb der Zelle. Es ist daher möglich, dass sie direkt mit der Signaltransduktionskaskade interagieren, die die TRPM3-Aktivierung mit erhöhter Egr-1 und AP-1-Aktivität verknüpft.

Die Steroide Pregnenolon und Progesteron haben eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit Pregnenolonsulfat. Während Pregnenolonsulfat als TRPM3-Aktivator einen Ca^{2+} -Einstrom bis zur Regulation der Gentranskription induziert, haben Progesteron und Pregnenolon einen inhibitorischen Effekt auf TRPM3. Es wurde gezeigt, dass die TRPM3-Inhibierung durch Progesteron unabhängig von Pregnenolonsulfat abläuft. Das lässt annehmen, dass die beiden Steroide um dieselbe oder eine ähnliche Bindestelle an TRPM3 konkurrieren (Majeed et al 2012). Naringenin und Quercetin blocken den TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom bereits in sehr geringen Konzentrationen sehr selektiv und effektiv. Die beiden Substanzen verringerten zudem TRPM3-vermitteltes Schmerzempfinden und stellen daher vielversprechende Analgetika für TRPM3-vermittelten Schmerz dar (Manchope et al. 2017).

Die Mefenaminsäure stellte sich als effektivster TRPM3-Inhibitor heraus, da sie sowohl den TRPM3-induzierte Ca^{2+} -Einstrom als auch die TRPM3-induzierte Genexpression durch Stimulation mit den beiden effektivsten TRPM3-Aktivatoren

blockt. Die Relevanz von TRPM3 in der Pregnenolonsulfat-bedingten Aktivierung von Egr-1 und AP-1 wurde pharmakologisch durch Mefenaminsäure bestätigt und genetisch durch die Expression TRPM3-spezifischer shRNAs verifiziert.

4.1.2 Die Pregnenolonsulfat-induzierte Signaltransduktion in HEK293/TRPM3-Zellen

4.1.2.1 Die zentrale Rolle von Ca^{2+} -Ionen als Botenstoff bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Gentranskription

TRPM3-Kanäle sind Kationenkanäle, die permeabel für Ca^{2+} -Ionen sind (Grimm et al. 2003, Lee et al. 2003, Oberwinkler et al. 2005, Wagner et al. 2008). Die Konzentration von freien, intrazellulären Ca^{2+} -Ionen liegt bei $0,1 \mu\text{M}$ und ist somit etwa 20.000-fach geringer im Vergleich zu der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die bei etwa 1-2 mM liegt (Clapham 2007, Case et al. 2007). Durch die Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsgradienten kann die Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär rasch verändert werden, wodurch eine schnelle Signalweiterleitung gewährleistet wird. Es wurde bereits publiziert, dass der TRPM3-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration essentiell ist zur transkriptionellen Induktion. Dies wurde durch Chelatisieren der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen beeinträchtigt (Mayer et al. 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von Egr-1 nach Stimulation von TRPM3 in Insulinomazellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingt (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011). In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle Ca^{2+} -Ionen in der TRPM3-spezifischen Signalkaskade spielen, die zu einer veränderten Genexpression führt. Um die extrazellulären Ca^{2+} -Ionen abzufangen und somit einen Ca^{2+} -Einstrom via TRPM3 zu verhindern, wurden die HEK293/TRPM3-Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium kultiviert, dem zusätzlich der Ca^{2+} -Chelator EGTA zugesetzt wurde. Dadurch wurde sichergestellt, dass auch letzte Reste freier Ca^{2+} -Ionen im Extrazellularraum entfernt wurden. In Zusammenarbeit mit der AG Lipp (Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität des Saarlandes) wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Die Resultate

zeigten eine deutliche Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat, während die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch EGTA vollständig geblockt wurde. Auf transkriptioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von AP-1 nach TRPM3-Stimulation bei Zugabe von EGTA ebenfalls vollständig inhibiert wurde. Die Induktion der Genexpression durch Abpuffern extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen war ebenfalls in Insulinomazellen vermindert (Mayer et al. 2011). Das beweist, dass das Vorhandensein extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen wichtig ist. Die Ca^{2+} -Ionen strömen nach Aktivierung von TRPM3 ins Zellinnere. In Zellen, die keine TRPM3-Kanäle exprimierten, konnte kein Ca^{2+} -Einstrom nachgewiesen werden. Das belegt das zwingende Vorhandensein von TRPM3-Kanälen, die den Ca^{2+} -Einstrom verursachen. Wie wichtig ist die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Induktion einer genregulierenden Signalkaskade? In den TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen konnte ich durch Verwendung des intrazellulären Ca^{2+} -Chelators BAPTA-AM zeigen, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf eine Basalkonzentration verringert wird. Zusätzlich war die Aktivität von AP-1 verringert. Das zeigt, dass durch Abfangen der freien intrazellulären Ca^{2+} -Ionen keine TRPM3-vermittelte Signaltransduktion induziert wird, die die Pregnenolonsulfat-Aktivierung von TRPM3 mit der Aktivität von AP-1 verknüpft. Unter Verwendung von extra- und intrazellulären Ca^{2+} -Chelatoren wie BAPTA-AM und EGTA konnte ich zeigen, dass der TRPM3-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ein essentieller Bestandteil ist, um die Aktivität von AP-1 und Egr-1 zu erhöhen. In anderen Zellsystemen wurde die Bedeutung von extra- und intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bestätigt (Mayer et al, 2011, Müller et al, 2011). Durch Ergebnisse anderer Arbeiten konnte zusätzlich bestätigt werden, dass das Abfangen der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen durch Expression des hochaffinen Ca^{2+} -bindenden Proteins Parvalbumins die Egr-1-Aktivität reduziert war. Dieses Resultat wurde sowohl bei Expression von Parvalbumin im Zytosol als auch im Nukleus erzielt., was auch eine intranukleäre Wichtigkeit von Ca^{2+} zur transkriptionellen Genexpression bedingt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Ca^{2+} -Einstrom von außen und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von großer Relevanz sind, um eine TRPM3-induzierte Signalkaskade zu initiieren und fortzuführen.

4.1.2.2 Die TRPM3-Aktivierung induziert ERK

Eine Konsequenz der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist die Aktivierung verschiedener Kinasen. Ca^{2+} aktiviert den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex und die Proteinkinase C. Die PKC schaltet dann durch Rekrutierung von Ras den MAPK-Signalweg via ERK an (Schönwasser et al. 1998, Berridge et al. 2003, Mayer und Thiel 2009, Mayer et al. 2011). Die Verknüpfung zwischen der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration und der Aktivierung des ERK-Signalweges geschieht durch die Proteinkinase C (PKC) und der Proteinkinase Raf (Duan und Cobb 2010). In Insulinomazellen und pankreatischen β -Zellen bewirkt die Pregnenolonsulfat-bedingte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Aktivierung des ERK-Kinase-Signalweges (Frödin et al. 1995, Benes et al. 1998, 1999, Arnette et al. 2003, Mayer und Thiel 2009, Duan und Cobb 2010). Phosphoryliertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern und induziert dort die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Schenk und Snaar-Jagalskar 1999), wie z.B. c-Fos, einem Hauptbestandteil von AP-1 (Gilley et al. 2009). Die Aktivierung von ERK bewirkt eine Aktivierung der AP-1 Aktivität (Karin, 1995, Whitmarsh und Davis, 1996). Wird die ERK-Signalkaskade auch in dem HEK293/TRPM3-Zellsystem durch Pregnenolonsulfat aktiviert und ist der ERK-Signalweg in der Regulation von AP-1 involviert? In meiner Arbeit konnte ich unter Verwendung spezifischer Phospho-Anitikörper zeigen, dass ERK bereits zehn Minuten nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat phosphorylierte wurde. Die pharmakologische Inhibierung des ERK -Signalweges mit dem selektiven MEK1/2-Inhibitor PD98059 (Rosen et al. 1994) zeigte, dass in TRPM3-exprimierenden Zellen die AP-1-Aktivität nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat deutlich verringerte war. Auch durch die genetische Inhibierung von ERK durch Expression ERK-spezifischer shRNAs wurde eine verringerte AP-1 -Aktivität festgestellt. Folglich wird die Bedeutung von ERK in der Signalkaskade, die nach TRPM3-Stimulation die Aktivierung von AP-1 induziert, untermauert und ERK konnte als Signalüberträger zwischen aktivierten TRPM3-Kanälen und AP-1-Aktivität bestätigt werden.

4.1.2.3 Die TRPM3-Aktivierung induziert JNK

Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38 (Johnson & Lapadat 2002) wurden ebenfalls auf ihre Beteiligung in der TRPM3-induzierten Signalkaskade überprüft. Den ersten indirekten Hinweis auf eine Beteiligung von JNK in der TRPM3-vermittelten Signaltransduktion lieferte eine Western Blot Analyse, in der gezeigt wurde, dass die Biosynthese von c-Jun nach Pregnenolonsulfat-Stimulation der HEK293/TRPM3-Zellen erhöht war. c-Jun stellt ein hervorragendes Substrat für die Signalkinase JNK dar. Die Rolle von JNK wurde zunächst in Experimenten mit dem JNK-Inhibitor SP600125 überprüft. Das Ergebnis war eine deutlich verringerte AP-1-Aktivität nach Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3. Aber es ist zu beachten, dass das verwendete Pharmakon SP600125 nicht JNK-spezifisch ist und auch andere Proteinkinasen inhibiert (Bain et al. 2003). Daher wurden genetische Experimente durchgeführt. Durch Expression von JNK-spezifischen shRNAs wurde der JNK-Signalweg auf genetischer Ebene inhibiert. Hier wurde ebenfalls eine verringerte AP-1-Aktivität festgestellt. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren, wenn auch indirekten Hinweis, dass JNK die Verbindung in der Signalkaskade zwischen TRPM3-Aktivierung und AP-1-Aktivität darstellt. Ein direkter Nachweis der Beteiligung von JNK durch Nachweis der JNK-Aktivierung mittels Phospho-Antikörpern oder des GST-JNK Assays stand zum Ende der Arbeit noch aus. Auffallend ist jedoch, dass in Experimenten mit einer dominant-negativen Mutante von SEK1/MKK4, einer weiteren c-Jun-N-terminalen Kinase, keine Verringerung der AP-1-Aktivität festzustellen ist. Das lässt darauf schließen, dass JNK durch einen SEK1/MKK4-unabhängigen Signalweg aktiviert wird. Gleichmaßen ist auch die Phosphorylierung von ATF2 als Antwort bei Leuzinmangel unabhängig von JNK, sondern auf eine Aktivierung MKK-7 angewiesen (Chaveroux et al. 2009). Initiale Experimente mit dem p38-Inhibitor SB203580 zeigten, dass die AP-1 -Aktivität verringert war. Dies deutet auf eine Beteiligung von der Signalkinase p38 hin. Weitere Experimente sind nötig, um diese Behauptung zu festigen. Die MAP Kinasen JNK und ERK sind auch in der Verknüpfung von TRPM3-induzierter Aktivierung des humanen c-Fos-Promotors beteiligt (Rubil et al. 2016). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ERK1/2 und wahrscheinlich JNK1/2 an der Signaltransduktion beteiligt sind, die nach der TRPM3-Aktivierung zur AP-1 -Aktivität führt.

4.1.2.4 Die Aktivierung von TRPM3 induziert die Phosphatasen Calcineurin und MKP-1

Durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels wird die Ca^{2+} -abhängige Proteinphosphatase Calcineurin aktiviert, die direkt durch Ca^{2+} oder durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin reguliert wird (Rusnak & Mertz 2000). Calcineurin spielt eine große Rolle in der Regulation des Signalweges der nach Stimulation des muskarinischen M3-Rezeptors zur AP-1-Aktivierung führt. Die verstärkte Expression von Calcineurin in humanen Neuroblastomazellen verringerte die AP-1-Aktivität nach Stimulation von M3 muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (Rössler et al. 2008). Calcineurin inhibiert auch in Insulinomazellen die Glukose-induzierte Signalkaskade via ERK (Arnette et al. 2003). Die Expression einer konstitutiv-aktiven Calcineurin-Mutante zeigte, dass Calcineurin die TRPM3-induzierte Signalübertragung reguliert (Mayer et al. 2011). Es wurde überprüft, ob in dem HEK293/TRPM3-Zellsystem Calcineurin als Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus ist, der in der Regulation der TRPM3-induzierten Genexpression beteiligt ist. In meiner Arbeit habe ich durch Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A (ΔCnA), zeigen können, dass die AP-1-Aktivität nach Stimulation des TRPM3 deutlich reduziert war. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch die Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einer verkürzten Form der Calcineurin-Untereinheit A und EGFP erzielt. Die fluorimetrische Lokalisierung des EGFP-markierten Fusionsprotein zeigte, dass die ΔCnA -Mutante im Zytosol exprimiert wurde. Calcineurin wurde früher sowohl im Zytosol als auch im Nukleus nachgewiesen und die Calcineurin-Untereinheit A besitzt sowohl eine Kernlokalisierungs- als auch eine Kernexportsequenz (Rusnak und Mertz 2000). Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse deuten auf eine zytosolische enzymatische Funktion von Calcineurin hin, um die AP-1 Aktivität zu inhibieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass durch Inhibierung von Calcineurin die AP-1-induzierte Genexpression in Knochenzellen gesteigert wird (Worton et al. 2014). Eine direkte Aktivierung von CnA wurde jedoch nicht gezeigt und bedarf weiterer Experimente. Die Calcineurin-Untereinheit B (CnB) besitzt eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit Calmodulin und kann Ca^{2+} aufgrund seiner vier EF-Hand-Motive binden. Es liegt nahe, dass CnB als zytosolischer Ca^{2+} -Fänger fungiert und dadurch die TRPM3-

induzierte Signalkaskade beeinflusst. Die Expression von CnB in HEK293/TRPM3-Zellen schwächte die TRPM3-induzierte AP-1 Aktivität ab. Das lässt die Annahme zu, dass Calcineurin B ein Teil der Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade ist, die durch TRPM3 induziert wird. Untermuert wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Calcineurin B keinen Einfluss auf die B-Raf-induzierte Aktivierung von AP-1 besitzt. Der B-Raf-Signalweg läuft unabhängig von Ca^{2+} ab. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Expression von CnB endogenes CnA und die verkürzte CnA-Mutante vor dem enzymatischen Abbau schützt (Cheng et al. 2011). Aber es gibt auch Hinweise darauf, dass CnB direkt mit dem ERK-Signalweg interagiert. Dieser Schluss ergab sich aus der Entdeckung, dass in Thymozyten, denen die Calcineurin B-Untereinheit fehlt, eine verringerte Phosphorylierung und somit eine reduzierte Aktivierung von ERK festzustellen war (Neilson et al. 2004). Calcineurin fungiert somit als negativer Rückkopplungs-Regulator des ERK-Signalwegs.

Die Phosphatase MKP-1 dephosphoryliert und inaktiviert die MAP Kinasen ERK, p38 und JNK im Zellkern (Shapiro und Ahn 1998, Slack et al. 2001). Es konnte früher bereits in Insulinomazellen gezeigt werden, dass die Pregnenolonsulfat-induzierte Biosynthese des Transkriptionsfaktors Egr-1 bei Expression von MKP-1 verringert war (Mayer et al 2011) und die Gentranskription AP-1-regulierter Gene verringert war (Rössler et al. 2008, Rössler and Thiel 2009, Thiel et al. 2012). MKP-1 ist daher ein weiterer negativer Rückkopplungsmechanismus in der TRPM3-induzierten Signalübertragung. Die Ergebnisse in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen zeigten bei Expression von MKP-1 eine Reduktion der TRPM3-induzierten AP-1 Aktivierung. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von JNK und p38 lieferte die Expression von MKP-5. MKP-5 ist eine Phosphatase, die selektiver die Kinasen JNK und p38 dephosphoryliert. Die Resultate zeigten eine ähnlich verringerte AP-1-Aktivität nach TRPM3-Stimulation mit Pregnenolonsulfat. Diese Ergebnisse werden durch die Erkenntnis untermuert, dass die Expression von MKP-1 oder MKP-5 in dem gleichen Zellsystem die Aktivierung von c-Fos und die c-Fos-Promotoraktivität verringert (Rubil et al. 2016). Die MAP-Kinasen sind somit ein wichtiger Teil einer weiteren negativen Feedback-Hemmung des TRPM3-induzierten Signalwegs.

4.1.2.5 Die Aktivierung Stimulus-responsiver Transkriptionsfaktoren durch TRPM3

Die TRPM3-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion wird durch die Kinasen ERK und JNK bis in den Zellkern fortgeführt. Im Zellkern phosphorylieren und aktivieren sie Transkriptionsfaktoren, was eine Änderung des Genexpressionsmusters zur Folge hat. Die Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren AP-1, Egr-1 und Elk-1 wurden in der TRPM3-induzierter Signaltransduktion in anderen Zellsystemen bereits beschrieben (Mayer et al. 2011, Müller et al. 2011, Thiel et al. 2010). Diese Stimulus-regulierten Transkriptionsfaktoren binden an Gene und aktivieren ihre Transkription (Thiel und Rössler 2017). Die Genprodukte dieser verspäteten Gene sind für die biochemischen Änderungen nach zellulärer Stimulation verantwortlich.

AP-1

Die Stimulation von Insulinomazellen mit Pregnenolonsulfat führt zu einer erhöhten AP-1-Aktivität (Müller et al. 2011). In pankreatischen β -Zellen induzierte Glukose die AP-1-Aktivität (Glauser & Schlegel 2007, Müller 2010). Es liegt daher nahe, dass die TRPM3-induzierte Signalkaskade in den HEK293/TRPM3-Zellen ebenfalls zur Aktivierung von AP-1 führt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat in der HEK293/TRPM3-Zelllinie zu einer Aktivierung von AP-1 führt. Analog dazu konnte ich durch Expression eines Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergens, in dem das TRE mutiert wurde, zeigen, dass das TRE im Promotor AP-1-regulierter Gene das Pregnenolonsulfat-responsive Element darstellt. Wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass die Aktivierung von TRPM3 einen Ca^{2+} -Einstrom ins Zellinnere induziert, bestätigt dies, dass AP-1 zu den Ca^{2+} -responsiven Transkriptionsfaktoren zählt (Sheng et al. 1991, Thiel et al. 2010). Es konnte gezeigt nachgewiesen werden, dass die Glukose-induzierte Aktivierung von AP-1 eine Rolle in der Pathogenese diabetischer Nephrologie spielt (Sanchez und Sharma 2009). Die AP-1-Aktivität korreliert mit der Malignität von chemisch karzinogen induzierten Tumoren (Zoumpourlies et al 2000).

c-Jun, c-Fos und ATF2

Die bZIP-Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos und ATF2 werden durch die

intrazellulären Signalkinasen ERK, JNK und p38 aktiviert. Besonders c-Jun stellt ein hervorragendes Substrat für JNK dar und wird durch sie aktiviert. Die Biosynthese von c-Jun wurde bereits in Pregnenolosulfat-stimulierten Insulinomazellen nachgewiesen (Müller et al. 2012). In dieser Arbeit wurde daher die TRPM3-induzierte Aktivierung von c-Jun und seine Relevanz in der AP-1-Aktivität genauer untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Pregnenolonsulfat-Stimulation von TRPM3 eine erhöhte Biosynthese von c-Jun bewirkt. Weiterhin wurde bei Expression einer dominant-negativen c-Jun-Mutante ohne transkriptionelle Aktivierungsdomäne die AP-1-Aktivität deutlich verringert. Eine ähnliche verminderte AP-1-Aktivität konnte durch Expression von c-Jun-spezifischen shRNAs beobachtet werden. Das bestätigt die Relevanz von c-Jun für die funktionelle Aktivität von AP-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten Zellen. Weiterhin konnte durch Inhibierung der JNK-Kaskade eine reduzierte AP-1-Aktivität festgestellt werden. Die Inhibierung von ERK verringerte die Biosynthese von c-Jun. Somit konnte bestätigt werden, dass c-Jun ein Substrat von ERK und JNK ist. Es wurde vorher beschrieben, dass die transkriptionelle Aktivierung von c-Jun in AtT20-Zellen durch Ca^{2+} reguliert wird, indem durch Öffnen von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen Ca^{2+} in die Zelle einströmt (Cruzalegui et al. 1999). In diesem Fall läuft die Ca^{2+} -bedingte Aktivierung von c-Jun unabhängig von der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges ab. Sie beruht vielmehr auf der Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase. In Hypophysenzellen wurde durch Stimulation von $\text{G}\alpha\text{q}$ -gekoppelten Hormonrezeptoren die Phosphorylierung von ATF2 und c-Jun, sowie eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivierung der Signalkinasen JNK und ERK nachgewiesen (Mulvaney und Robertson 2000, Mayer et al. 2008). Dies belegt, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die entweder durch die Entleerung des Ca^{2+} -Speichers des Endoplasmatischen Retikulums ausreicht um ATF2 oder c-Jun zu aktivieren.

Ein weiterer Hauptbestandteil des AP-1-bildenden Komplexes ist c-Fos. Die Transkription von c-Fos wird durch extrazelluläre Signalmoleküle reguliert, die verschiedene Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des c-Fos-Promotors induzieren. Die Induktion der c-Fos-Biosynthese wurde bereits in stimulierten Insulinomazellen nachgewiesen (Müller et al. 2012). In dieser Arbeit konnte ebenfalls die Aktivierung der c-Fos -Biosynthese nach Stimulation von TRPM3 gezeigt werden. In anderen Arbeiten mit dem HEK293/TRPM3-Zellsystem wurde zudem eine erhöhte

c-Fos-Promotoraktivität nachgewiesen und ein erhöhtes transkriptionelles Aktivierungspotential von c-Fos gezeigt (Rubil 2016). Dies belegt die Beteiligung von c-Fos zur Ausbildung der AP-1-Aktivität.

ATF2 stellt einen weiteren wichtigen Bestandteil von AP-1 dar und wurde daher ebenso überprüft. Das transkriptionelle Aktivierungspotential von ATF2 wurde durch TRPM3-Stimulation erhöht. Auf genetischer Ebene konnte ich durch Expression ATF2-spezifischer shRNAs oder ATF2 Δ N-Mutanten, denen die transkriptionelle Aktivierungsdomäne fehlt, zeigen, dass die AP-1-Aktivität vermindert war. ATF2 nimmt somit, neben c-Fos und c-Jun, in der Regulation von AP-1-induzierter Genexpression in TRPM3-exprimierenden Zellen eine wichtige Rolle ein.

Egr-1

Der humane egr-1-Promotor besitzt fünf „Serum response“-Elemente (SRE) (Sakamoto et al 1991, Bauer et al. 2005) und eine autoregulatorische Bindestelle für Egr-1 (EBS) (Thiel & Cibelli 2002), durch die seine Transkription reguliert werden. Durch die Untersuchung von Egr-1-Promotor/Luziferase-Reportertransgenen wurde aufgeklärt, dass die SREs innerhalb des Promotors für die Aktivierung des Egr-1-Gens durch Pregnenolonsulfat in Insulinomazellen verantwortlich sind (Mayer et al. 2011). Die Stimulation von Insulinomazellen mit Glukose oder Pregnenolonsulfat aktivierte die Biosynthese von Egr-1 (Thiel et al. 2010). Die Egr-1-Aktivität ist in stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293 ebenfalls Zellen erhöht. Dadurch kann Egr-1 als Stimulus-responsiver Transkriptionsfaktor bestätigt werden. Außerdem konnte Pdx-1 als Zielgen von Egr-1 nach TRPM3-Aktivierung in Insulinomazellen identifiziert werden (Mayer et al. 2011). Pdx-1 ist ein Schlüsselfaktor in der Regulation der Insulinbiosynthese pankreatischer β -Zellen (Andrali et al. 2008). Daher ist es nicht überraschend, dass nach TRPM3-Stimulation eine erhöhte Insulin-mRNA-Konzentration festgestellt werden konnte (Mayer et al. 2002). Weiterhin konnte in Insulinomazellen gezeigt werden, dass die TRPM3-induzierte Biosynthese von Egr-1 fast vollständig durch die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 inhibiert wird (Mayer et al. 2011). Daraus kann man schließen, dass die Stimulus-bedingte Aktivierung von Elk-1 zur Induktion der Egr-1-Expression essentiell ist.

Elk-1

Elk-1 wird in Insulinomazellen nach Stimulation mit Glukose aktiviert (Bernal-Mizrachi et al. 2001, Mayer et al. 2011, Müller et al 2012). Daher wurde die Frage geklärt, ob Elk-1 eine ebenso wichtige Bedeutung in TRPM3-vermittelter Gentranskription hat. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von TRPM3 das transkriptionelle Aktivierungspotential von Elk-1 erhöht. Das weist auf eine Phosphorylierung/Aktivierung von Elk-1 durch die MAP Kinasen hin. Zu diesem Zeitpunkt stand noch ein direkter Nachweis von phosphoryliertem Elk-1 aus.

Zusätzlich konnte die Bedeutung von aktiviertem Elk-1 in der Regulation von AP-1 durch Experimente gezeigt werden. Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 verringerte die AP-1-Aktivität deutlich. Außerdem konnte früher gezeigt werden, dass Elk-1 durch Calcineurin reguliert wird (Sugimoto et al. 1997, Tian und Karin 1999). Schlussfolgernd kann bestätigt werden, dass Elk-1 nicht nur in der TRPM3-induzierten Signalkaskade eine Schlüsselrolle einnimmt, sondern auch in der Umwandlung diverser extrazellulärer Stimuli in Genexpressionsänderungen involviert ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die TRPM3-induzierte Signaltransduktion von der Aktivierung des Kanals bis zur Aktivierung Stimulus-responsiver Transkriptionsfaktoren aufgeklärt werden. In der Abbildung 67 ist schematisch der durch TRPM3-induzierte Signalweg gezeigt.

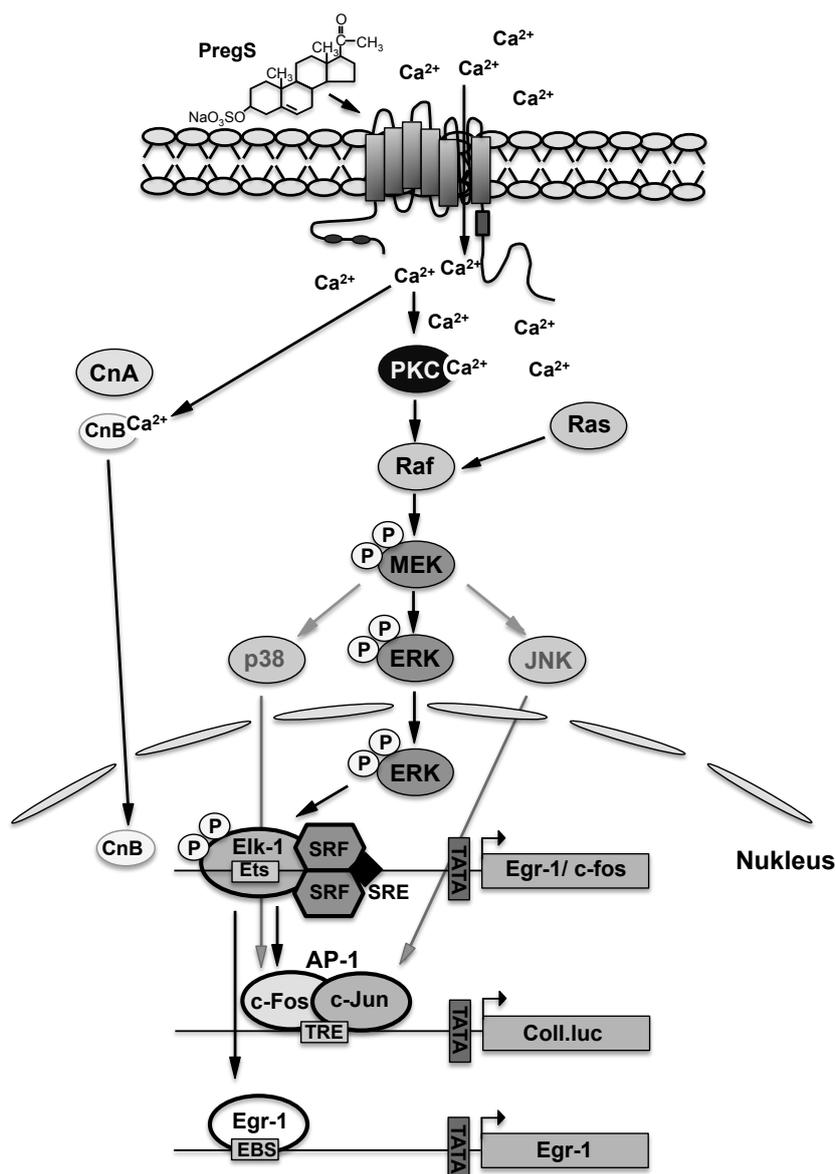


Abbildung 67: Schematische Darstellung der TRPM3 -induzierten Signaltransduktion.

Die Pregnenolonsulfat-bedingte Aktivierung des TRPM3-Kanals führt zum Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und Raf. In Folge dessen werden die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 phosphoryliert und aktiviert. Die Aktivierung von ERK induziert den ternären Komplexfaktor Elk-1, der wiederum die transkriptionelle Regulation von Egr-1 und c-fos reguliert. Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) hat hauptsächlich c-Jun als Substrat, während c-fos das Zielgen von p38 ist. Der Ca^{2+} -Einstrom ins Zellinnere führt ebenfalls zur Aktivierung von Calcineurin, einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase. Calcineurin B (CnB) ist in der Regulation AP-1-regulierter Gene beteiligt. ERK: „extracellular signal-regulated kinase“, SRF: Serum-response Faktor, (Abbildung modifiziert nach Thiel et al. 2013).

4.2 Das Mausmodell zur Analyse der Funktion von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen

In β -Zellen werden durch Glukose die Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren aktiviert: Egr-1, CREB, Elk-1, AP-1, c-Jun und c-Fos (Frödin et al. 1995, Josefsen et al. 1999, Bernal-Mizrachi et al. 2000, 2001, Glauser und Schlegel 2007, Wang et al. 2008, Mayer und Thiel 2009, Müller et al. 2012, Thiel et al. 2013). Um diese Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Funktion *in vivo* analysieren zu können, wurden knock-out Studien durchgeführt. Das Problem bei dieser Art von Funktionsanalyse ist, dass die Proteine redundante Funktionen besitzen. So kann der AP-1-Komplex beispielsweise aus den Proteinen der Jun, Fos und ATF-Familie gebildet werden. Die Proteine der Egr-Familie (Egr-1, 2, 3 und 4) sowie die Proteine der TCF-Familie (Elk-1, SAP-1 und 2) besitzen dementsprechend redundante Funktionen. In einer Analyse von Elk-1-knock-out-Mäusen wurde kein signifikanter phänotypischer Unterschied festgestellt (Cesari et al. 2004), da der Funktionsverlust von Elk-1 durch SAP-1 und SAP-2 kompensiert wurde (Cesari et al. 2004). Um das Problem der redundanten Proteine zu umgehen, wurde ein Plasmid generiert, das für eine dominant-negative Form von Elk-1: RESTElk-1 Δ C kodiert (Stefano et al. 2006). Dieses Plasmid besitzt die N-terminale Repressordomäne des transkriptionalen Repressors REST (Thiel et al. 1998) und die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von Elk-1 fehlt. RESTElk-1 Δ C bindet somit an die Promotorsequenzen von Zielgenen, blockiert die Bindestelle für weitere Transkriptionsfaktoren und inhibiert dadurch die Transkription (Müller et al. 2012). Dieses Plasmid wurde zur Generierung eines transgenen Mausmodells verwendet, das die RESTElk-1 Δ C-Mutante spezifisch in den pankreatischen β -Zellen exprimiert.

4.2.1 Elk-1 in pankreatischen β -Zellen

Es wurde postuliert, dass Elk-1 zur Glukose-induzierten Ca^{2+} -abhängigen Induktion pankreatischer β -Zellgene wie Egr-1 beiträgt (Bernal-Mizrachi et al. 2001). Der egr-1-Promotor besitzt SREs, die Zielsequenz ternärer Komplexfaktoren. Es wurde bereits publiziert, dass die Expression von Egr-1 durch ternäre Komplexfaktoren, hauptsächlich durch die Aktivierung von Elk-1 reguliert wird (Eto et al. 2007, Mayer et al. 2011, Thiel et al. 2013). Egr-1 steuert in den pankreatischen β -Zellen die Expression und Sekretion von Insulin (Mayer et al. 2011, Thiel et al. 2013). Egr-1 wurde eine wichtige Funktion in der Insulinbiosynthese durch die Regulation von Pdx-1 zugesagt (Mayer et al. 2011). Pdx-1 ist ein Hauptregulator des Insulingens. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass Elk-1 eine wichtige Rolle in der β -Zellphysiologie einnimmt.

4.2.2 Die Rolle von Elk-1 in der Regulation des Blutglukosespiegels und der Größe der pankreatischen Inseln

Die genaue biologische Funktion von Elk-1 in den pankreatischen β -Zellen war bislang unbekannt. Um diese zu analysieren, wurde ein Mausmodell generiert, das die dominant-negative Mutante REST/Elk-1 Δ C von Elk-1 spezifisch in den β -Zellen exprimiert. Bei der Analyse dieses Mausmodells konnte zum ersten Mal ein klarer Phänotyp definiert werden.

Die Mäuse, die die dominant negative REST/Elk-1 Δ C-Mutante exprimierten, zeigten in einem intraperitonealen Glukosetoleranztest einen hyperglykämischen Phänotyp, der durch signifikant erhöhte Blutglukosewerte im Vergleich zu den Kontrolltieren definiert wurde. Zudem waren die Blutglukosewerte über einen Zeitraum von 180 min stark erhöht. Die erhaltenen Resultate ähneln stark den Daten, die in dem transgenen Mausmodell zur Analyse der Funktion von Egr-1 in β -Zellen herausgefunden wurden. Die Mäuse, die die dominant negative Egr-1/Zn-Mutante exprimierten, zeigten ebenfalls stark erhöhte Blutglukosewerte über einen längeren

Zeitraum (Müller et al. 2012). Da die Expression von Egr-1 durch Elk-1 reguliert wird (Eto et al. 2007, Mayer et al. 2011, Thiel et al. 2013), bestätigen die ähnlichen Resultate aus den beiden Mauslinien die essentielle Rolle von Elk-1 in der β -Zellphysiologie. Egr-1 aktiviert in β -Zellen Pdx-1 (Eto et al. 2007), das maßgeblich in der Regulation der Insulinbiosynthese und der β -Zellentwicklung beteiligt ist (Brissova et al. 2002, Holland et al. 2005, Andrali et al. 2008, Müller et al. 2012). Eine Repression von Pdx-1 beeinträchtigte die Insulingenexpression und die Proliferation von β -Zellen (Johnson et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass durch Aufheben der Pdx-1-Repression wieder eine normale Glukoseantwort innerhalb von 28 Tagen hergestellt werden konnte. Weitere Studien zeigten eine verbesserte Glukosetoleranz in diabetischen Mäusen mit Ausfall der β -Zellfunktion bei verstärkter Expression von Pdx-1 (Yamamoto et al. 2017). Es lässt daher den Schluss zu, dass Elk-1 über eine indirekte Aktivierung von Pdx-1 eine große Rolle in der Regulation der Insulinbiosynthese spielt. Zu diesem Zeitpunkt konnte die These aufgrund fehlender Experimente nicht bestätigt werden. Die Fähigkeit ausreichend Insulin zu produzieren ist proportional zur Größe der pankreatischen Inseln. Die Größe der pankreatischen Inseln wird durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Nährstoffe reguliert. Glukose wurde als Aktivator der β -Zell-Proliferation und der Erhöhung der β -Zellmasse beschrieben (Swenne 1992). Es wurde auch beschrieben, dass die Stimulation von β -Zellen mit Glukose zu einer Aktivierung von Egr-1 führt (Susini et al. 1998). Es wurde daher überprüft, ob Elk-1 in der Regulation der Inselgröße beteiligt ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von REST/Elk-1 Δ C zu einer deutlich geringeren Größe der pankreatischen Inseln führte. Die Mäuse, die die REST/Elk-1 Δ C-Mutante exprimierten, zeigten eine um fast 50% verringerte Inselgröße verglichen mit der Inselgröße der Kontrolltiere. Dieses Ergebnis ähnelt stark den Resultaten aus früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass Mäuse, die eine Egr-1/Zn-Mutante exprimierten, eine geringere β -Zellgröße besitzen (Müller et al. 2012). Daher lässt sich schlussfolgern, dass Elk-1 in der Regulation der Inselgröße beteiligt ist. Die Inselgröße wird durch das Gleichgewicht zwischen Proliferations- und Apoptoserate bestimmt und aufrecht erhalten (Bernal-Mizrachi et al. 2000). Die Ausbildung von kleineren Inseln erklärt daher die Ausbildung eines diabetischen Phänotyps. Wird nicht genügend Insulin produziert

spricht man von dem Krankheitsbild Diabetes mellitus Typ 2. Ein Kennzeichen von Diabetes mellitus Typ 2 ist die Apoptose der β -Zellen, in der auch Egr-1 eine Rolle spielt (Liu et al. 1998, Xie et al. 2011). Frühere Studien zeigten in Egr1/Zn-Mäusen eine gesteigerte Aktivität der Apoptose-einleitenden Caspasen 3 und 7 (Müller et al. 2012). Es lässt daher vermuten, dass Elk-1 durch Regulation von Egr-1 ebenfalls in der Apoptose beteiligt ist. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit standen dahingehende Experimente noch aus. Es wurde auch gezeigt, dass die Proliferation und das Überleben der β -Zellen, sowie die Insulingenexpression und -sekretion durch den Transkriptionsfaktor CREB vermittelt werden (Jhala et al. 2003, Hussain et al. 2006, Dalle et al. 2011). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) stieg die Anzahl der Diabetes mellitus Typ 2-Patienten 2014 auf zirka 10% der Weltbevölkerung und ist somit die häufigste Stoffwechselerkrankung weltweit (Zsombok und Derbenev 2016). Mit der raschen Erhöhung der Anzahl erkrankter Menschen steigt auch das medizinische Interesse und das Verständnis der Grundlagen ist daher von wachsender Bedeutung. Der Erhalt von ausreichend funktionalen β -Zellen liegt daher im Fokus der Diabetes-Forschung. Aus diesem Grund zielen zukünftige Therapiestrategien auf die Inhibierung der β -Zellapoptose und der -fehlfunktion ab. Abschließend lässt sich mit großer Gewissheit sagen, dass Elk-1 eine zentrale Rolle in der Regulation der β -Zellphysiologie einnimmt. Zukünftige Experimente sollten auf die Identifizierung weiterer Elk-1-regulierter Zielgene in pankreatischen β -Zellen abzielen, um potentielle Gene in der Entstehung von Diabetes zu identifizieren.

Literaturverzeichnis

Andrali SS, Sampley MI, Vanderford NL and Özcan S (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem. J.* 415:1-10

Alam J & Cock JL. (1990). Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* , 188:245-254.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995). PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* , 270:27489-94.

Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Catterall WA et al. (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Ion Channels. *Br J Pharmacol* 170: 1607-1651.

Allegretto EA, Smeal T, Angel P, Spiegelmann BM, Karin M (1990). DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J. Cell Biochem.* 42(4): 193-206.

Al-Sarraj A, Day RM, Thiel G (2005). Specificity of Transcriptional Regulation by the Zinc Finger Transcription Factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *Journal of Cellular Biochemistry* 94: 153-167.

Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Andersen NA, Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T, Bonny C (2000). The c-Jun Amino-Terminal Kinase Pathway is Preferentially Activated by Interleukin-1 and Controls Apoptosis in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*,49:1468-1476.

Amer MS., McKeown L., Tumova S., Liu R., Seymour VA., Wilson LA., Naylor J., Greenhalgh K., Hou B., Majeed Y., Turner P., Sedo A., O'Regan DJ., Li J., Bon RS., Porter KE., Beech DJ. (2013). Inhibition of endothelial cell Ca^{2+} entry and transient receptor potential channels by Sigma-1 receptor ligands. *Br J Pharmacol.* 168(6):1445-55

Andrikopoulos S., Blair A.R., Deluca N., Fm B.C., Proietto J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 295: 1323-1332

Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. (1987). 12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer located in the 5' flanking region. *Mol Cell Biol* , 7:2256-66.

Angel, P, Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987a). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor; *Cell* 49: 729-739.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* , 55:875-85.

Angel P, Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochemica and Biophysica Acta* 1072:129-157

Ashcroft FM (2006). From molecule to malady. *Nature* 440: 440-447

Arnette D, Beers Gibson T, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA and Cobb M (2003). Regulation of ERK1 and ERK2 by Glucose and Peptide Hormones in Pancreatic Cells. *JBC* 278, 32517-32525.

Ausubel F.A, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A, & Struhl K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York

Avwioro G. (2011). Histochemical Uses of Haematoxylin-A Review. *JPCS*, Vol.1

Bain J, McLauchlan H, Elliot M, Cohen P (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371: 199-204.

Bandyopadhyay SK and Bancroft C (1989). Calcium Induction of the mRNAs for Prolactin and c-fos Is Independent of Protein Kinase C Activity. *Journal of Biological Chemistry*; 14216-14219.

Bauer I, Hohl M, Al-Sarraj A, Vinson C, Thiel G. (2005). Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signalregulated protein kinase. *Arch Biochem Biophys* , 438:36-52.

Bauer I, Al Sarraj J, Vinson C, Larsen R, Thiel G. (2007). Interleukin-1 β and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor " in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *J Cell Biochem* , 100:242-55.

Bender R. (1994). Determination of the Area under the Curve. *Diabetes Care* 17

Benes C, Roisin MP, Van Tan H, Creuzet C, Miyazaki J-i & Fagard R 1998 Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic β cell line. *Journal of Biological Chemistry* 273 15507-15513.

Benes C, Poitout V, Marie J-C, Martin-Perez J, Roisin M-P & Fagard R (1999). Mode of regulation of

the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic β -cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochemical Journal* 340 219-225.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase; *PNAS* vol. 98 no. 24, 13681-13686

Bennett TM, Mackay TS, Siegfried CJ, Shiels A (2014). Mutation of the melastatin-related cation channel, TRPM3, underlies inherited cataract and glaucoma. *PLoS One.*: 4;9(8)

Bernal-Mizrachi E, Wice B, Inoue H, Permutt MA. (2000). Activation of serum response factor in the depolarization induction of Egr-1 transcription in pancreatic islet β -cells. *J Biol Chem* , 275:25681-89.

Bernal-Mizrachi E, Wen W, Srinivasan S, Klenk A, Cohen D, Permutt MA. (2001). Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells . *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 281:E1286-99

Berridge MJ (1993). Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*. 1993 Jan 28;361(6410):315-25.

Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000). The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature Reviews*, Vol. 1 October: 11-21.

Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL (2003). Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nature Reviews*, Vol. 4 July: 517-529.

Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2011. Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5, 35.

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P (2001). Calcium signalling-an overview. *Cell & Developmental Biology*, Vol. 12, 2001: pp. 3-10

Brennan RG (1993). The winged helix DNA-binding motif: another helix turn helix takeoff. *Cell* 74(5):773-6

Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM, Piston DW, Wright CVE and Powers AC (2002). Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* 277:11225-11232

Brivanlou AH and Darnell JE jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295(5556):813-8.

Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8033-8037.

Carafoli E (2004). Calcium signaling: a historical account , *Biol Res* 37: 497-505.

Case RM, Eisner, Gurney A, Muallem S, Verkhatsky A (2007). Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium*, Vol 42: 345-350.

Cavigelli F, Dolfi F, Claret FX, Karin M (1995). Induction of c-Fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO Journal*: 1; 14: 5957-5964

Cesari F, Brecht S, Vintersten K, Vuong LG, Hofmann M, Klingel K, Schnorr J-J, Arsenian S, Schild H, and Herdegen T et al. (2004). Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol Cell Biol* 24:294-305.

Chaveroux C, Jousse C, Cherasse Y, Maurin AC, Parry L, Carraro V, Derijard B, Bruhat A, Fafournoux P (2009). Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Mol Cell Biol.* 29: 6515-6526

Chen L & Sokabe M. (2005). Presynaptic modulation of synaptic transmission by pregnenolone sulfate as studied by Optical Recordings. *J Neurophysiol* , 94:4131-44.

Cheng J, Tang W, Su Z, Wie Q. (2011). Mutation of calcineurin subunit B M118 influences the activities of NF-AT and p53, but not calcineurin expression level. *Biochem Biophys Res Comm* 413:481-486.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* , 54:541-52.

Choi KC , Lee YS , Lim S , Choi HK , Lee CH , Lee EK , Hong S , Kim IH , Kim SJ , Park SH. (2006). Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat Immunol* , 7:1057-65.

Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc-finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7857-7861.

Christy BA, Nathans D (1989). Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol. Cell Biol* 9:4889-4895.

Christy BA, Nathans D(1989 a). DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(22): 8737-8741.

Ciurtin C, Majeed Y, Naylor J, Sukumar P, English AA, Emery P, Beech DJ (2010). TRPM3 channel stimulated by pregnenolone sulphate in synovial fibroblasts and negatively coupled to hyaluronan. *BMC Musculoskelet Disord.* 4;11:111

Clapham D.E., Runnels Loren W. & Strübing Carsten (2001). Calcium signaling. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):259-68.

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

Clapham DE. (2007). Calcium signaling. *Cell* , 131:1047-58

Clapham DE. (2007) SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*, 129, 220.

Cohen DR, Ferreira CP, Grentz R, Franza BR, Jr., Curran T. (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with jun: Transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev* , 3:173-84

Colsoul B., Vennekens R., Nilius B. (2011). Transient receptor potential cation channels in pancreatic β cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 161:87-110.

Crabtree G.R (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , Calcineurin and NFAT. *Cell*, 5, 96: 611-4

Crabtree G.R. (2001). Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. *Journal of Biochemical Chemistry*, 276: 2313-2316

Cruzalegui FH, Hardingham GE, Bading H. (1999). c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J* , 18:1335-44.

Curran T & Franza BR, Jr. (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell* , 55:395-97.

Dalle S, Quoyer J, Varin E, Costes S (2011). Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells. *Current Mol Pharmacol.* 4(3):187-95.

Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392: 198-202.

de Wet J, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987). Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease "Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells." *Molecular and Cellular Biology* 7 (2): 725-737.

Drews A, Mohr F, Rizun O, Wagner TF, Dembla S, Rudolph S, Lambert S, Konrad M, Philipp SE, Behrendt M, Marchais-Oberwinkler S, Covey DF, Oberwinkler J. (2014). Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br J. Pharmacol.*

Duan L & Cobb MH. (2010). Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback. *Proc Natl Acad Sci USA* , 107:22314-19.

Eferl R, Wagner EF (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nar Rev.. Cacer* 3: 859-868.

Ekici M, Keim A, Rössler OG, Hohl M, Thiel G. (2012). Chromatin Structure and Expression of the AMPA Receptor Subunit GluR2 in Human Glioma Cells: Major Regulatory Role of REST and Sp1 *Journal of Cellular Biochemistry* 113:528-543

Eto K, Kaur V, Thomas MK. (2007). Regulation of Pancreas Duodenum Homeobox-1 Expression by Early Growth Response-1. *J Biol Chem* , 282:5973-83.

Flockerzi V. (2007). An Introduction on TRP channels. *HEP* (2007) 179:1-19

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

Franza BR Jr, Rauscher FJ, Josephs SF and Curran T. (1988). The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239, 1150-1153.

Freund A, Jolivel V, Durand S, Kersual N, Chalbos D, Chavey C, Vignon F, Lazennec G (2004). Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene* 23:6105-6114

Frödin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB, Van Obberghen EV (1995).

Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting β -cell line. *J Biol Chem* , 270:7882-89.

Frühwald J, Camacho LJ, Dembla S, Mannebach S, Lis A, Drews A, Wissenbach U, Oberwinkler J, Philipp SE (2012). Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *J Biol. Chem* 287: 36663-36672

Gallin WJ, Greenberg ME (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Curr Opin Neurobiol* 5: 367-374.

Gilley R, March HN, Cook SJ. (2009). ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cell Signal* , 21:969-77.

Glauser DA & Schlegel W. (2007). Sequential actions of ERK1/2 on the AP-1 transcription factor allow temporal integration of metabolic signals in pancreatic β cells. *FASEB J* , 21:3240-49

Glauser DA & Schlegel W. (2007). Transcriptional response of pancreatic β cells to metabolic stimulation: large scale identification of immediate-early and secondary response genes. *BMC Molecular Biology* 8:54.

Gozdecka M, Lyons S, Kondo S, Taylor J, Li Y, Walczynski J, Thiel G, Breitwieser W, Jones W (2014). JNK suppresses tumor formation via a gene-expression program mediated by ATF2. *Cell Rep.* 20, 9(4): 1361-1374.

Gossen M & Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclin-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* , 89:5547-51.

Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* , 43:725-30.

Graham F, Smiley J, Russel W, Nairn R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of general Virology* 36: 59-72.

Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schulz G, 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, Harteneck C (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-Erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol* 67: 798-805.

Guerini D. (1997). Calcineurin: Not just a simple proetin phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Comm*; 235: 271-275.

Gupta S, Campbell D, Dérijard B, Davis RJ. 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway.

Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors fos/jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3720-3724

Halazonetis TD., Georgopoulos, K., Greenberg, ME and Leder, P. (1988) c-jun dimerizes with itself and with c-fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924

Halokovska B, Grycova L, Jirku M, Sulc M, Bumba L and Teisinger J (2012). Calmodulin and S100A1 protein interact with N terminus of TRPM3 channel. *Journal of Biological Chemistry* 287 :16645-16655.

Han S, Yasuda K, Kataoka K (2011). ATF2 interacts with b-cell-enriched Transcription Factors, MafA, Pdx-1, and Beta2, and Activates Insulin Gene Transcription. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 286, NO. 12, pp. 10449 -10456

Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* , 385:260-65.

Held K., Kichko T., De Clerq K., Klaassen H., Van Bree R., Vanherck J.C., Marchand A., Reeh P. W., Chaltin P., Voets T. and Vriens J. (2015). Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release. *PNAS*: 1363-1373

Hillen W. and Berens C. (1994). Mechanisms Underlying Expression of Tn10 Encoded Tetracycline Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:345-369

Hillen W., Gatz C., Altschmied L., Schollmeier K. and Meier I. (1983). Control of Expression of the Tn10-encoded Tetracycline Resistance Gene: Equilibrium and Kinetic Investigations of the Regulatory Reactions. *J.Mol.Biol.* 169:707-721.

Hipskind RA, Rao VN, Mueller CGF, Reddy ESP, Nordheim A (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62^{TCF}. *Nature* 354: 532-534.

Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. (1998). Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 . *J Biol Chem* , 273:31327-36.

Holland AM, Gonez LJ, Naselli G, Macdonald RJ and Harrison LC (2005). Conditional expression demonstrates the role of Pdx-1 in maintenance and regeneration of β -cells in adult pancreas. *Diabetes* 54(9):2586-95

Hong S.K, Yoon S, Moelling C, Arthan D and Park J.I. (2009). Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling. *J. Biol. Chem* 284: 33006-330018.

Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Ceretti DP, Urdal DL, Conlon PJ (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 6:1204-1210

Hussain MA, Porras DL, Rowe MH, West JR, Song WJ, Schreiber WE, Wondisford FE. (2006). Increased pancreatic beta-cell proliferation mediated by CREB binding protein gene activation. *Mol Cell Biol* , 26:7747-59.

Islam MS (2011). TRP channels of islets. transient receptor potential channels. *Adv. Exp Med. Biol.* 704: 811-830

Janknecht R, Nordheim A (1992). Ets protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* 20(13):3317-24

Jhala US, Canettieri G, Screaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Walker J, Lin X, White M, Montminy M (2003). cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17(13):1575-80

Jo J, Choi MY, Koh DS (2007). Size Distribution of Mouse Langerhans Islets. *Biophysical Journal* 93; 2655-2666.

Johnson, GL, and Lapadat R (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298(5600): 1911-12

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371 :606 -609

Josefsen K, Sorensen LR, Buschard K, Birkenbach M. (1999). Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells . *Diabetologia* , 42:195-203.

Kalia J, Swartz KJ (2013). Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Scientific Reports* 3: 1523.

Karim FD, Urness Ld, Thummel CS (1990). The Ets-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich DNA core sequence. *Genes Dev.* 4; 1451-1453.

Karin M (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.

Karin M, Liu Zg, Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin. Cell Biol.* 9(2):240-6.

Kaufmann K, Bach K, Thiel G. (2001). Extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/1 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol Chem* 382:1077-1081

Kaufmann A, Kein A & Thiel G. (2013). Regulation of Immediately-Early Gene Transcription Following Activation of G α q-Coupled Designer Receptors. *Journal of Cellular Biochemistry* 114: 681-696

Kistner A, Gossen M., Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H & Bujard H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(20): 10933-10938.

Klose C, Straub I, Riehle M, Ranta F, Krautwurst D, Ullrich S. (2011). Fenamates as TRP channel blocker: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br J Pharmacol* 162: 1757-1769.

Kohan DE (2008). Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney International* 74: 427-437.

Kolch, W, Heidecker, G, Kochs, G, Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme', D., Rapp, U.R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation; *Nature* 364:249-252.

Kowolik CM & Yee JK. (2002). Preferential Transduction of Human Hepatocytes with Lentiviral Vectors Pseudotyped by Sendai Virus F Protein. *Mol Therapy* ; 5:762-69.

Kumbrick J, Gerlinger M, Johnson JP (2005). Egr-1 induces the expression of its corepressor Nab2 by activation of the Nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *JBC* 280, 42785-42793.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Bd. 227, S. 680-685

Lambert S, Drews A, Rizun O, Wagner TF, Lis A, Mannebach S, Plant S, Portz M, Meissner M, Philipp SE, Oberwinkler J (2011). Transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) is an ion-conducting plasma membrane channel inhibited by zinc ions. *J Biol Chem* 286:12221-12233

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 24;240(4860):1759-64.

Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin J-H, Feder JN, Janovitz EB (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *Journal of Biological Chemistry* 278 20890-20897.

Lehmann U, Brocke P, Dittmer J, Nordheim A. (1999). Characterization of the human elk-1 Promotor. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 3: 1736-1744

Leprince, D., Gegonne, A.; Coll, J., De Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306 (5941): 395-397

Lesch A, Rubil S, and Thiel G (2014). Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol* 171:2645-2658.

Lesch A, Hui X, Lipp P, and Thiel G (2015). Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca^{2+} ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Mol. Pharmacol.* 87: 617-628.

Lesch A, Rößler OG, and Thiel G. (2017). Extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase, and calcineurin regulate transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) induced activation. *Journal of Cellular Biochemistry*.

Li S (2005). Mechanisms of Cellular Signal Transduction. *Int J. Biol Sci.* 1(4):152

Liu C, Rangnekar VM, Adamson E, Mercola D (1998). Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by Egr-1. *Cancer Gene Therapy* 5: 3-28

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* (2002); 292 (1): 268-271.

Majeed Y, Bahnasi Y, Seymour VAL, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK et al. (2011). Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPM5 channels. *Mol Pharmacol* 79: 1023-1030.

Majeed Y, Tumova S, Green BL, Seymour VAL, Woods DM, Agarwal AK et al. (2012). Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell Calcium* 51: 1-11.

Marabita F, Islam MD, Shahidul MD (2016). Expression of Transient Receptor Potential Channels in the Purified Human Pancreatic β -Cells. *Pancreas*

Matsuoka TA, Kaneto H, Miyatsuka T Yamamoto T, Yamamoto K, Kato K, Shimomura E, Stein R, Matsuhisa M (2010). Regulation of MafA expression in pancreatic beta-cells in db/db mice with diabetes. *Diabetes* 59(7):1709-20.

Mayer, S.I., Thiel, G. (2009). Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB; *Eur J Cell Biol* 88: 19-33

Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Takeshi E, Thiel G. (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK and ternary complex factors. *J Biol Chem* , 286:10084-96.

McMahon M. (2001). Steroid receptor fusion proteins for conditional activation of Raf-MEK-ERK signaling pathway. *Methods Enzymol* , 332:401-17.

Milbrandt J (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238:797—799, 1987

Montell C, Birnbaumer, L, and Flockerzi, V. (2002). The TRP Channels: a Remarkably Functional Family. *Cell* 108, 595-598

Müller I, Mayer SI, Keim A, Thiel G (2009) Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *Biospektrum* 01:52-53

Müller I, Mayer SI, Keim A, Thiel G. (2009). Lentiviraler Gentransfer: Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *BIOSpektrum* , 15:52-53.

Müller I, Endo T, Thiel G. (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* , 110:1481-94.

Müller I, Rössler OG, Thiel G. (2011). Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol Pharmacol.*, 80(6):1179-89

Müller I, Rössler OG, Wittig C, Menger MD, and Thiel G. (2012). Critical Role of Egr Transcription Factors in Regulating Insulin Biosynthesis, Blood Glucose Homeostasis, and Islet Size. *Endocrinology*; 153(7)

Mulvaney JM and Robertson MS (2000), Divergent signaling pathways requiring discrete calcium signals mediate concurrent activation of two mitogen-activated protein kinases by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*;275(19):14182-9.

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* , 272:263-67.

Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ (2008). Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br J Pharmacol* 155: 567-573.

Naylor J, Li J, Milligan CJ, Zeng F, Sukumar P, Hou B, Sedo A, Yuldasheva N, Majeed Y, Beri D (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circulation Research* 106 1507-1515.

Neilson JR, Winslow MM, Hur EM, Crabtree GR. (2004). Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20:255-266.

Nilius B (2007). Trp channels in disease. *BBA* 1772, 805-812.

Nilius Bernd, Owsianik Grzegorz, Voets Thomas, Peters John A. (2007). Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiological Reviews* 87: 1, 165-217

Nilius B, Flockerzi V (2014). What do we really know and what do we need to know: some controversies, perspectives, and surprises. Nilius B, Flockerzi V (Eds.), *Mammalian transient receptor potential (TRP) channels*. Springer Verlag, Handbook of Experimental Pharmacology 223, 1239-1280.

Nilius B, Szallasi A (2014). Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacol Rev* 66:676-814

Nunn, MF., Seeburg, PH., Moscovici, C., Duesberg, PH. (1983). Tripartite structure of the avian Erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306 (5941): 391-395.

Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol. Chem* 10;280(23):22540-8.

Oikawa T, Yamada T (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303: 11-14

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 4:552-65.

Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 685-717.

Pagel JI, Deindl E (2011). Early growth response-1-a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem. Biophys.* 48(4):226-35

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993). Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 8392-96

Petersohn, D and Thiel. G (1996). Role of zinc-finger proteins Sp1 and zif268/egr-1 in transcriptional regulation of the human synaptobrevin II gene. *European Journal of Biochemistry*, 239

Pritchard, CA, Samuels ML, Bosch E, and McMahon M. (1995). Conditionally Oncogenic Forms of the A-Raf and B-Raf Protein Kinases Display Different Biological and Biochemical Properties in NIH 3T3 Cells. *Molecular and cellular biology* 15(11): 6430-42

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*, 16:1247-55.

Rauscher FJ, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tijan R, Franza BR jr. (1988) Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* 240:1010.

Rauscher.FJ, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelmann BJ (1988) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52:471.

Rauscher, 3rd, F. J., Voulalas, P. J., Franza, Jr, B. R. and Curran, T. (1988) Fos and jun bind cooperatively to the AP-1 site : reconstitution in vitro. *Genes Dev.* 2, 1687-1699

Reddy SPM, Mossmann BT (2002). Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am. J. of Physiol.* 283 (6): 1161

Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*:12(6):1207-21.

Rössler OG, Stefano L, Bauer I, Thiel G (2006). Stimulus-transcription coupling in the nervous system.-the zinc finger Egr-1. Thiel G (Ed.) *Transcription Factors in the Nervous System-Development, Brain, Function, and Disease.* Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 379-395

Rössler OG, Henß I, Thiel G. (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* , 470:93-102.

Rössler OG & Thiel G. (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* , 10:40.

Rössler OG, Lesch A, Thiel G (2016). Combining fibroblast isolation with lentiviral gene transfer to validate transgene expression in mice following pronucleus injection. *Transgenic Research*

Rubil S, Rössler OG, Thiel G (2016). CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Brit. J. Pharmacol.* 173: 305-318

Rubil S, Thiel G (2017). Activation of gene transcription via CIM0216, a synthetic ligand of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels . *Channels* 2;11(1)

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirusbased system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics* 33:401-406

Rusnak F & Mertz P (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev* 80:4; 1483-1521.

Russo MW, Severson BR, Milbrandt J. 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6873–6877.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn G, Mullis KB, Erlich HA (1987). Primer-

Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239: 487-491

Sambrook J, Fritsch E.F &Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanchez AP, Sharma K (2009). Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephrology. *Expert Rev Mol Med*: 28;11

Sassoni-Corso P, Sisson JC, Verma IM (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334: 314-319.

Schreiber E, Matthias P, Müller MM and Schaffner W (1989). Rapid deletion of octamer binding proteins with „mini-extracts“, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research*; 17:6419

Shapiro PS and Ahn NG (1998). Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinases 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J Biol Chem* 273:1788-1793.

Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* 4, 131-136

Sharrocks A.D (2001). The Ets-Domain Transcription Factor Family. *Nature Reviews* 2:827-837

Shaw, P.E., Saxton, J. (2003). Ternary complex factors prime nuclear target for mitogen activated protein kinases; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 1210-1226

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* , 4:571-82.

Schenk PW, Snaar-Jagalska BE (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochem Biophys Acta* 1449:1-24).

Shore P and Sharrocks AD (1994). The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol Cell Biol.* 1994 May; 14(5): 3283-3291

Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart, Kupperschmitt A, Charneau P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* , 96:4103-10

Slack DN, Seternes O-M, Gabrielsen M, and Keyse SM (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38a and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 276: 16491-16500.

Smeal, T., Angel, P., Meek, J. and Karin, M. (1989) Different requirements for formation of jun : jun and jun : fos complexes. *Genes Dev.* 3, 2091-2100

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.

Spohn D, Rössler OG, Philipp SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, Hoth M, Thiel G. (2010). Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca^{2+} ions and c-Jun N-terminal protein kinase. *Mol Pharma* , 78:865-76.

Stefano I., Al Sarraj J., Rössler OG., Vinson C., Thiel G. (2006). Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *J. Neurochem.*, 97:92-104

Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C, Thiel G. (2001). Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J*, 360:599-607.

Steinmüller L & Thiel G. (2003). Regulation of Gene Transcription by a Constitutively Active Mutant of Activating Transcription Factor 2 (ATF2) *Biol Chem* , 384:667-72.

Stewart AA, Ingebritsen TS, Cohen P (1982). Discovery of a Ca^{2+} -and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Letters* 11; 137 (1), 80-4

Strathdee CA, McLeod MR, Hall JR. (1999). Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229: 21-19.

Straub I, Mohr F, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, Schaefer M (2013). Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *Br J Pharmacol* 168: 1835-1850.

Straub I, Krögel U, Mohr F, Teichert J, Rizun O, Konrad M, Oberwinkler J, Schaefer M (2013). Flavanones That Selectively Inhibit TRPM3 Attenuate Thermal Nociception In Vivo. *Mol Pharmacol* 84:736-750

Stull ND, Breite A, McCarthy R, Tersey SA, Mirmira RG (2012). Mouse Islet of Langerhans Isolation using a Combination of Purified Collagenase and Neutral Protease. *Journal of Visualized Experiments* 67.

Sugimoto T, Stewart S, Guan KL. (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, Calcineurin, is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* , 272:29415-18.

Sukhatme VP, Cao X, Chang L, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira P, Cohen D, Edwards S, Shows T, Curran T, Le-Beau M, Adamson ED. (1988). A zinc finger encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation. *Cell* , 53:37-43.

Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W (1998). Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif268 and nur-77 gene expression in pancreatic beta (Ins-1) cells. *FASEB J*.12(12): 1173-1182.

Suzuki H, Sasaki E, Nakagawa A, Muraki Y, Hatano N, Muraki K (2016). Diclofenac a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is an antagonist of human TRPM3 isoforms. *Pharmacology Research & Perspectives* 4:1-14.

Svaren J, Severson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. 1996. NAB2, a corepressor of NGFI-A (egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 16:3545–3553.

Swenne I (1992). Pancreatic beta-cell growth and diabetes. *Diabetologia*:35, 192-201.

Tai M. (1994). A Mathematical Model for the Determination of Total Area Under Glucose Tolerance and Other Metabolic Curves. *Diabetes Care* 17

Tanoue T, Moriguchi T, Nishida E (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *J. Biol. Chem.* 274: 19949-19956.

Thiel G, Lietz M, Cramer M. (1998). Biological activity and modular structure of RE-1 silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem* , 273:26891-99.

Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M. 2000. The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1493:289-301

Thiel G & Cibelli G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J*

Cell Physiol , 193:287-92.

Thiel G & Rössler OG. (2005). Signaltransduktion Rezeptor-Tyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden:Signaltransduktion. Biol Unserer Zeit , 35:312-19.

Thiel G, Al Sarraj J, Vinson C, Stefano L, Bach K. (2005). Role of basic region leucine zipper transcription factors cyclic AMP response element binding protein (CREB), CREB2, activating transcription factor 2 and CAAT/enhancer binding protein alpha in cyclic AMP response element-mediated transcription. J Neurochem , 92:321-36.

Thiel G & Rössler OG. (2007). Viren als Werkzeuge der Gentherapie: Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht. Biol Unserer Zeit , 37:241-48.

Thiel G, Ekici M, Rössler OG. (2009). Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf. Cell Communication & Signaling , 7:8. raf

Thiel G, Mayer SI, Müller I, Stefano L, Rösler O. (2010). Egr-1-A Ca^{2+} -regulated transcription factor. Cell Calcium , 47:397-403.

Thiel G & Rössler (2011). Immediate-Early Transcriptional Response to Angiotensin II in Human Adrenocortical Cells. Endocrine Society Vol.152,: 4716-4728.

Thiel, G., Lesch, A., Keim, A. (2012). Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation; Endocrinology 153: 4716-4728.

Thiel G, Müller I, Rössler OG (2013). Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic β -cells. Journal of Molecular Endocrinology 50, R75-83.

Thiel G, Rössler OG (2014). Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene Transcription. Mol. Nutr. Food Res. 58, 1402-1413

Thiel G, Müller I, Rössler OG (2014). Expression, signaling and function of Egr transcription factors in pancreatic β -cells and insulin-responsive tissues. Mol and Cell. Endocrinology 388, 10-19.

Thiel G and Rössler OG (2017). Resveratrol regulates gene transcription via activation of stimulus-responsive transcription factors. Pharmacol Res 117: 166-176

Tian J. and Karin M. (1999). Stimulation of Elk1 Transcriptional Activity by Mitogen-activated Protein Kinases is Negatively Regulated by Protein Phosphatase 2B (Calcineurin). The Journal of Biological Chemistry, Vol 274:15173-15180.

Troppe J, Bruder JT, Munoz H, Lloyd PA, Kyriakis J, Banerjee P, Avruch J, Rapp UR (1994). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J. Biol. Chem.* 269: 7030-7035

Uhlen P, and Fritz N (2010). Biochemistry of calcium oscillations. *Biochemical and biophysical research communications*; 396(1): 28-29.

Verma IM. (1996). "Green light" for gene transfer. *Nat Biotechnol* , 14:576.

Veserly PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L (2009). Translational regulation of mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat. Res.* 682(1): 7-12

Vogt PK. 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 20, 2365-2377.

Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* , 70:482-94

Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells . *10:1421-30.*

Walsh P, Metzger D, Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech* , 10:506-13.

Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., & Ito, H. (2009). The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ. J.*, 73(3), 419-427.

Webb GC, Akbar MS, Zhao C, Steiner DF (2000). Expression profiling of pancreatic beta cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5773-5778.

Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, and Davis RJ (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269: 403-407.

Whitmarsh AJ, Yang S-H, Su MS-S, Sharrocks AD, Davis RD. (1997). Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* , 17:2360-71

Whitmarsh AJ and Davis RJ (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* 74: 589-607.

Wood K.V., Lam A.Y., McElroy W.D (1989). Introduction to Beetle Luciferases and their Applications. *J. of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 4:289-301

Worton LE, Kwon RY, Gardiner EM, Gross TS, Srinivasan S (2014). Enhancement of flow-induced AP-1 gene expression by cyclosporin A requires NFAT-independent signaling in bone cells. *Cell Mol Bioeng* 7: 254-265

Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJM, and Hoenderop JGJ (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 4: 441-449

Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, Li M (2011). Egr-1 transactivates Bim gene expression to promote neuronal apoptosis. *J Neurosci* 31: 5032-5044

Yamamoto Y, Miyatsuka T, Sasaki S, Miyashita K, Kubo F, Shimo N, Takebe S, Watada H, Kaneto H (2017). Preserving expression of Pdx1 improves β -cell failure in diabetic mice. *Biochem and Biophys. Res. Communications* 483: 418-424

Yordy JS, Muise-Helmericks RC. (2000). Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 18;19(55):6503-13

Zamudio-Bulcock PA, Everett J, Harteneck C, and Valenzuela CF (2011) Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission at cerebellar Purkinje neurons from developing rats. *J Neurochem* 119:474-485.

Zsombok A and Derbenev A (2016). TRP Channels as Therapeutic Targets in Diabetes and Obesity. *Pharmaceuticals* 9, 50

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TD. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virology* , 73:2886-92.

Publikationen

Andrea Lesch*, Sandra Rubil* and Gerald Thiel. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *British Journal of Pharmacology* (2014) 171: 2645-2658

Andrea Lesch, Xin Hui, Peter Lipp, and Gerald Thiel. Transient Receptor Potential Melastatin-3 (TRPM3)-Induced Activation of AP-1 Requires Ca^{2+} Ions and the Transcription Factors c-Jun, ATF2, and Ternary Complex Factor. *Molecular Pharmacology* (2015) 87:617-628

Oliver G. Rössler, Andrea Lesch and Gerald Thiel. Combining fibroblast isolation with lentiviral gene transfer to validate transgene expression in mice following pronucleus infection. *Transgenic Research* (2016).

Andrea Lesch, Oliver G. Rössler, and Gerald Thiel. Extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase, and calcineurin regulate transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) induced activation. *Journal of Cellular Biochemistry* (2017).

Thiel G, Rubil S, Lesch A, Guethlein L, Rössler OG (2017). Transient receptor potential TRPM3 channels: Pharmacology, signaling, and biological functions. *Pharmacological Research*: 124:92-99.

Poster

Andrea Lesch, Gerald Thiel

Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and TCF

11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, März 18-21, 2015

International Meeting of the German Society for Cell Biology, Köln, Germany, März 24-27, 2015

3rd TRP Channel Meeting, Leuven, Belgium, September 16-18, 2015

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Denjenigen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thiel für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen und für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung und die Förderung bedanken, die er mir hat zukommen lassen.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Silke Wahl für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Danke an die gesamte AG Lipp für die gute Zusammenarbeit.

Danke auch an die AG Zimmermann und Markus Greiner für die Benutzung des Konfokalmikroskops.

Danke an die AG Menger, besonders an Christine Wittig und Janine Becker, für die Benutzung und Einweisung am Kryostat und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Danke an meine Kollegen Herrn Dr. Rößler, Isabelle Müller, Maximilian Backes, Sandra Rubil, Anja Beckmann, Iris Dlugosch und Karl Bach, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit. Vielen herzlichen Dank auch an Anke Kaufmann für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr, auch außerhalb des Labors.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Großeltern und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung. Sabrina, Kathrin und Jochen, danke, dass ihr jederzeit für mich da seid. Steven, danke für dein Verständnis.

Danke für Alles.....