

**TRPV6 und TRPM8:
Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Isabell Christine Erler

Saarbrücken

2006

Tag des Kolloquiums: 02.02.2007
Dekan: Prof. Dr. K. Hegetschweiler
Berichterstatter: Prof. Dr. V. Flockerzi
Prof. Dr. R. W. Hartmann

Meiner Familie

Je näher man dem Gipfel kommt, desto weiter die Sicht.
[Anonym]

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	4
3	SUMMARY	6
4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
5	EINLEITUNG	10
5.1	DIE TRP-FAMILIE.....	10
5.1.1	Die TRPC-Unterfamilie.....	14
5.1.2	Die TRPV-Unterfamilie.....	15
5.1.3	Die TRPM-Unterfamilie.....	18
5.2	ZIEL DIESER ARBEIT	20
6	MATERIAL	22
6.1	BEZUGSQUELLEN.....	22
6.2	ARBEITSMATERIALIEN.....	22
6.3	GERÄTE.....	23
6.4	CHEMIKALIEN.....	23
6.5	REAGENZIENSYSTEME.....	23
6.6	GRÖSSENSTANDARDS	23
6.7	KONSTRUKTLISTE.....	24
6.7.1	TRPV6-Konstrukte	24
6.7.2	TRPM8-Konstrukte	28
6.7.3	Sonstige Konstrukte.....	30
6.7.4	Oligonukleotide zur ABI-DNS-Sequenzierung	30
6.8	PLASMIDE	31
6.9	RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME	31
6.10	ANTIKÖRPER.....	32
6.11	BAKTERIENSTÄMME	32
6.12	ANTIBIOTIKA	33
6.13	DATENBANKEN UND COMPUTERPROGRAMME.....	33
7	METHODEN	34
7.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
7.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
7.1.2	Gezielte Punktmutagenese.....	35
7.1.3	Kolonien-PCR.....	36
7.1.4	Alkohol-Fällung von DNS.....	37
7.1.5	Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen	37
7.1.6	Dephosphorylierung von DNS durch Alkalische Phosphatase (AP/CIP).....	38
7.1.7	Phosphorylierung von DNS.....	38
7.1.8	Auffüllen von überhängenden Enden (Fill-in).....	39
7.1.9	DNS-Gelelektrophorese zur Aufreinigung und Analyse	39
7.1.10	Isolierung von DNS aus Gelen - Elektroelution	40
7.1.11	Ligation von DNS-Fragmenten	41
7.1.12	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	41
7.1.13	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Elektroporation von DNS	41
7.1.14	Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	42
7.1.15	Elektroporation von Plasmiden in kompetente Bakterien	42
7.1.16	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation).....	43

7.1.17	Plasmid-Präparation im präparativen Massstab (Maxi-Präparation).....	44
7.1.18	Sequenzieren von DNS.....	44
7.2	ÜBERSICHT: BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM.....	45
7.2.1	Plasmide und kompetente Bakterien.....	47
7.2.2	Transformation des pBTL- und pTRG-Plasmids in kompetente Bakterien.....	48
7.2.3	Präparation von pBTL und pTRG.....	48
7.3	BACTERIOMATCH [®] -SYSTEM.....	49
7.3.1	Herstellung des LB-CTCK-Agars für das Bacteriomatch [®] -System.....	49
7.3.2	Kotransformationsexperiment im Bacteriomatch [®] -System.....	49
7.4	BACTERIOMATCH [®] II-SYSTEM.....	50
7.4.1	Herstellung der Medien für das Bacteriomatch [®] II-System.....	50
7.4.2	Kotransformationsexperiment im Bacteriomatch [®] II-System.....	52
7.5	KONSTRUKTION EINER PLAZENTA-CDNS-BIBLIOTHEK ZUR DURCHSUCHUNG IM BACTERIOMATCH [®] -SYSTEM.....	52
7.6	DURCHSUCHUNG DER PLAZENTA-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH [®] -SYSTEM.....	55
7.7	AMPLIFIKATION EINER PANKREAS-CDNS-BIBLIOTHEK.....	57
7.7.1	Bakterienamplifikation in halbfestem Agar.....	57
7.8	DURCHSUCHUNG DER AMPLIFIZIERTEN PANKREAS-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH [®] II-SYSTEM.....	58
7.9	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	59
7.9.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	59
7.9.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	59
7.9.3	Ko-Immunpräzipitation von Proteinen.....	60
7.9.4	Proteinfällung.....	61
7.9.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
7.9.6	Coomassie-Färbung.....	62
7.9.7	Western-Blot Analyse.....	63
7.9.8	Sichtbarmachung des gebundenen Erstantikörpers mittels Chemolumineszenz.....	63
7.9.9	Wiederverwertung eines Blots.....	64
7.9.10	Proteinbestimmung mit dem BCA-Reagenz.....	64
7.9.11	Oberflächen-Biotinylierung.....	64
7.9.12	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	65
7.9.13	Präparation mikrosomaler Proteine nach Lockwich et al., 2000.....	67
7.9.14	Deglykosylierung von Glykoproteinen.....	67
7.10	MESSUNGEN DER TRPV6-STRÖME.....	68
8	ERGEBNISSE.....	69
8.1	TRPV6 HOMOMULTIMERISIERUNG.....	69
8.1.1	Untersuchung der homotypischen TRPV6-Interaktion durch Ko-Immunpräzipitation.....	70
8.1.2	Eingrenzung der Interaktionsstelle mit verkürzten TRPV6-Konstrukten.....	73
8.1.3	Homomultimerisierung verschiedener ANK-EGFP-Fusionsproteine.....	78
8.1.4	Deletion oder Austausch von Ankyrin-Repeats.....	79
8.1.5	Gezielte TRPV6-Punktmutagenese, Einschub und Austausch von 5 Aminosäureresten in ANK 3+4.....	82
8.1.6	Gesamtübersicht über gezielte Mutationen in der Region ANK 3/ANK 4.....	87
8.1.7	Oberflächen-Biotinylierung von TRPV6-EGFP-Fusionsproteinen.....	88
8.1.8	Dichtegradientenzentrifugation von TRPV6 und der TRPV6-Mutante M5.....	88
8.1.9	Dominant negative Effekte.....	89
8.1.10	TRPV6-Interaktionsstudien in Bakterien-Zwei-Hybrid-Systemen.....	92
8.2	TRPV6 HETEROMULTIMERISIERUNG.....	95
8.2.1	Klonierung verschiedener TRPV-Konstrukte zur Ko-Immunpräzipitation.....	95
8.2.2	Heterotypische Ko-Immunpräzipitation von TRPV6.....	96
8.3	SUCHE NACH TRPV6 INTERAKTIONSPARTNERN IM BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM.....	97
8.3.1	Durchsuchung einer Plazenta-cDNS-Bibliothek im Bacteriomatch [®] -System.....	97
8.3.2	Durchsuchung einer Pankreas-cDNS-Bibliothek im Bacteriomatch [®] II-System.....	99
8.4	TRPM8 HOMOMULTIMERISIERUNG.....	102
8.4.1	Untersuchung der Trpm8-TRPM8-Interaktion im Bacteriomatch [®] II-System.....	104
8.4.2	TRPM8 Ko-Immunpräzipitation.....	106
8.4.3	Dichtegradientenzentrifugation von EYFP-TRPM8 und der EYFP- ¹⁰⁸⁹ L/P-Mutante.....	109
8.4.4	TRPM8 ist ein Glykoprotein.....	110

9	DISKUSSION	112
9.1	TRPV6 KANN ÜBER AMINOTERMINALE ANKYRIN-REPEATS HOMOMULTIMERE BILDEN	112
9.1.1	Ankyrin-Repeats	113
9.1.2	Homotypische TRPV6-Interaktion.....	114
9.2	TRPV6-HETEROMULTIMERISIERUNG MIT ANDEREN TRPV-PROTEINEN.....	120
9.3	DURCHSUCHUNG VON CDNS-BIBLIOTHEKEN NACH NEUEN BINDUNGSPARTNERN VON TRPV6.....	121
9.4	FÜR DIE TRPM8-MULTIMERISIERUNG IST EINE COILED-COIL-DOMÄNE WICHTIG	123
9.4.1	TRPM8 Homomultimerisierung.....	123
9.4.2	Coiled-Coil-Domänen.....	124
9.4.3	Coiled-Coil-Domänen in Proteinen der TRPM-Unterfamilie	125
10	LITERATURVERZEICHNIS	127
10.1	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	127
10.2	ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN	127
11	DANKSAGUNG	136

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteine der TRP-Familie bilden Kationenkanäle, die an verschiedenen sensorischen und zellbiologischen Prozessen beteiligt sind. Strukturell zeigen sie eine Ähnlichkeit zu den Kaliumkanälen, die eine tetramere Struktur aufweisen (Yellen, 2002). Man nimmt deshalb an, dass sich jeweils vier monomere TRP-Proteine zu einem funktionellen tetrameren Ionenkanal zusammenlagern. Ein tetramerer Aufbau war zu Beginn dieser Arbeit nur für TRPV1 angedeutet worden (Kedei et al., 2001). Durch welche Interaktionsdomänen eine Multimerisierung vermittelt wird, und ob es phylogenetisch konservierte Signale und Mechanismen dafür gibt, war unbekannt. Da sich aber verschiedene Mitglieder der TRP-Familie hinsichtlich ihrer zytoplasmatischen Proteinmotive stark unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Tetramerisierungssignale unterschiedlich sind.

In dieser Arbeit wurden Homomultimerisierungsdomänen der beiden Proteine TRPV6 und TRPM8 identifiziert und untersucht und es wurde gezeigt, dass beide Proteine Tetramere bilden können. TRPV6 ist vermutlich an der intestinalen und transplazentalen Resorption von Kalzium beteiligt, TRPM8 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Kälteperzeption durch das somatosensorische System. Beide Kanäle zeigen außerdem eine verstärkte Expression in malignen Formen des Prostatakarzinoms (Fixemer et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004), und zumindest für TRPV6 scheint die verstärkte Kanalexpression mit einer verstärkten Proliferation zu korrelieren (Schwarz et al., 2006). Das Verständnis der jeweiligen Strukturen und Signale, die den funktionellen Kanal-Zusammenbau vermitteln, würde nicht nur erlauben das Zusammenlagern der TRP-Proteine zu Kanälen zu verstehen, sondern könnte zukünftig auch eine Bedeutung für die Entwicklung neuer Pharmaka haben.

Zur Identifizierung und Analyse der Proteindomänen wurden verschiedene Methoden eingesetzt: Die mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System verwandten Systeme Bacteriomatch[®] und Bacteriomatch[®]II wurden etabliert, weiterentwickelt und zur Analyse von homo- und heterotypischen Proteininteraktionen angewendet. Außerdem wurden markierte Ionenkanal-Fusionsproteine mit TRPV6 bzw. TRPM8 ko-immunpräzipitiert. Identifizierte Proteindomänen wurden anschließend gezielt mutiert und die mutierten Proteine auf ihre Fähigkeit untersucht, Proteinkomplexe und funktionelle Ionenkanäle zu bilden. Weiter wurden in dieser Arbeit Heteromultimerisierungen von TRPV6 mit anderen Mitgliedern der TRPV-Unterfamilie untersucht. In verschiedenen Experimenten konnte TRPV6 nicht mit TRPV2, TRPV3 und TRPV4 ko-immunpräzipitiert werden. Mit TRPV1 wurde dagegen eine schwache Interaktion beobachtet; TRPV5 wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Suche nach unbekanntem Interaktionspartnern von TRPV6. Da zu Beginn meiner Arbeit außer Calmodulin keine mit TRPV6 interagierenden Proteine bekannt waren, sollten neue Proteine, die mit dem TRPV6-Carboxyterminus interagieren, mit einem Bakterien-Zwei-Hybrid-System identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine cDNS-Bibliothek aus humaner Plazenta hergestellt und mit dem Bacteriomatch[®]-

System durchsucht; danach wurde eine cDNS-Bibliothek aus humanem Pankreas von Mensch mit dem Bacteriomatch[®]II-System durchsucht. Mit beiden Bibliotheken konnten jedoch keine spezifisch interagierenden Proteine gefunden werden.

3 SUMMARY

Proteins of the TRP family form cation channels involved in many different sensory and cellular processes. Regarding their structure, they display some similarities to voltage gated potassium channels, which exhibit a tetrameric structure (Yellen, 2002). It is thus assumed that four monomeric TRP proteins assemble to form a functional tetrameric ion channel. At the beginning of this work, a tetrameric structure was postulated only for TRPV1 (Kedei et al., 2001). It was unknown which interaction domains mediate a multimerisation and whether there are conserved signals and mechanisms for TRP channel assembly. The fact that cytoplasmatic protein motifs differ especially between members of different TRP family subgroups leads to the assumption that their tetramerisation signals are different.

In the framework of this thesis, homomultimerisation domains of the two TRP proteins TRPV6 and TRPM8 were identified and it was shown that both proteins can form tetramers. TRPV6 is most likely involved in intestinal and placental absorption of calcium, TRPM8 presumably plays a role in cold perception via the somatosensory system. Both ion channels are overexpressed in malignant forms of prostate cancer (Fixemer et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004), and at least in case of TRPV6, expression of TRPV6 transcripts seems to correlate with enhanced proliferation (Schwarz et al., 2006). Knowledge of structures and signals responsible for the assembly of functional channels would not only permit the understanding of the formation of TRP ion channels, but could also be of interest for the development of new pharmaceuticals.

Several methods were used to identify and analyse interacting protein domains: the two systems Bacteriomatch[®] and Bacteriomatch[®]II, which are conceptually similar to yeast two hybrid systems were established, refined and applied to analyse homo- and heterotypical protein interactions. Furthermore, tagged ion channel fusion proteins were co-immunoprecipitated with TRPV6 and TRPM8 respectively. After identification, protein interaction domains were mutated by directed point mutagenesis and tested for their ability to form protein complexes and functional ion channels. Moreover, heteromultimerisations of TRPV6 with other members of the TRPV-subfamily were investigated in the course of this thesis. In repeated experiments, TRPV6 could not be co-precipitated with TRPV2, TRPV3 and TRPV4, whereas there was a weak interaction with TRPV1; TRPV5 was not tested. Another aim of this thesis was the identification of unknown proteins interacting with TRPV6. Since there were no known proteins interacting with TRPV6 other than calmodulin when this thesis was started, a screen for new interaction partners with the carboxyterminal region of TRPV6 was performed using a bacterial two hybrid system. For this purpose, a cDNA library was synthesized from human placenta and screened by using the Bacteriomatch[®]-System; moreover, a cDNA library from human pancreas was screened by using Bacteriomatch[®]II-System. However, no real interacting partners for TRPV6 could be identified in either screen.

4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EINHEITEN UND GRÖSSEN

bp	Basenpaare
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Da	Dalton; ein Dalton entspricht einem Zwölftel der Masse eines ¹² C-Atoms
g	Gramm
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
mA	Milliampere
mM	Millimolar
M	Molar
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
ml	Milliliter
min	Minute
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Unit (Enzymaktivität)
V	Volt
% (v/v)	Volumen/Volumen (x ml/100 ml)
% (w/v)	Masse/Volumen (x g/100 ml)

SONSTIGE ABKÜRZUNGEN

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Adenosin
AK	Antikörper
AS	Aminosäurerest
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid
Ank	Ankyrin-Repeat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin
cDNS	Copy DNS
cfu	kolonienbildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CIP	Alkalische Phosphatase (<i>calf intestine phosphatase</i>)
Δ	“Deletion von”, so steht z.B. Δ 32 für die Deletion von 32 Aminosäureresten
dATP	Desoxyadenosin-5′ triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5′ triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5′ triphosphat

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5' triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Modifikation von GFP
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanosin
G-418	Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
HA	Hämagglutinin
HEK293	human embryonal kidney cells
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IRES	<i>internal ribosome entry-site</i> , Erkennungssequenz für das Ribosom
LB	Luria Bertani Nährmedium
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
PM	Porenmutante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-A ⁺	Polyadenyl-
Primer	Oligodesoxynukleotid
RNS	Ribonukleinsäure
RE	Restriktionsendonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	LB-Medium mit 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 0,4 % Glucose
S-pH	Superekliptisches pHluorin, pH-sensitive GFP-Variante
T	Thymidin
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit 0,1 % (w/v) Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
TRP	transientes Rezeptor Potential
TTP	Thymidin-5' triphosphat
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Uridin
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

Liste der Aminosäuren mit Abkürzungen

Name	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val
Leucin	L	Leu

5 EINLEITUNG

5.1 DIE TRP-FAMILIE

Die Familie der TRP Ionenkanäle besteht aus einer Gruppe von Kationenkanälen, die anfänglich durch ihre Verwandtschaft zum Ursprungsmitglied der Familie, dem TRP-Protein von *Drosophila melanogaster*, definiert wurden. Die Bezeichnung TRP stammt von einer *Drosophila melanogaster*-Mutanten, deren Photorezeptoren im Gegensatz zu Wildtyp-Photorezeptoren auf einen längeren Lichtreiz hin keine andauernde, sondern nur eine transiente Depolarisation zeigten (Cosens and Manning, 1969). Nach dem Phänomen des transienten Rezeptorpotentials wurde diese Mutante *trp*-Mutante („transient receptor potential“) genannt. Der dem Phänotyp zugrunde liegende Gendefekt wurde 1989 identifiziert (Montell and Rubin, 1989) und die Funktion des TRP-Proteins als Ionenkanal wurde erstmals 1992 von Hardie und Minke gezeigt. Seitdem wurden viele weitere TRP-Ionenkanäle identifiziert, oft durch Homologie-Vergleich von Sequenzen; sie wurden bisher in mehrzelligen Tieren und Pilzen gefunden, nicht aber in Grünpflanzen, Rotalgen, Protozoen und Bakterien (Wissenbach et al., 2004). Ausgehend von ihrer Sequenzhomologie werden die TRP-Kanäle in die sieben Unterfamilien TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPN und TRPML untergliedert; die drei größten Gruppen sind hierbei die TRPC-Gruppe („canonical“), welche am engsten mit *Drosophila* TRP verwandt ist; die TRPM-Gruppe, die nach dem Melastatin (TRPM1) benannt ist, und die TRPV-Gruppe, deren Bezeichnung vom Vanilloid-Rezeptor TRPV1 stammt. Die weiteren vier Gruppen sind die TRPP-Gruppe, deren Name sich vom Polycystin ableitet; die TRPML-Gruppe, wobei ML für Mucolipin (TRPML1) steht; die TRPA-Gruppe, die nach den zahlreichen aminoterminalen Ankyrin-Repeats ihrer Mitglieder benannt ist und als letzte Gruppe TRPN, welche bisher noch nicht in Säugetieren gefunden wurde und nur ein Mitglied hat. In Tabelle 1 ist die Anzahl der publizierten Mitglieder aller TRP-Unterfamilien des Menschen und einiger Tiere aufgeführt; der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 1 stellt den Verwandtschaftsgrad der Mitglieder der TRP-Familie untereinander graphisch dar.

TRP-Familie	Fliege	Wurm	Seescheide	Fisch	Maus	Mensch
TRP C	3	3	8	8	7	6
TRP V	2	5	2	4	6	6
TRP M	1	4	2	6	8	8
TRP A	4	2	4	1*	1	1
TRP N	1	1	1	-*	-	-
TRP P	4	1	9	2	3	3
TRP ML	1	1	1	4	3	3
gesamt	16	17	27	25	28	27

Tabelle 1: Übersicht über die TRP-Unterfamilien mit Angabe der Zahl ihrer (publizierten) Mitglieder. Für den Menschen sind nur 6 TRPC-Mitglieder angegeben, da TRPC2 beim Menschen ein Pseudogen ist. Fliege: *Drosophila melanogaster*, Wurm: *Caenorhabditis elegans*, Seescheide: *Ciona intestinalis*, Fisch: *Fugu rubripes*. * Im Gegensatz zum hier aufgeführten Fugu-Fisch wurden in *Danio rerio* (Zebrafisch) bisher 2 Mitglieder von TRPA und ein Mitglied von TRPN identifiziert (modifiziert nach V. Flockerzi).

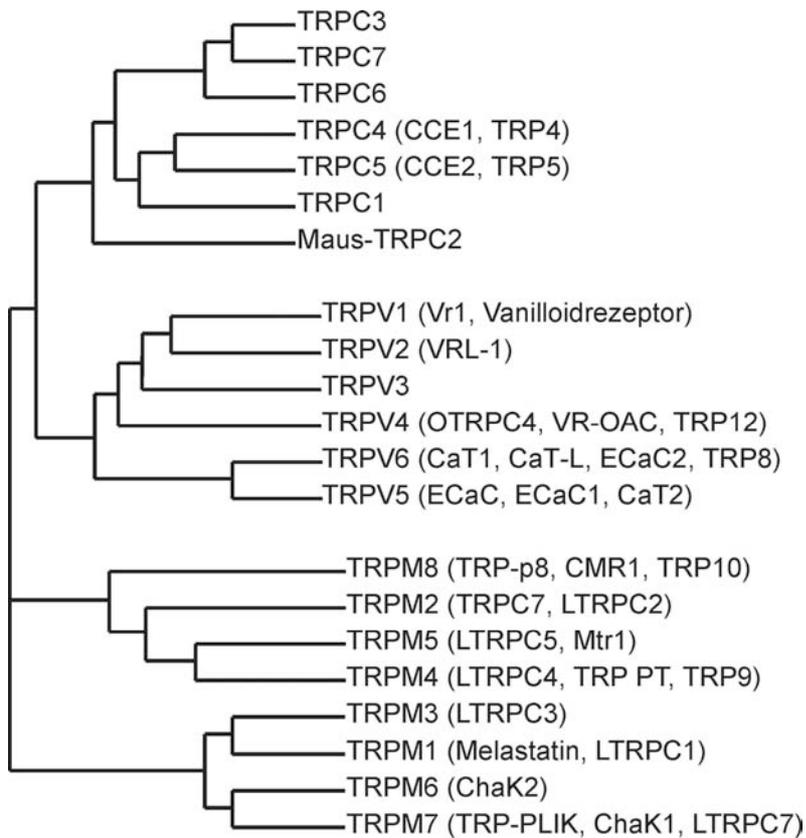


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der größten drei Untergruppen der TRP-Familie. In Klammern angegeben sind ältere Bezeichnungen der TRP-Mitglieder.

Die Mitglieder der TRP-Familie erfüllen viele Funktionen; so sind sie an sensorischen Vorgängen beteiligt, z.B. bei Invertebraten an der Photorezeption und auditorischen Wahrnehmung, bei Säugetieren an der Wahrnehmung von Wärme, Kälte, Schmerz und Geschmack. Häufig ist ihre Expression vornehmlich auf spezialisierte Zellen beschränkt; viele TRP-Proteine sind aber vermutlich auch für ubiquitäre Prozesse in nahezu allen Zellen wichtig, z.B. für die Wahrnehmung von osmotischem Stress, die Regulation der intrazellulären Magnesiumkonzentration oder die Erhaltung der Kalziumhomöotase (Hoenderop et al., 2005; Pedersen et al., 2005; Montell, 2005). TRP-Kanäle könnten auch in pathophysiologische Prozesse involviert sein, so sind z.B. Mutationen im TRPM6-Gen die Ursache für die Erbkrankheit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie (HSH) (Schlingmann et al., 2002); zudem sind einige TRP-Kanäle in bestimmten Tumoren überexprimiert. Hierbei kann die Expression entweder mit der Tumorprogression ansteigen, wie z.B. bei TRPV6 und TRPM8 im Falle des Prostatakarzinoms (Fixemer et al., 2003; Bidaux et al., 2005), oder aber auch herabreguliert sein, wie bei TRPM1 (Duncan et al., 2001). Die meisten TRP-Ionenkanäle sind permeabel für Kationen und mäßig spannungsabhängig. Viele TRP-Kanäle sind mehr oder weniger permeabel für Kalziumionen, mit Ausnahme der beiden Kanäle TRPM4 und TRPM5, welche nur

monovalente Kationen leiten und für Kalzium impermeabel sind. Dagegen sind die zwei Kanäle TRPV5 und TRPV6 hochselektiv für Kalzium (Nilius and Voets, 2005).

ALLGEMEINE STRUKTUR VON TRP-KANÄLEN

Bezüglich der allgemeinen Struktur der TRP-Kanäle gibt es folgende Gemeinsamkeiten: Alle TRP-Mitglieder haben vermutlich sechs Transmembrandomänen, als S1-S6 bezeichnet, mit einer putativen Porenregion zwischen Transmembrandomäne fünf und sechs. Die Amino- und Carboxytermini, deren Länge je nach Protein und Unterfamilie variiert, sind intrazellulär lokalisiert.

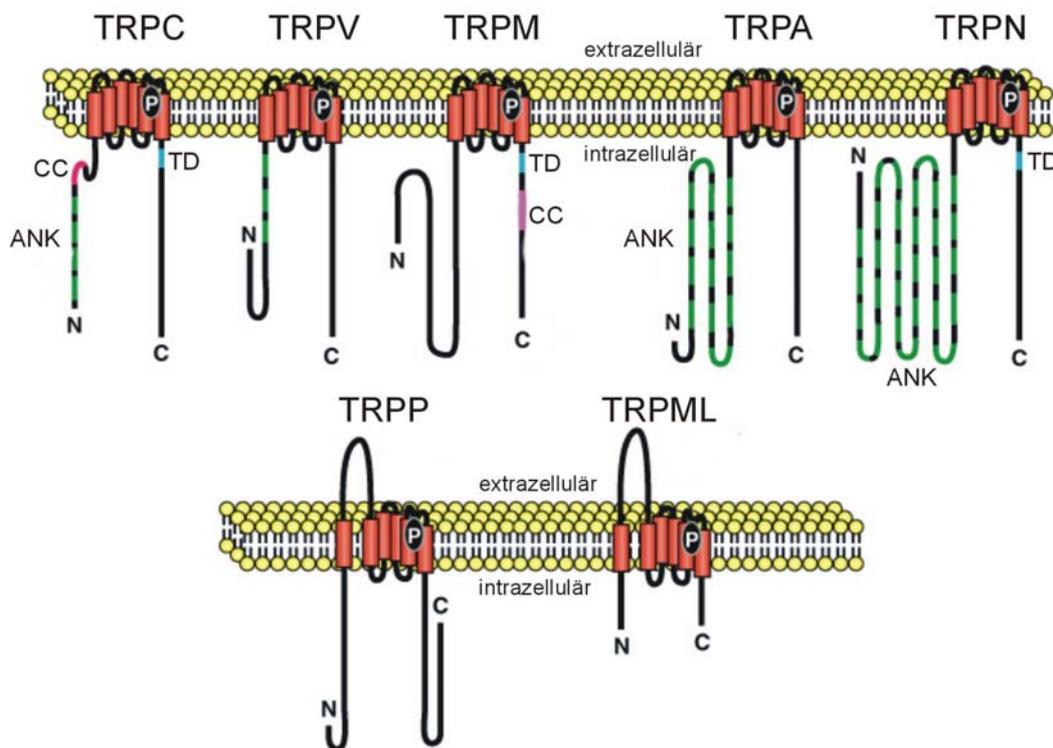


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Proteinstrukturen aller TRP-Unterfamilien am Beispiel jeweils eines Mitgliedes; gezeigt sind TRPC1, TRPV1, TRPM8*, TRPA1, TRPN1, TRPP2, TRPML1. Wichtige Strukturdomänen sind eingezeichnet: ANK, Ankyrin-Repeats; TD, TRP-Domäne; CC, Coiled-Coil; P, Porenregion; die Transmembrandomänen sind als rote Zylinder dargestellt, N steht für Aminoterminus, C für Carboxyterminus. *TRPM6/7 besitzen als einzige Mitglieder der TRPM-Unterfamilie eine carboxyterminale Proteinkinasedomäne, hier nicht gezeigt (modifiziert nach C. Montell 2005).

Im Gegensatz zu den klassischen spannungsabhängigen Kanälen fehlt den TRP-Kanalproteinen ein ausgeprägter Spannungssensor, welcher bei spannungsabhängigen Kanälen als Ansammlung regelmäßig angeordneter positiv geladener Aminosäurereste innerhalb der vierten Transmembrandomäne zu finden ist. In den drei Unterfamilien TRPC, TRPM und TRPN ist die TRP-Domäne, ein hinter der letzten Transmembrandomäne lokalisiertes Motiv, hochkonserviert. Es umfasst 23-25 Aminosäurereste und beginnt mit der Aminosäuresequenz „EWKFAR“, die genaue Funktion der TRP-Domäne ist noch nicht geklärt. In

der Unterfamilie TRPC sind im Aminoterminus drei bis vier Ankyrin-Repeats lokalisiert, gefolgt von einer Coiled-Coil-Domäne.

Bei den Ankyrin-Repeats handelt es sich um ein weit verbreitetes Strukturmotiv, welches vermutlich für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen wichtig ist. Ein einzelner Ankyrin-Repeat besteht aus 33 Aminosäureresten und enthält zwei α -Helizes, die antiparallel orientiert sind. Meist folgen mehrere Ankyrin-Repeat-Motive direkt aufeinander, dabei sind benachbarte ANK-Repeats durch hydrophobe Interaktionen ihrer α -Helizes modulartig aufeinandergepackt. Zusammen bilden sie eine superhelikale dreidimensionale Struktur aus (siehe auch Diskussion, Seite 113). Die Coiled-Coil-Domäne ist ein ubiquitär vorkommendes Proteinmotiv, welches ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann und aus einer α -Helix besteht, welche durch ein wiederholtes Muster von sieben Aminosäureresten („Heptade“) gekennzeichnet ist (siehe auch Diskussion, Seite 124).

Auch die TRPV-Kanäle enthalten aminoterminalen Ankyrin-Repeats, wobei die Anzahl von drei bis sechs, je nach Analyseverfahren und Protein, variieren kann. Ein gemeinsames Strukturmerkmal der TRPM-Gruppe ist neben der TRP-Domäne eine carboxyterminale putative Coiled-Coil-Region, die durch Sequenzanalysen mit dem Programm COILS (Lupas et al., 1991) bei allen TRPM-Mitgliedern außer TRPM5 gefunden wurde. Die beiden Unterfamilien TRPN und TRPA enthalten zahlreiche Ankyrin-Repeats im Aminoterminus; so werden für TRPA1 zwischen 14 und 17 Ankyrin-Repeats angegeben (Story et al., 2003; Corey et al., 2004), TRPN1 enthält 29 Ankyrin-Repeats (Sidi et al., 2003). In den Unterfamilien TRPP und TRPML ist zwischen den ersten beiden Transmembrandomänen eine ca. 200 Aminosäurereste umfassende Proteindomäne lokalisiert (Abbildung 2). Alle TRP-Strukturmerkmale wurden durch Analysen der Primärstrukturen mit geeigneten Algorithmen identifiziert, da bisher außer der carboxyterminalen Proteinkinasedomäne von TRPM7 (Yamaguchi et al., 2001) kein TRP-Protein kristallisiert wurde.

Zurzeit wird angenommen, dass TRP-Proteine als funktionelle tetramere Kanäle in der Plasmamembran vorliegen. Diese Annahme basiert auf dem Befund, dass TRP-Proteine Kationenkanäle ausbilden und eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Kaliumkanälen aufweisen, deren tetramere Struktur bereits aufgeklärt wurde (Yellen, 2002). Als diese Arbeit begonnen wurde, gab es allerdings nur Hinweise für eine tetramere Struktur von TRPV1. Die Struktur motive und Proteindomänen, welche für die Multimerisierung wichtig sein könnten, waren unbekannt.

Da sich diese Arbeit mit den beiden Proteinen TRPV6 und TRPM8 und ihrer homotypischen Interaktion beschäftigt, aber auch heterotypische Interaktionen innerhalb der TRPV-Unterfamilie untersucht wurden, folgt ein kurzer Überblick über die TRP-Unterfamilien mit Fokus auf bisher bekannte Homo- bzw. Heteromultimerisierungen.

5.1.1 DIE TRPC-UNTERFAMILIE

Die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie erfüllen verschiedene physiologische Funktionen. TRPC1 beispielsweise ist, assoziiert mit dem metabotropen Glutamatrezeptor mGluR₁, in Purkinje-Zellen wichtig für die Entstehung langsamer erregender postsynaptischer Leitfähigkeit (EPSC) (Kim et al., 2003). TRPC2 spielt bei Nagetieren eine Rolle bei der Wahrnehmung von Pheromonen (Liman et al., 1999). TRPC3 scheint im Gehirn an der durch BDNF (*brain-derived nerve growth factor*) vermittelten Differenzierung von Nervenzellen beteiligt zu sein (Li et al., 1999) sowie bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Philipp et al., 2003). TRPC4 scheint einerseits wichtig für die endothelabhängige Vasorelaxation zu sein (Freichel et al., 2001), andererseits für die Regulation mikrovaskulärer Permeabilität (Tiruppathi et al., 2002); für TRPC5 konnte gezeigt werden, dass es bei Hippocampus-Neuronen das Längenwachstum und die Morphologie von Wachstumskegeln der Axone beeinflussen kann (Greka et al., 2003). TRPC6 ist in die Erhaltung des Tonus glatter Gefäßmuskulatur involviert (Dietrich et al., 2005); die genaue Funktion von TRPC7 ist noch unklar. Die TRPC-Mitglieder der Säugetiere differieren zwar bezüglich ihrer Expressionsmuster, so ist beispielsweise TRPC1 ubiquitär vorhanden, TRPC6 dagegen findet sich vor allem in Lunge und Gehirn; aber alle TRPC-Kanäle sind im Gehirn exprimiert (Pedersen et al., 2005; Montell, 2005).

Bezüglich ihres Verwandtschaftsgrades bilden innerhalb der TRPC-Gruppe TRPC3/6/7 und TRPC4/5 Untergruppen. TRPC2 ist beim Menschen ein Pseudogen (Abbildung 1). Wie oben beschrieben, besitzen die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie gemeinsame Strukturmerkmale wie aminoterminal Ankyrin-Repeats und eine Coiled-Coil-Domäne sowie eine carboxyterminale TRP-Domäne.

Alle TRPC-Mitglieder können homomultimere Kanäle ausbilden (Hofmann et al., 2002), aber auch verschiedene heteromultimere Interaktionen wurden beschrieben; so können die Mitglieder der Untergruppe TRPC3/6/7 miteinander interagieren und TRPC1 mit TRPC4 oder TRPC5, wie im Gehirn der Ratte und in Überexpressionssystemen gezeigt werden konnte (Strubing et al., 2001; Strubing et al., 2003; Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Während in diesen Studien der Schwerpunkt nicht auf der Identifizierung von Interaktionsdomänen lag, wurde in einer anderen Studie untersucht, welche Domänen für die homotypische Interaktion der TRPC1- β -Isoform wichtig sind (Engelke et al., 2002). Deletionen der Ankyrin-Repeats oder der Coiled-Coil-Region der TRPC1- β -Isoform führten nicht zur Ausbildung funktioneller Kanäle, allerdings wurde nicht gezeigt, ob die Deletionskonstrukte auch unfähig zur Tetramerbildung waren. Für TRPC3 konnte ein dominant-negativer Effekt des TRPC3-Aminoterminus auf den durch oxidativen Stress induzierten Strom in Endothelzellen der Aorta festgestellt werden; vermutlich interagiert das aminoterminal TRPC3-Fragment mit den Wildtyp-TRPC3-Untereinheiten und vermindert so die Zahl funktioneller Kanäle (Balzer et al., 1999). Ob die oben beschriebenen TRPC-Heteromultimere physiologisch eine Rolle spielen, ist bislang unbekannt.

Die TRPC-Mitglieder sind von der Sequenz nahe Verwandte der TRP-Proteine aus *Drosophila*. Xu et al. untersuchten die drei *Drosophila*-TRP-Proteine TRP, TRPL und TRP- γ , welche vermutlich hauptsächlich Homomultimere bilden, es wurden aber auch Heteromultimere zwischen TRP und TRPL (Xu et al., 1997) und TRPL und TRP- γ identifiziert (Xu et al., 2000); für die Heteromultimerisierung scheint der Aminoterminus der Proteine wichtig zu sein.

5.1.2 DIE TRPV-UNTERFAMILIE

Alle TRPV-Proteine enthalten im Aminoterminus drei bis sechs Ankyrin-Repeats. TRPV1-4 bilden eine Gruppe thermosensitiver Kanäle. TRPV1, TRPV2 und TRPV3 sind stark in Neuronen der Spinalganglien exprimiert, TRPV4 wurde in vielen Geweben nachgewiesen, z.B. in Niere, Leber und Herz (Wissenbach et al., 2000; Nilius et al., 2004). TRPV3 und TRPV4 sind auch in Keratinozyten zu finden, wo sie als Temperatursensoren fungieren könnten (Chung et al., 2004).

TRPV1 ist ein Hitzesensor, der bei Temperaturen ab 43 °C und durch Capsaicin aktiviert wird (Caterina et al., 1997). Hitze oder Capsaicin bewirken eine spannungsabhängige Aktivierung des Kanals, indem sie die Aktivierungsschwelle in den Bereich physiologischer Potentiale absenken (Voets et al., 2004a). TRPV2 ist sensibel für Temperaturen ab 52 °C (Caterina et al., 1999); TRPV3 für Wärme von 30-39 °C (Peier et al., 2002); TRPV4 wird bei Temperaturen über 27 °C aktiviert und reagiert auf Veränderungen des Zellvolumens (Guler et al., 2002; Liedtke et al., 2000). Innerhalb der TRPV-Unterfamilie sind aufgrund der Sequenzhomologie TRPV1/2 und TRPV5/6 eng verwandt (Abbildung 1).

Im Gegensatz zu den ersten vier TRPV-Mitgliedern handelt es sich bei TRPV5 (früher ECaC1 oder CaT2 genannt) und TRPV6 (früher ECaC2, CaT1 oder CaT-L) nicht um thermosensitive, sondern um hochkalziumselektive epitheliale Ionenkanäle. Der Permeabilitätskoeffizient P_{Ca} / P_{Na} von TRPV5 liegt bei ca. 107 (Vennekens et al., 2000), der von TRPV6 bei ca. 130 (Yue et al., 2001). Die Proteinsequenzen von TRPV5 und TRPV6 weisen eine Ähnlichkeit von etwa 77 % auf. Da TRPV6 auf dem menschlichen Chromosom 7q33-34 vorliegt und TRPV5 in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 7q35, kann eine evolutionäre Genduplikation angenommen werden.

Beide Kanäle spielen vermutlich eine essentielle Rolle für den Kalziumhaushalt des Körpers: eine überlappende Expression von TRPV5 und TRPV6 wurde in den Epithelzellen des distalen Tubulus der Maus-Niere beobachtet (Hoenderop et al., 2003; den Dekker et al., 2003), wo die Kanäle möglicherweise für die Reabsorption von Kalzium wichtig sind (Nijenhuis et al., 2005), aber auch in der Plazenta sind TRPV5 und TRPV6 lokalisiert, sie könnten dort am Transport von Kalzium durch die Plazenta beteiligt sein (Muller et al., 2000; Wissenbach et al., 2001). Beim Menschen wurde TRPV6 außer in Trophoblasten und Synzytiotrophoblasten der Plazenta auch in den Azinuszellen des Pankreas und in Speicheldrüsen nachgewiesen, die Expression von TRPV6 korreliert zudem mit dem invasiven Wachstum von Tumoren der Prostata (Peng et al., 2000a; Wissenbach et al., 2001; Fixemer et al., 2003; Wissenbach et al., 2004). Im Dünndarm der Ratte wird TRPV6 exprimiert, es ist möglicherweise wichtig für die intestinale Kalziumaufnahme (Peng et al., 1999).

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN VON TRPV6

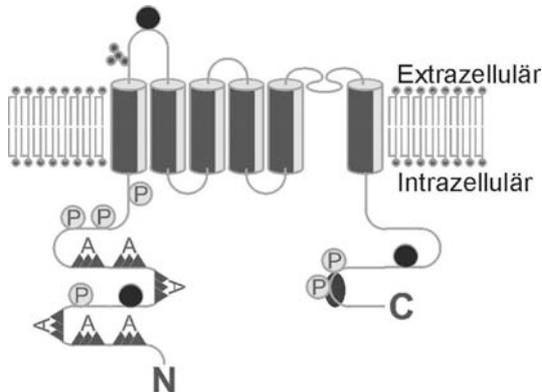


Abbildung 3: Aus der Primärstruktur vorhergesagte Membrantopologie und Proteinstruktur des TRPV6-Proteins. Zylinder: Transmembrandomänen S1-S6 mit Porenregion zwischen S5 und S6; A: Ankyrin-Repeats; verzweigte Struktur in extrazellulärer S1-S2-Schleife: N-Glykosylierungsseite an Position 358 des Proteins; P: Phosphorylierungsstellen; schwarze Punkte kennzeichnen die drei Positionen, an denen sich die allelischen Varianten TRPV6a und TRPV6b unterscheiden; schwarzes Oval: carboxyterminale Calmodulin-Bindungsstelle in hTRPV6 (modifiziert nach Wissenbach et al. 2001).

Das TRPV6-Protein von Mensch (hTRPV6) umfasst 725 Aminosäurereste, hat sechs vorhergesagte Transmembrandomänen (S1, S2, S3, S4, S5, S6) und eine Porenregion zwischen S5 und S6. Es existieren zwei allelische hTRPV6-Varianten, die sich in ihren Aminosäuresequenzen durch drei gekoppelte Polymorphismen unterscheiden: TRPV6a enthält an den Positionen 157, 378 und 681 die Aminosäurereste Arginin, Valin und Threonin, TRPV6b dagegen die Reste Cystein, Methionin und Methionin. Welche funktionellen Auswirkungen dieser Austausch hat, ist bisher noch nicht geklärt (Wissenbach et al., 2001). Bei TRPV6 handelt es sich um ein Glykoprotein mit Glykosylierungsstelle an Position 358 in der extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen S1 und S2 (Hirnet et al., 2003; Hoenderop et al., 2003); die unglykosylierte Form hat ein Molekulargewicht von ca. 79 kDa, die glykosylierte von ca. 88 kDa. Mit N-Glykosidase F konnten die Zuckerketten abgespalten werden, nicht aber mit Endoglykosidase H. Dies bedeutet, dass TRPV6 ein komplexes, „reifes“ Glykosylierungsmuster aufweist, wie es im Golgi-Apparat aus dem mannosereichen Glykosylierungsmuster des Endoplasmatischen Retikulums gebildet wird. Der Aminoterminus von TRPV6 enthält mehrere Ankyrin-Repeats, die Zahl der putativen Repeats variiert in der Literatur von vier (Peng et al., 2000b) bis sechs (Wissenbach et al., 2001). Diese Varianz kann durch Sequenzanalyseprogramme bedingt sein, so findet beispielsweise das Programm PFAM (Seite 33) bei TRPV6 drei ANK-Repeats, das Programm REP (Seite 33) dagegen fünf. Wahrscheinlich liegen sechs ANK-Repeats vor, eine Abbildung mit genauen Angaben wie Beginn und Ende der Ankyrin-Repeats mit Aminosäurerest-Nummern ist im Kapitel „Ergebnisse-TRPV6 Homomultimerisierung“ (Seite 69) gezeigt.

In heterologen Expressionssystemen bildet TRPV6 einen Kanal, der auch einwärts rektifizierenden Strom ermöglicht. Dieser Strom wird fast ausschließlich von Ca^{2+} getragen und erst in Abwesenheit aller extrazellulärer divalenter Kationen auch von monovalenten Kationen, insbesondere von Natrium (Peng et al., 1999). Die Mutation eines Aspartat-Restes an Position 541 in der Porenregion von TRPV6 von Maus macht diesen Kanal für Kalziumionen impermeabel (Voets et al., 2003). Die Mutation des entsprechenden

Aspartat-Restes bei TRPV6 von Mensch (⁵⁴²D/A) führt ebenfalls zur Bildung kalziumimpermeabler Kanäle. Diese ⁵⁴²D/A-Mutante wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung dominant-negativer Effekte genutzt. Für Strontium- und Bariumionen ist TRPV6 permeabel; bei Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes sinkt seine Leitfähigkeit für Kalziumionen (Peng et al., 1999; Peng et al., 2000b). Durch Ruthenium Rot kann TRPV6 blockiert werden (IC₅₀ ca. 9 µM), allerdings ist Ruthenium Rot ein besserer Blocker für TRPV5 (IC₅₀ ca. 100 nM) (Hoenderop et al., 2001). Auch Econazol blockiert TRPV5 und TRPV6 (Nilius et al., 2001b; Peng et al., 2003).

Ein TRPV6-Interaktionspartner, der schon zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt war, ist Calmodulin, ein ubiquitär vorkommendes Protein mit vier EF-Händen, welche als Helix-Loop-Helix-Motive je ein Kalziumion binden können. Calmodulin kann kalziumabhängig an eine Calmodulin-Bindungsstelle im hTRPV6-Carboxyterminus (Aminosäurereste 694-712) binden. Der TRPV6-Strom zeigt in Strommessungen zwei Phasen der Inaktivierung, eine erste schnelle Inaktivierung und eine darauf folgende, langsamere Inaktivierung. Mutation oder Deletion der carboxyterminalen Calmodulinbindungsstelle führen zur Aufhebung der langsameren Inaktivierung. Die Calmodulinbindungsstelle enthält auch eine Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierungsstelle; ist diese phosphoryliert, kann kein Calmodulin gebunden werden (Niemeyer et al., 2001). Für die erste, schnelle Inaktivierung scheinen bei TRPV6 von Maus drei Aminosäurereste in der intrazellulären S2-S3-Schleife eine Rolle zu spielen (Nilius et al., 2002). Auch für TRPV6 von Maus wurden Calmodulinbindungsstellen beschrieben (Hirnet et al. 2003; Lambers et al., 2004).

Da TRPV5 und TRPV6 hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind und es Hinweise auf ein überlappendes Expressionsmuster gibt, wurde untersucht, ob TRPV5/TRPV6-Heteromere funktionell sind. In Überexpressions-Systemen konnten konkatomere Tetramere mit unterschiedlichen Anteilen an TRPV5- und TRPV6-Untereinheiten untersucht werden, die hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften Mischtypen zwischen TRPV5 und TRPV6 darstellten (Hoenderop et al., 2003; den Dekker et al., 2003). Theoretisch könnten die Tetramerisierungsdomänen von TRPV5 und TRPV6 ähnlich oder identisch sein. Die Untersuchung der Tetramerisierungsdomänen von TRPV6 war u.a. eine Zielsetzung meiner Arbeit.

5.1.3 DIE TRPM-UNTERFAMILIE

Der Aminoterminus ist bei TRPM-Proteinen deutlich länger als bei TRPC- oder TRPV-Proteinen und enthält keine Ankyrin-Repeats. Der TRPM-Carboxyterminus enthält eine TRP-Domäne; die drei TRPM-Kanäle TRPM2, TRPM6 und TRPM7 sind an ihrem Carboxyterminus mit Enzymdomänen fusioniert und werden deshalb als *Chanzyms* bezeichnet. Für die TRPM-Unterfamilie werden zwar sechs Transmembrandomänen angenommen, allerdings ist die genaue Anzahl der Transmembranregionen in dieser Unterfamilie noch nicht endgültig geklärt. So wurden beispielsweise für TRPM7 sieben Transmembrandomänen angegeben (Nagamine et al., 1998); für TRPM8 wurden in einer Studie sieben Transmembrandomänen beschrieben (Tsavaler et al., 2001), in einer anderen Studie sechs bis acht (Peier et al., 2002).

TRPM2 wird stark im Gehirn exprimiert und enthält eine ADP-Ribosepyrophosphatase-Domäne (NUDT9), welche den Kanal aktiviert, indem sie NAD oder ADP-Ribose bindet (Perraud et al., 2001). TRPM6 und TRPM7 enthalten beide eine atypische Proteinkinase-Domäne und sind für Magnesiumionen sowie verschiedene andere divalente Kationen permeabel (Runnels et al., 2001; Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004b). Die Kinasedomäne von TRPM7 wurde bereits kristallisiert und analysiert (Yamaguchi et al., 2001), TRPM7 selbst kommt fast ubiquitär vor (Runnels et al., 2001). Beide Kanäle, TRPM7 und TRPM6, sind in der Niere koexprimiert, TRPM6 kommt außerdem im Dünndarm vor. Mutationen im TRPM6-Gen sind die Ursache für die Erbkrankheit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie (HSH) (Schlingmann et al., 2002). Ein funktioneller Knock-Out von TRPM7 in der DT-40 B-Zelllinie ist letal, was auf eine lebensnotwendige Funktion von TRPM7 in diesen Zellen hindeutet (Nadler et al., 2001). In der TRP-Familie sind die beiden Kanäle TRPM4 und TRPM5 die einzigen Kanäle, die kalziumaktiviert und nur für monovalente Kationen permeabel sind (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003; Hofmann et al., 2003). TRPM4 wird vor allem in Prostata, Dickdarm, Herz und Niere exprimiert (Xu et al., 2001); TRPM5 in Dünndarm, Leber, Lunge und Geschmacksrezeptorzellen, in welchen der Kanal in die Signalkaskade für bitter, süß und umami involviert ist (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003). TRPM1, auch Melastatin1 genannt, ist ein potentieller diagnostischer Marker, denn eine Herabregulierung der mRNA-Expression des Gens korreliert mit erhöhtem Metastasierungsrisiko und Aggressivität von Hauttumoren (Duncan et al., 1998; Duncan et al., 2001). Der nächste Verwandte zu TRPM1 ist TRPM3, welcher im Gehirn im Plexus choroideus und im Auge der Ratte nachgewiesen wurde; es existieren zahlreiche Spleißvarianten von TRPM3, deren Funktionen noch unbekannt sind (Oberwinkler et al., 2005).

TRPM8

In der TRPM-Unterfamilie ist TRPM8 (früher Trp-p8 oder CMR1 genannt) der einzige Kanal, der durch Kälte und Menthol aktiviert werden kann. Das TRPM8-Protein umfasst 1104 Aminosäurereste, davon bilden 693 den intrazellulär gelegenen Aminoterminus. Bei der Suche nach Strukturelementen im Aminoterminus berechnet der Struktur-Algorithmus COILS (Seite 33) zwar drei Coil-Bereiche, die zugehörigen errechneten

Wahrscheinlichkeitswerte sind allerdings so gering, dass Coiled-Coil-Sekundärstrukturen der drei Regionen unwahrscheinlich sind; ansonsten sind keine weiteren putativen aminoterminalen Strukturelemente bekannt. Der Carboxyterminus ist mit 127 Aminosäureresten recht kurz, er enthält eine TRP-Domäne und eine putative Coiled-Coil-Region (Aminosäurereste 1070-1104). Die TRP-Domäne von TRPM8 enthält möglicherweise eine Bindungsstelle für Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und könnte eine Rolle für die Regulation von TRPM8 spielen (Rohacs et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPM8 von Mensch ein Glykoprotein ist; als potentielle N-Glykosylierungsstellen in den extrazellulären Schleifen zwischen den Transmembrandomänen kommen zwei Asparaginreste an Position 821 oder 934 in Frage. TRPM8 wird stark in DRG-Neuronen exprimiert, auch in Trigeminalganglien und den Pilzpapillen der Zunge wurde es detektiert; ansonsten wurde seine Expression in einigen Karzinomen nachgewiesen, vor allem im Prostatakarzinom, aber auch in Tumoren der Brust, des Kolons und der Haut (Peier et al., 2002; Tsavaler et al., 2001; Abe et al., 2005). In elektrophysiologischen Studien wurde festgestellt, dass TRPM8 ein nichtselektiver, aber kalziumpermeabler Kationenkanal ist, dessen Aktivierung durch Kälte (23-28 °C) und Kältegefühle hervorrufende Substanzen wie Menthol, Icilin und Eukalyptol, ermöglicht wird (Peier et al., 2002; Voets et al., 2004a). Die Bindungsstelle für Icilin, welches viel stärker kühlend wirkt als Menthol, liegt bei TRPM8 von Ratte intrazellulär in der Schleife zwischen Transmembrandomäne S2 und S3; die drei Aminosäurereste Asparagin 799, Aspartat 802 und Glycin 805 sind dabei wichtig für die Bindung von Icilin an TRPM8 (Chuang et al., 2004).

HOMO- UND HETEROMULTIMERISIERUNGEN IN DER TRPM-UNTERFAMILIE

Innerhalb der TRPM-Unterfamilie stehen sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie TRPM1/3, TRPM4/5, TRPM2/8 und TRPM6/7 nahe. Die Bildung von Multimeren innerhalb der TRPM-Gruppe wurde bisher weniger untersucht als bei den TRPC- und TRPV-Proteinen. Es ist bislang nur eine Heteromultimerisierung von TRPM6 mit TRPM7 mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) nachgewiesen worden. Interessanterweise wurde diese Interaktion durch die Einführung der TRPM6-Mutation ¹⁴¹S/L, welche nativ bei Trägern der Erbkrankheit „Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie“ gefunden wurde, unterbunden. Dies lässt auf eine wichtige physiologische Rolle der Heteromultimere bei der Magnesiumaufnahme des menschlichen Körpers schließen (Chubanov et al., 2004). In FRET-Messungen konnte weiter gezeigt werden, dass TRPM8 von Mensch Homomultimere bilden kann; dabei wurde eine FRET-Effizienz von 15,3 % beobachtet, eine genauere Eingrenzung der Interaktionsdomänen allerdings nicht vorgenommen (Kaiser, 2004).

5.2 ZIEL DIESER ARBEIT

Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Homomultimerisierungsdomänen von TRPV6 bzw. TRPM8. Es sollte untersucht werden, ob sich TRPV6 bzw. TRPM8 zu Multimeren zusammenlagern und welche Motive oder Signale diesen Kanalzusammenbau vermitteln. Da beide Proteine unterschiedlichen TRP-Unterfamilien angehören und sich hinsichtlich ihrer Primärstrukturen unterscheiden, kann angenommen werden, dass die Multimerisierungsdomänen beider Proteine nicht identisch sind. Sowohl TRPV6 als auch TRPM8 bzw. ihre cDNS lassen sich gut in HEK- bzw. COS-Zellen exprimieren; die Untersuchung der homotypischen Protein-Protein-Interaktionen sollte mit dem Bakterien-Zwei-Hybrid-System oder durch Ko-Immunpräzipitation erfolgen. Die Identifizierung von Multimerisierungsdomänen kann zum besseren Verständnis des Zusammenbaus homomultimerer und heteromultimerer Kanäle beitragen.

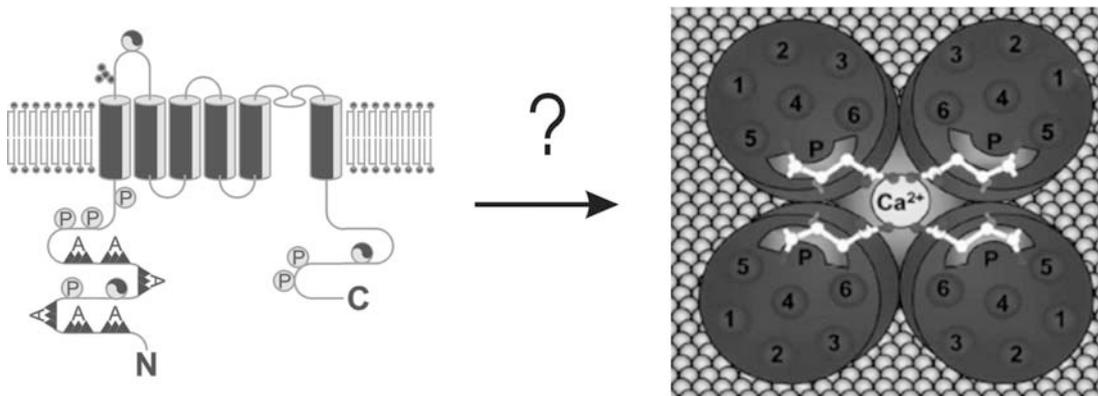


Abbildung 4: Eine der untersuchten Fragestellungen war die Identifizierung von Multimerisierungs-Domänen in TRPV6 und TRPM8. Es sind Modelle einer TRPV6-Untereinheit und eines tetrameren TRPV6-Kanals gezeigt (modifiziert nach Wissenbach et al. 2001 und den Dekker et al. 2003).

Auch Heteromultimerisierungen von TRPV6 mit anderen Mitgliedern der TRPV-Subfamilie sollten in dieser Arbeit durch Ko-Immunpräzipitation untersucht werden. Durch die Ausbildung von Heteromultimeren könnten Kanäle mit neuen Eigenschaften entstehen, wie Untersuchungen von TRPV5/6-Heteromultimeren zeigten (Hoenderop et al., 2003). Bisher wurde insbesondere die Bildung von homo- und heteromeren TRPC- und TRPV-Kanälen untersucht, es wurde allerdings nicht gezeigt, welche Proteindomänen für die Interaktionen wichtig sind (Amiri et al., 2003; Hellwig et al., 2005; Hoenderop et al., 2003; Hofmann et al., 2002; Kedei et al., 2001).

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Suche nach Interaktionspartnern von TRPV6. Da zu Beginn dieser Arbeit außer Calmodulin keine mit TRPV6 interagierenden Proteine bekannt waren, sollten neue Proteine, die mit dem TRPV6-Carboxyterminus interagieren mit den Bakterien-Zwei-Hybrid-Systemen der

Firma Stratagene identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine cDNS-Bibliothek aus humaner Plazenta mit dem Bacteriomatch[®]-System durchsucht, danach eine Bibliothek aus humanem Pankreas mit dem Bacteriomatch[®]II-System.

6 MATERIAL

6.1 BEZUGSQUELLEN

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

6.2 ARBEITSMATERIALIEN

Nitrozellulose-Membran:	Hybond N (Amersham Pharmacia)
Sterile Gefäße für Labor und Zellkultur:	Alle von Falcon (BD Biosciences)
Sterile Einmalpipetten für Labor/Zellkultur:	Serological pipettes (Sarstedt)
Elektroporations Küvetten:	Gene Pulser Cuvette 0,1/0,2 cm electrode gap (Biorad)
96-Lochplatten mit Filtrationseinheit:	Whatman Microplate Devices Unifilter (Whatman)
Sepharose zum Befüllen der Filterplatten:	Sephadex TM G-50 (Amersham Pharmacia)
Gestopfte Spitzen:	Filter Tip FT 20, 200 und 1000 (Greiner)
Petrischalen:	94 x 16 mm (Greiner)
	150 x 20 mm (Sarstedt)

6.3 GERÄTE

Zentrifugen:	L8-60M-Ultracentrifuge (Beckman) Optima™ MAX-E Ultracentrifuge (Beckman) Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf) J2-HS centrifuge (Beckman) 96-well Plattenzentrifuge 4-15C (Sigma)
Gelelektrophorese-Apparatur:	Biorad Model 3000 Xi (Bio-Rad)
Photometer:	Gene quant II (Pharmacia Biotech)
UV-Tisch	Transilluminator 4000 (Stratagene)
Schüttelwasserbad:	WB 14 (Memmert)
Kleinschüttler:	Vibrax-VXA (IKA)
Thermomixer:	Vortem 56 EVC (Uniequip)
Sicherheitswerkbank:	Kötterman 8511 (Köttermann)
Elektroporationsgerät:	Gene Pulser (Bio-Rad)
Thermocycler:	Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)
DNS Sequenzierapparat:	DNS Analyzer GENE READIR 4200 (Li-Cor) ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Fermenter:	Scientific Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
Pipetten:	Labmate (Abimed) Pipetman (Gilson)

6.4 CHEMIKALIEN

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

6.5 REAGENZIENSYSTEME

ABI Prism Big Dye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V 1.1 (Applied Biosystems)
DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-d-GTP (Amersham Pharmacia)
Eppendorf Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf)
Qiagen Plasmid Mini und Maxi Kit (Qiagen)
Rediprime II DNS Labelling System (Amersham Pharmacia)
Quik Change XL Kit (Stratagene)

6.6 GRÖSSENSTANDARDS

DNS-Größenmarker: 1 kb DNS Ladder (Invitrogen)
M9-Marker (Eigenherstellung, U. Wissenbach)
Prestained Proteinmarker (Peqlab)
Dual Color Proteinmarker (Bio-Rad)
Kaleidoscope Proteinmarker (Bio-Rad)
CJ-Proteinmarker (Eigenherstellung, C. Jung)

6.7 KONSTRUKTLISTE

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG oder Operon bezogen.

6.7.1 TRPV6-KONSTRUKTE

In Klammern sind entweder die Nummern der Aminosäurereste oder alternative Bezeichnungen angegeben.

Konstrukt	Oligonukletid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	T _m °C
pBTL [gly4ser]3-linker	BAN 115 for BAN 116 rev	GGCCGGCGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGC GGCTCTGGCGGCGGCGGCTCTGC GGCCGCAGAGCCGCCGCCAGAGCCG CCGCCGCCAGAGCCGCCGCCGCC	-, passt auf Not I	
C-Term/pBTL (582-725)	ban 115 for ban 117 rev	CCGAATTC CCGAGTGGCCCATGAGCG CCGCTCGAGTTAGATCTGATATCCAGCTC	EcoR I Xho I	58 56
C-Term/pTRG (582-725)	BAN 142 for ban 017 rev	CGGAATTCAGCGAGTGGCCCATGAGCG CGGCTCGAGGATCTGATATCCAGC	EcoR I Xho I	62 50
ANK 1-6/pTRG (1-328) Nf	ISE 03 for BAN 086 rev	CGGGATCCATGGGTTTGTCACTGCC CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	BamH I EcoR I	56 60
ANK 1-6/pBTL (1-328) Nf	ISE 05 for ISE 06 rev	CGGAATTCATGGGTTTGTCACTGCC CGGGATCCTTAGAAGTACGGCCGCCCG	EcoR I BamH I	56 52
ANK 1-4/pTRG (1-191) N1	ISE 03 for BAN 085 rev	CGGGATCCATGGGTTTGTCACTGCC CCGGAATTCGGCCCGGATGTCAGCTC	BamH I EcoR I	56 62
ANK 1-4/pBTL (1-191) N1	ISE 05 for ISE 07 rev	CGGAATTCATGGGTTTGTCACTGCC CGGGATCCTTAGGCCCGGATGTCAGCTC	EcoR I BamH I	56 58
ANK 5+6/pTRG (192-328) N2	ISE 04 for BAN 086 rev	CGGGATCCCAGGACTCCCTGGGAAAC CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	BamH I EcoR I	58 60
ANK 5+6/pBTL (192-328) N2	BAN 136 for ISE 06 rev	CGGAATTC CCGAGGACTCCCTGGGAAAC CGGGATCCTTAGAAGTACGGCCGCCCG	EcoR I BamH I	66 52
ANK 5+6-EGFP /pcDNA3 (192-328) N2	BAN 084Bfor BAN 086 rev	GGAAGCTTGCCGCCACCATGCAGGACTCCC TGGGAAAC CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	Hind III EcoR I	58 60
ANK 1+2/pBTL (1-115) N3	ISE 05 for BAN 137 rev	CGGAATTCATGGGTTTGTCACTGCC CGGGATCCTTAATAGAGCTCAGATGTCATG	EcoR I BamH I	56 54
ANK 1+2-EGFP /pcDNA3 (1-115) N3	BAN 083 for BAN 120 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCC CGGAATTCATAGAGCTCAGATGTCATGG	Hind III EcoR I	56 64
ANK 3-6-EGFP /pcDNA3 (116-328) N4	BAN 121 for BAN 086 rev	GGAAGCTTGCCACCATGGAGGGTCACTG CACTG CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	Hind III EcoR I	58 60
ANK 3-EGFP /pcDNA3 (116-163) N5	BAN 121 for BAN 123 rev	GGAAGCTTGCCACCATGGAGGGTCACTG CACTG CGGAATTC C C C C A A A G T A G A T G A G G T T	Hind III EcoR I	58 52
ANK 3/pTRG (116-163) N5	BAN 126 for BAN 123 rev	CGGGATCCGAGGGTCACTGCACTG CGGAATTC C C C C A A A G T A G A T G A G G T T	BamH I EcoR I	58 52
ANK 3/pBTL (116-163) N5	BAN 127 for BAN 123 rev	CGGAATTC C G A G G G T C A G A C T G C A C T G CGGAATTC C C C C A A A G T A G A T G A G G T T	EcoR I BamH I	62 52
ANK 4-EGFP /pcDNA3 (158-191) N6	BAN 122 for BAN 085 rev	GGAAGCTTGCCACCATGAACCTCATCTACT TTGGG CCGGAATTCGGCCCGGATGTCAGCTC	Hind III EcoR I	52 62
ANK 4/pTRG (158-191) N6	BAN 124 for BAN 085 rev	CGGGATCCAACCTCATCTACTTTGGG CCGGAATTCGGCCCGGATGTCAGCTC	BamH I EcoR I	52 62
ANK 4/pBTL (158-191) N6	BAN 125 for ISE 07 rev	CGGAATTC C A A C C T C A T C T A C T T T G G G CGGGATCCTTAGGCCCGGATGTCAGCTC	EcoR I BamH I	56 58
ANK 3+4-EGFP /pcDNA3 (116-191) N7	BAN 121 for BAN 085 rev	GGAAGCTTGCCACCATGGAGGGTCACTG CACTG CCGGAATTCGGCCCGGATGTCAGCTC	Hind III EcoR I	58 62

Konstrukt	Oligonukletid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
ANK 3+4/pTRG (116-191) N7	BAN 126 for BAN 085 rev	CGGGATCCGAGGGTCAGACTGCACTG CCGGAATTCGGCCCCGGATGTCAGCTC	BamH I EcoR I	58 62
ANK 3+4/pBTL (116-191) N7	BAN 127 for ISE 07 rev	CGGAATTCGAGGGTCAGACTGCACTG CGGGATCCTTAGGCCCGGATGTCAGCTC	EcoR I BamH I	62 58
N8-EGFP/pcDNA3 (255-725)	BAN 133 for BAN 135 rev	GGAAGCTTGCCGCCACCATGTTTCAGCACC TGATGC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
N8 c Δ32-EGFP /pcDNA3 (255-693)	BAN 133 for BAN 135 rev	GGAAGCTTGCCGCCACCATGTTTCAGCACC TGATGC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
N9-EGFP/pcDNA3 (330-725)	BAN 134 for BAN 135 rev	GGAAGCTTGCCGCCACCA ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	60 58
N9 c Δ32-EGFP /pcDNA3 (330-693)	BAN 134 for BAN 135 rev	GGAAGCTTGCCGCCACCA ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	60 58
¹¹² S/R /pCAGGS-IRES-GFP	BAN 129 for BAN 130 rev	CTCATAGAGCTCACGCGTCATGGGCTCAA GACC GAATTCCTCGAGCTCTGATC	Sac I Sac I	- -
¹¹² S/R c Δ32 EGFP/pcDNA3	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3+4/pCAGGS- IRES-GFP (Δ113-191) N10	BAN 131 for BAN 135 rev	ATCGACGCGTCAGGACTCCCTGGGAAAC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Mlu I EcoR V (½)	58 58
ΔAnk3+4-EGFP /pcDNA3 (Δ113-191) N10 b	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3+4 Δ32 EGFP/pcDNA3 (Δ113-191) N10 c	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3 /pCAGGS-IRES-GFP (Δ116-140) N11	BAN 140 for BAN 135 rev	ATCGACGCGTGAGCTCTATGCCAGTGTCTC TGCCAGAG ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Mlu I EcoR V (½)	62 58
ΔAnk3-EGFP /pcDNA3 (Δ116-140) N11b	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3 Δ32-EGFP /pcDNA3 (Δ116-140) N11c	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3+ /pCAGGS-IRES-GFP (Δ116-165) N12	BAN 141 for BAN 135 rev	ATCGACGCGTGAGCTCTATCCTTTGTCCTT TGCTGCCTG ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Mlu I EcoR V (½)	62 58
ΔAnk3+ EGFP/pcDNA3 (Δ116-165) N12 b	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk3+ Δ32 EGFP/pcDNA3 (Δ116-165) N12 c	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
ΔAnk 1+2-EGFP /pcDNA3 (116-725) N13 (s.N20)	BAN 121 for BAN 135 rev	GGAAGCTTGCCACCATGGAGGGTCAGACTG CACTG ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	58 58

Konstrukt	Oligonukletid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
ANK 1-3 EGFP/ pcDNA3 (1-163) N14b	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 123 rev	CGGAATCCCCAAAGTAGATGAGGTT	EcoR I	52
ANK 4-6 EGFP /pcDNA3 (158-328) N15b	BAN 122 for	GGAAGCTTGCCACCATGAACCTCATCTACT TTGGG	Hind III	52
	BAN 086 rev	CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	EcoR I	60
ANK 5/pTRG (192-230) N17	ISE 04 for	CGGGATCCCAGGACTCCCTGGGAAAC	BamH I	58
	BAN 155 rev	CGGAATTCCTGCAGGTGGTCCCCATG	EcoR I	60
ANK 6/pTRG (231-328) N18	BAN 156 for	CGGGATCCCCCTGGACCTCGTGCC	BamH I	56
	BAN 086 rev	CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	EcoR I	60
N19 /pTRG (280-328)	BAN 157 for	CGGGATCCCTCACAGAGATCGACTCC	BamH I	56
	BAN 086 rev	CCGGAATTCGTACGGCCGCCCGTACC	EcoR I	60
ANK 2 (78-95) für N11/pCAGGS- IRES-GFP	BAN 158 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATATGGGGGAAAC AGCGCTA	Mlu I	56
	BAN 160 rev	ATCGACGCGTGGCGGCCTCCAGGTTGTC	Mlu I	58
N11xAnk2 Δ32 EGFP/pcDNA3	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
¹³⁸ AR ¹³⁹ /EA- EGFP/pcDNA3	BAN 170	GGTGCAGCCCTGCTTGAGGCCAGGGCCAG TGCTCTGC	-	
	BAN 171	GCAGAGACACTGGCCCTGGCCTCAAGCAGG GCTCGCACC	-	
ANK 4 (163-187) für N11/pCAGGS- IRES-GFP	BAN 159 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGGGGAGCACCC TTTGTC	Mlu I	62
	BAN 161 rev	ATCGACGCGTAGCTCCATGCTCAATGAG	Mlu I	54
N11xAnk 4 Δ32 EGFP/pcDNA3	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
M5/pCAGGS-IRES- GFP (ANK 3 Δ5AS in N11)	BAN 172 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGAGGGTCAGAC TGCACTG	Mlu I	84
	BAN 174 rev	ATCGACGCGTGGCTCGCACCAGGTTTCATG	Mlu I	62
M5 Δ32-EGFP/ pcDNA3 (ANK 3 Δ5AS c)	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
+5/pCAGGS-IRES- GFP (ANK 3+TRELY in N11)	BAN 172 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGAGGGTCAGAC TGCACTG	Mlu I	84
	BAN 173 rev	ATCGACGCGTCTGCGGGCAAGCAGGGC	Mlu I	64
+5 Δ32-EGFP /pcDNA3 (ANK 3+ TRELY c)	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
M5'/pCAGGS-IRES- GFP (ANK 3 linker M5 in N12)	BAN 172 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGAGGGTCAGAC TGCACTG	Mlu I	84
	BAN 176 rev	ATCGACGCGTGATGAGGTTGCAGGGACTAC	Mlu I	62
M5'Δ32-EGFP /pcDNA3(ANK 3 linker M5 c)	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
+5'/pCAGGS-IRES- GFP (ANK 3 linker +TRELY in N12)	BAN 172 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGAGGGTCAGAC TGCACTG	Mlu I	84
	BAN 175 rev	ATCGACGCGTGTGCTCCCCAAAGTAGATG	Mlu I	58
+5' Δ32-EGFP/ pcDNA3 (ANK 3 linker +TRELY c)	BAN 083 for	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC	Hind III	56
	BAN 135 rev	ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58

Konstrukt	Oligonukletid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
+5p2/ pCAGGS-IRES-GFP (Ank 4 +ELYTR in N10)	BAN 172 for	ATCGACGCGTGAGCTCTATGAGGGTCAGAC	Mlu I	84
	BAN 177 rev	TGCACTG ATCGACGCGTATAGAGCTCGGCCCGGATGT CAGCTC	Mlu I	84
+5p2 Δ32-EGFP /pcDNA3 (Ank 4 +ELYTR c)	BAN 083 for BAN 135 rev	GGAAGCTTACCATGGGTTTGTCACTGCCC ATCGTCCTTAGGGGTCATG	Hind III EcoR V (½)	56 58
Maus-γ1 zur Fusion mit N3- bzw. N7-EGFP	BAN 152 for BAN 153 rev	GGCCAATTGATGTCACAGACCAAAACAG GGCCAATTGGTGCTCTGGCTCAGCG	Mfe I Mfe I	54 54
ΔAnk 1+2 Δ32-EGFP /pcDNA3 (116-693) N20	BAN 121 for	GGAAGCTTGCCACCATGGAGGGTCAGACTG	Hind III	58
	BAN 135 rev	CACTG ATCGTCCTTAGGGGTCATG	EcoR V (½)	58
¹⁵³ RR ¹⁵⁴ /QP-EGFP/pcDNA3	BAN 190 for	CAGGCACTGCCTTCCAGCCTAGTCCCTGCA	-	114
	BAN 191rev	ACCTC GAGGTTGCAGGGACTAGGCTGGAAGGCA GTGCCTG	-	114
ANK 4+5/pTRG (158-230) N21	BAN 124 for	CGGGATCCAACCTCATCTACTTTGGG	BamH I	52
	BAN 155 rev	CGGAATTCCTGCAGGTGGTCCCCATG	EcoR I	60
ANK 4+5/ ¹⁹¹⁺ ELYTR/ pTRG (158-230) N21+5	BAN 124 for	CGGGATCCAACCTCATCTACTTTGGG	BamH I	52
	BAN 155 rev	CGGAATTCCTGCAGGTGGTCCCCATG	EcoR I	60
ANK 4-6/pTRG (158-328) N22	BAN 124 for	CGGGATCCAACCTCATCTACTTTGGG	BamH I	52
	BAN 086 rev	CCGGAATTCGTACGGCCGCCGTACC	EcoR I	60
Ank 4-6/ ¹⁹¹⁺ ELYTR/ pTRG (158-328) N22 +5	BAN 124 for	CGGGATCCAACCTCATCTACTTTGGG	BamH I	52
	BAN 086 rev	CCGGAATTCGTACGGCCGCCGTACC	EcoR I	60
⁵⁴² D/A- ⁵⁴⁸ N/D (2PM) EGFP /pcDNA3	BAN 192 for	GGCCCAGCCAACACTACGACGTGGACCTGCC	-	102
	BAN 193 rev	GGGCAGGTCCACGTCGTAGTTGGCTGGGCC	-	102
hTRPV6/pEYFP-N1		TRPV6 aus hTRPV6 EGFP/pcDNA3 ausgeschnitten und in pEYFP-N1 ligiert	Hind III EcoRI	
hTRPV6/pECFP-N1		TRPV6 aus hTRPV6 EGFP/pcDNA3 ausgeschnitten und in pECFP-N1 ligiert	Hind III EcoRI	
¹³⁶ LL ¹³⁷ /TR-EGFP/pcDNA3	BAN 197 for	GAACCTGGTGCGAGCCACGCGTGCCCCGAG	-	126
	BAN 198 rev	GGCCAG CTGGCCCTGCGGGCACGCGTGGCTCGC ACCAGGTTCC	-	126
mTRPV6 R-pHluorin /pCAGGS M2	mCAT 46 for	GCTCTAGAGCGATATCCTCGAGGCCGCCACC	Xho I	58
	BAN 223 rev	ATGGGGTGGTCCCTGCC CGGATATCGATCTGGTACTCCCAGCCC	EcoR V	62

6.7.2 TRPM8-KONSTRUKTE

In Klammern sind die Nummern der Aminosäurereste angegeben.

Konstrukt	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
N-Terminus/pBTL (1-694) Nf	Isa 1 for	CGGGATCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	BamH I	58
	Isa 2 rev	CGGGATCCTCTTCCAGTTCTTGGTGTC	BamH I	56
N-Terminus/pTRG (1-694) Nf	Isa 1 for	CGGGATCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	BamH I	58
	BAN 216 rev	CCGCTCGAGCTTCCAGTTCTTGGTGTC	Xho I	54
C-Terminus /pTRG bzw. pBTL (978-1104) Cf	Isa 3 for	CGGGATCCATGTTTGGCTACACGGTGG	BamH I	58
	Isa 4 rev	CGGGATCCTTATTTGATTTTATTAGCAATCTC	BamH I	58
C1/pTRG (978-1046)	Isa 3 for	CGGGATCCATGTTTGGCTACACGGTGG	BamH I	58
	BAN 214 rev	CGGAATTCTTATTTGAAAACAGCAGACAGAAG	EcoR I	56
C2/pBTL (1047-1104)	BAN 215 for	CGGAATTCCAATGAAGACAATGAGACTCTGG	EcoR I	62
	Isa 4 rev	CGGGATCCTTATTTGATTTTATTAGCAATCTC	BamH I	58
C3/pTRG (978-1086)	Isa 3 for	CGGGATCCATGTTTGGCTACACGGTGG	BamH I	58
	BAN 217	GGAATTCATTATCCAGTTGTCTAAATCGATG	EcoR I	58
C4/pBTL (1006-1104)	BAN 218 for	GGAATTCAGCCGCTCAATATCCCC	EcoR I	58
	Isa 4 rev	CGGGATCCTTATTTGATTTTATTAGCAATCTC	BamH I	58
C5/pTRG (978-1066)	Isa 3 for	CGGGATCCATGTTTGGCTACACGGTGG	BamH I	58
	BAN 219 rev	GGAATTCATTCTTGACAAGGTAGTTTTCTT	EcoR I	56
C6/pBTL (1026-1104)	BAN 220 for	GGAATTCCAAGTGCTTCAAGTGTTGCTG	EcoR I	58
	Isa 4 rev	CGGGATCCTTATTTGATTTTATTAGCAATCTC	BamH I	58
N1/pTRG (1-400)	Isa 1 for	CGGGATCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	BamH I	58
	BAN 221 rev	GGAATTCATTCCCAGCTTCTTCCATTTAA	EcoR I	58
N2 a/pBTL (401-513)	BAN 222 for	GGAATTCGGATGAAATTGTGAGCAATGC	EcoR I	56
	Isa 2 rev*	CGGGATCCTCTTCCAGTTCTTGGTGTC	EcoR I	56
*Aus PCR-Fragment 401-694 (N2) entsteht durch interne EcoR I-Schnittstelle (Basenpaare 1539-1544) N2a				
N2 a/pTRG (401-513)	BAN 230 for	CGGGATCCGATGAAATTGTGAGCAATGC	BamH I	56
	BAN 232 rev	CCGCTCGAGCTTGGCGATCTGCAGATTC	Xho I	58
N2 b/pBTL (514-694)	BAN 222 for*	GGAATTCGGATGAAATTGTGAGCAATGC	EcoR I	56
	Isa 2 rev	CGGGATCCTCTTCCAGTTCTTGGTGTC	BamH I	56
*Aus PCR-Fragment 401-694 (N2) entsteht durch interne EcoR I-Schnittstelle (Basenpaare 1539-1544) unter Erhaltung des richtigen Leserahmens N2b.				
N2 b/pTRG (514-694)	BAN 231 for	CGGGATCCAATTCCTATAATGATGCCCTC	BamH I	58
	BAN 260 rev	CGGAATTCCTTCCAGTTCTTGGTGCTCTC	EcoR I	60
TRPM8/pEYFP-C1 (1-1104) M8 fl	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 225 rev	GGGATATCTCATTGATTTTATTAGCAATC TCTTTC	EcoR I	62
TRPM8/pQM/E2tag (1-1104) M8 fl	UW 453 for	ATGTCCTTTTCGGGCAGCC	-	58
	BAN 225 rev	GGGATATCTCATTGATTTTATTAGCAATC TCTTTC	EcoR V	62
M8 Δ18/pEYFP-C1 (1-1086)	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 226 rev	GGGATATCTCAATCCAGTTGTCTAAATCGATG	EcoR V	62
M8 Δ18/pQM/E2tag (1-1086)	UW 453 for	ATGTCCTTTTCGGGCAGCC	-	58
	BAN 226 rev	GGGATATCTCAATCCAGTTGTCTAAATCGATG	EcoR V	62
M8 ΔCT/pEYFP-C1 (1-977)	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 233 rev	GATATCTCAGGCGACCAGCAGGTTGAC	EcoR V	60
M8 ΔC6/pEYFP-C1 (1-1025)	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCTTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 234 rev	GATATCTCACTTCACCACCATGTAGAA	EcoR V	56
M8 ΔNT/pEYFP-C1 (695-1104)	BAN 235 for	CCGCTCGAGCCATTATCCTGTGTCTGTTTA TTATAC	Xho I	64
	BAN 225 rev	GGGATATCTCATTGATTTTATTAGCAATC TCTTTC	EcoR V	62

Konstrukt	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
M8 TM/pEYFP-C1 (695-977)	BAN 235 for	CCGCTCGAGCCATTATCCTGTGTCTGTTA TTATAC	Xho I	64
	BAN 233 rev	GATATCTCAGGCGACCAGCAGGTTGAC	EcoR V	60
M8 N-Term/ pEYFP-C1 (1-694) NT	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCCTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 246 rev	TCACTTCCAGTTCTTGGTGTCTC	-	60
M8 NT ΔN2b/pEYFP-C1 (1-513)	BAN 224 for	CCGCTCGAGCCATGTCCTTTCGGGCAGCC	Xho I	58
	BAN 247 rev	TCACTTGGCGATCTGCAGATTCC	-	62
TRPM8-SpHluorin /pCAGGS M2 (1-1104) M8 fl	UW 425 for	CCGGAATTCGCCGCCACCATGTCCTTTCGGGC AGCC	EcoR I	58
	UW 447 rev	TTTGATTTTTATTAGCAATCTCTTTCAG	-	68
M8 ΔCT-SpHluorin /pCAGGS M2 (1-977)	UW 425 for	CCGGAATTCGCCGCCACCATGTCCTTTCGG GCAGCC	EcoR I	58
	BAN 262 rev	GGCGACCAGCAGGTTGAC	-	60
M8 N-Term-SpHluorin/pCAGGS M2 (1-694) NT	UW 425 for	CCGGAATTCGCCGCCACCATGTCCTTTCGG GCAGCC	EcoR I	58
	BAN 263 rev	CTTCCAGTTCTTGGTGTCTC	-	60
M8 NT ΔN2b-SpHluorin/pCAGGS M2 (1-513)	UW 425 for	CCGGAATTCGCCGCCACCATGTCCTTTCGG GCAGCC	EcoR I	58
	BAN 264 rev	CTTGGCGATCTGCAGATTCC	-	58
M8 ¹⁰⁸⁹ L/P-Mutante	BAN 274 for	GACAACTGGATACAAAGCCTAATGATCTCAA GGGTCTC	-	112
	BAN 275 rev	GAAGACCCTTGAGATCATTAGGCTTTGTATCC AGTTGTC	-	112

6.7.3 SONSTIGE KONSTRUKTE

Konstrukt	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Tm °C
rTRPV1-EGFP /pcDNA3	BAN 180 for	GGAAGCTTGCCACCATGGAACAACGGGCT	Hind III EcoR I	56 60
	BAN 181 rev	CGGAATTCTTTCTCCCCTGGGACCATG		
rTRPV1- ²²⁰ LV ²²¹ /TR-EGFP/pcDNA3	BAN195Afor	GACGCTGGTGACCCTCACGCGGGAGAATGG	-	116
	BAN 196 rev	CTGCTCCATTCTCCCGGTGAGGGTCACCAG CGTC		
rTRPV1/pEYFP-N1	-	TRPV1 aus rTRPV1 EGFP/pcDNA3 ausgeschnitten und in pEYFP-N1 ligiert	Hind III EcoRI	
rTRPV1/pEYFP-N1	-	TRPV1 aus rTRPV1 EGFP/pcDNA3 ausgeschnitten und in pEYFP-N1 ligiert	Hind III EcoRI	
mTRPV2/pEYFP-N1	BAN 201 for	CCGCTCGAGCTGCCATGACTTCAGCCTCCA	Xho I EcoR I	54 56
	BAN 202 rev	AC CGGAATTCGGTGGGACTGGAGGACCT		
rTRPV2/pEYFP-N1	BAN 203 for	CTAGCTAGCGCCACCATGACTTCAGCCTCC	Nhe I Xho I	56 58
	BAN 204 rev	AGCCC CCGCTCGAGGGGGGACTGGAGGACCT		
mTRPV3/pEYFP-N1	BAN 205 for	CCCAAGCTTTGGCCACCATGAATGCCCACT	Hind III BamH I	54 56
	BAN 206 rev	CCAAG CGCGGATCCCCACCGACGTTTCTGGGAA		
mTRPV4/pEYFP-N1	BAN207Afor	CCCAAGCTTTGGCCACCATGGCAGATCCTGG	Hind III BamH I	54 54
	BAN 208 rev	TGAT CGCGGATCCCCAGTGGGGCATCGTCC		
mTRPV5 /pCAGGS IRES GFP	UW 443N for	GCGATATCGCCGCCATGGGGGCTAAAACT	EcoR V EcoR V	64 56
	UW 444N rev	CCTGG GCGATATCTCAGAACTGGTAGATCTCTTCC		
Maus-γ1-Untereinheit von Ca _v 1.1	BAN 152 for	GGCCAATTGATGTCACAGACCAAAACAG	Mfe I Mfe I	54 54
	BAN 153 rev	GGCCAATTGGTGCTCTGGCTCAGCG		

6.7.4 OLIGONUKLEOTIDE ZUR ABI-DNS-SEQUENZIERUNG

Plasmid / DNS Sequenz	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5' → 3'	Tm °C
pBTL	pBTL for2 abi	AGTACCCAATGATCCCATGC	60
pBTL	pBTL2 rev abi	ATACAGATGTAGGTGTTCCAC	60
pTRG	pTRG for 2	GTCGTGCGGCAACCATTC	58
pTRG	BAN 145 (pTRG rev)	GATTCGTGCCCCGCCATA	58
pCAGGS	pCAGGS for	AACGTGCTGGTTATTGTGC	56
pCAGGS	pCAGGS rev	ACCTTCTGATAGGCAGCC	56
pcDNA3	pRC for	CTAGAGAACCCACTGCTT	54
pcDNA3	pRC rev	GCACAGTCGAGGCTGATC	58
pEYFP-C1	PEYFPC1_rev	CAGGTTAGGGGGAGGTG	60
EBFP/ECFP /EGFP/EYFP	EGFP-N-Primer Kontrolle des Übergangs zum C-terminalen-EGFP	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCA	72
EBFP/ECFP /EGFP/EYFP	EGFP-C-Primer Kontrolle des Übergangs zum N-terminalen-EGFP	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	68
S pH reverse C-terminal	aus SpH, Kontrolle des Übergangs zum C-terminalen S-pHluorin	GTGCCATTAACATCACCATC	62

6.8 PLASMIDE

BAKTERIEN ZWEI-HYBRID-SYSTEM

pTRG (Stratagene)
pBT (Stratagene)
pBTL (pBT modifiziert mit (Gly₄Ser)₃-Linker)

EXPRESSIONSPLASMIDE

pCAGGS (J. Miyazaki)
pcDNA3 (Invitrogen)
pEYFP-N1 (BD Biosciences)
pEYFP-C1 (BD Biosciences)
pECFP-N1 (BD Biosciences)
pUC 18 (Fermentas)

6.9 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME

RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Restriktionsenzyme wurden mit Ausnahme von SstI (Invitrogen) von New England Biolabs bezogen.

MODIFIZIERENDE ENZYME

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Roche)
Pfu (Proofreading Polymerase) (Stratagene)
Pfu Turbo (Proofreading Polymerase) (Stratagene)
Pfu (Eigenherstellung, S. Buchholz)
Proteinase K (Peqlab)
RNase A (Sigma)
T4-DNS-Polymerase (Roche)
T4-DNS-Ligase (New England Biolabs)
T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs)
Taq-Polymerase (Eigenherstellung, S. Buchholz)

6.10 ANTIKÖRPER

IN DER ARBEITSGRUPPE HERGESTELLT

Gegen hTRPV6 gerichtet:

ab429, polyklonal (Kaninchen), affinitätsgereinigt
 mab 20C6, monoklonal (Maus), affinitätsgereinigt
 mab 26B3, monoklonal (Maus), affinitätsgereinigt

Gegen hTRPM8 gerichtet:

ab797, polyklonal (Kaninchen), affinitätsgereinigt

VON KOMMERZIELLEN ANBIETERN

anti-GFP (monoklonal) 0,4 mg/ml; Gemisch der Maus-Klone 7.1 und 13.1

ANTI-KÖRPERKONJUGATE

anti-mouse IgG (H+L), Alkaline Phosphatase Conjugate (Promega), zur Detektion von Maus Immunglobulinen

anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific F(ab')₂ fragment (from donkey) (Amersham Pharmacia), zur Detektion von Kaninchen-Immunglobulinen

6.11 BAKTERIENSTÄMME

XL1-Blue subcloning grade competent cells (Stratagene)

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

(Bullock et al., 1987). Der Stamm XL1-Blue wurde für die Amplifikation von Plasmiden eingesetzt.

Bacteriomatch[®]-Reporterstamm: Reporter strain competent cells (Stratagene) #200180 XL-1 Blue MRF`Kan

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

Bacteriomatch[®] library pack competent cells (Stratagene) #200138 XL-1 Blue MRF`Kan

Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' *proAB laqI^qZΔM15 Tn5* (Kan^r)]

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

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

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

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

6.12 ANTIBIOTIKA

Alle Antibiotika wurden von Sigma oder AppliChem bezogen.

<u>Konzentration der Stocklösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
50 mg/ml Ampicillin in H ₂ O	100 µg/ml
50 mg/ml Carbenicillin in H ₂ O	600 µg/ml
25 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol	34 µg/ml (Bacteriomatch [®] II 25 µg/ml)
50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O	50 µg/ml
10 mg/ml Tetracyclin-HCl in H ₂ O	15 µg/ml (Bacteriomatch [®] II 12,5 µg/ml)
12,5 mg/ml Streptomycin in H ₂ O	12,5 µg/ml

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

6.13 DATENBANKEN UND COMPUTERPROGRAMME

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	BLAST	(Altschul and Lipman, 1990)
www.ch.embnet.org	Coils	(Lupas et al., 1991)
www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	PSIPRED	(McGuffin et al., 2000)
www.ncbi.nlm.nih.gov	PubMed	
www.expasy.org	ExPASy Proteomics Server	
www.smart.embl-heidelberg.de	SMART	
www.expasy.ch/tools/pi_tool.html	Compute pI/Mw tool	
www.sanger.ac.uk/Software/Pfam	PFAM	
www.dove.embl-heidelberg.de	REP	
Omiga 2.0 software	Oxford Molecular Ltd., 1999	

7 METHODEN

7.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

7.1.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die von Kary B. Mullis 1983 entwickelte PCR-Technik ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNS-Sequenzen *in vitro*. Mithilfe zweier Oligonukleotide (Primer), eines 2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat-Gemischs (dNTPs) und einer DNS-Polymerase wird das Template, eine DNS-Matrize, exponentiell amplifiziert. Das Prinzip der PCR basiert auf dem zyklischen Ablauf von drei Teilschritten, welche je nach Protokoll 20-40 mal wiederholt werden (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987):

Anzahl Zyklen	Inkubationstemperatur	Inkubationszeit	Ereignis
1 x	95 °C	5 min	Denaturierung der doppelsträngigen DNS-Matrize
	Primer-T _m (ca. 50-60 °C)	30 sec	Hybridisieren der komplementären Primer an DNS-Einzelstränge
ca. 30 x	72 °C	1 min/ 1000 bp	Verlängerung der Primer durch die DNS-Polymerase (Elongation)
	95 °C	1 min	erneute Denaturierung der DNS-Matrize

Es können verschiedene DNS-Polymerasen verwendet werden: Die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* hat ihr Aktivitätsmaximum bei ca. 74 °C, synthetisiert bei 70 °C ungefähr 2800 Nukleotide pro Minute, und besitzt außer der 5'-3'-DNS-Polymeraseaktivität auch eine Template-unabhängige Polymeraseaktivität, die ein zusätzliches Adenosin an das amplifizierte Produkt anhängt. Dieses wird am 5'-Ende durch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq entfernt, bleibt aber am 3'-Ende erhalten. Die Taq-Polymerase hat eine Fehlerwahrscheinlichkeit von ungefähr 1000 pro eingebauten Basenpaaren. Die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* besitzt neben der 5'-3'-DNS-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, welche Basenfehlpaarungen erkennt und korrigiert (proofreading-Aktivität) und für glatte Enden der PCR-Produkte sorgt. Die Syntheserate beträgt ca. 1000 Nukleotide pro Minute, die Fehlerwahrscheinlichkeit liegt bei 1.000.000 pro eingebauten Basenpaaren. In dieser Arbeit wurden alle DNS-Konstrukte, die auf einer PCR-Strategie beruhen, mit Pfu-Polymerase synthetisiert. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wird nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

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

Soll ein PCR-Produkt in ein Plasmid eingefügt werden, werden zusätzlich Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen am 5'-Ende des Oligonukleotids angehängt, so dass das fertige PCR-Endprodukt an beiden Enden die erwünschten Restriktionsschnittstellen enthält. Nach enzymatischer Modifikation mit Restriktionsendonukleasen und Aufreinigung kann es durch Ligation in das gewünschte Plasmid inseriert werden.

AMPLIFIKATION VON DNS ZUM EINFÜGEN IN EIN PLASMID

Zum Einfügen von Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen fand ein Zwei-Stufen-Temperaturprogramm Verwendung. Um die Spezifität der PCR zu steigern wurde nach 6 Zyklen die Annealing-Temperatur erhöht, da die Schmelztemperatur durch Integration der Restriktionsschnittstellen in die DNS-Matrize ansteigt.

Reaktionsansatz:

1 µl	Matrizen-DNS (Plasmid-DNS 50 ng/µl)
10 µl	10 x Pfu-Puffer, mit 20mM Mg SO ₄
2 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
2,5 µl	Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)
2,5 µl	Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)
2 µl	Pfu Turbo DNS-Polymerase
ad 100 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

1 Zyklus	3 min bei 94 °C
6 Zyklen	45 sec bei 94 °C
	45 sec bei (T _m der komplementären Primer-Sequenz, meist ca. 56-58 °C)
	1 min/1kb bei 72 °C
20 Zyklen	45 sec bei 94 °C
	45 sec bei 64 °C
	1min/1kb bei 72 °C
1 Zyklus	10 min bei 72 °C
∞	4 °C

7.1.2 GEZIELTE PUNKTMUTAGENESE

Diese Methode erlaubt die gezielte Mutation eines Basenpaares oder mehrerer nebeneinander liegender Basenpaare. Die zu mutierende DNS muss hierzu aus einem *dam*⁺ *E.coli*-Stamm isoliert worden sein. Die gewünschte Mutation wird mittels zwei zueinander komplementärer Oligonukleotide eingeführt. Die Mutationen, i.d.R. eine Base, werden hierzu in die Mitte des Oligonukleotids platziert; rechts und links davon befinden sich 10 bis 15 zur Matrize komplementäre Basen. Als Matrize dient die DNS, in welche die Mutation eingeführt werden soll. In der PCR-Reaktion wird das Plasmid einschließlich der darin inserierten DNS zunächst amplifiziert. Anschließend wird der gesamte Reaktionsansatz mit Dpn I behandelt. Durch dieses Enzym wird die *dam*⁺-methylierte Matrizen-DNS jeweils an einer Dpn I-Erkennungssequenz GA^MTC (methyliertes Adenosin) geschnitten und dadurch praktisch zerstört, während das nicht methylierte PCR-Produkt erhalten bleibt. Dieses Produkt, das amplifizierte Plasmid, welches die mutierte DNS enthält, weist noch zwei Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat auf. Diese werden nach Transformation von Bakterien durch bakterieneigene Ligasen geschlossen. Die Plasmide pcDNA3, pEYFP und pTRG eignen sich gut als Matrizen-DNS zur Punktmutagenese, das pCAGGS-Plasmid aufgrund seiner Größe weniger.

Um die Punktmutationen zu erzeugen, wurde entweder ein „Quik Change XL Kit“ (Stratagene) verwendet oder eine modifizierte Methode mit folgendem Reaktionsansatz und PCR-Programm:

Reaktionsansatz:

1 µl	Matrizen-DNS in Plasmid (10 ng/µl)
5 µl	10 x Reaction Puffer (Quik Change XL Kit, Stratagene)
1 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
2,5 µl	Mutagenese-Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)
2,5 µl	Mutagenese-Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)
2 µl	Pfu DNS-Polymerase (Eigenherstellung, S. Buchholz)
ad 50 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

1 Zyklus	3 min bei 95 °C
18 Zyklen	50 sec bei 95 °C
	50 sec bei 60 °C
	1 min/1kb bei 68 °C
1 Zyklus	7 min bei 68 °C

7.1.3 KOLONIEN-PCR

Besonders bei ungerichteten Klonierungen ist diese Methode von Vorteil, denn mit der richtigen Oligonukleotid-Kombination können Klone mit korrekt inserierter DNS direkt erkannt werden, weil nur dann ein PCR-Produkt entsteht.

Vor dem Abnehmen von der Agar-Platte werden die Kolonien nummeriert, so können nach der PCR von positiven Klonen Vorkulturen angeimpft werden. Die Matrizen-DNS wird in Form einer halben Bakterien-Kolonie mit der Pipettenspitze von der Agar-Platte genommen und in einen PCR-Ansatz pipettiert. Mit diesem wird eine PCR (siehe unten) durchgeführt. Durch initiales Erhitzen auf 95 °C werden die Bakterien lysiert und die Matrizen-DNS für die DNS-Polymerase frei zugänglich. Nach der PCR erfolgt eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit 10 µl des PCR-Ansatzes, eine sichtbare Bande spricht für korrekte Inserierung der DNS.

Reaktionsansatz:

Kolonie	enthält Matrizen-DNS
5 µl	10 x Taq Puffer (Eigenherstellung)
1 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
2,5 µl	Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)
2,5 µl	Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)
2 µl	Taq DNS-Polymerase (Eigenherstellung)
ad 50 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

1 Zyklus	5 min bei 94 °C
25 Zyklen	30 sec bei 94 °C
	30 sec bei (T _m der komplementären Primer-Sequenz)
	1 min/1kb bei 72 °C
1 Zyklus	10 min bei 72 °C
∞	4 °C

7.1.4 ALKOHOL-FÄLLUNG VON DNS

Um DNS zu konzentrieren wird die DNS-Lösung mit einem monovalenten Salz und Alkohol versetzt und gut gemischt. Durch Zentrifugation kann die DNS anschließend pelletiert werden. Meist wurden zum Ausfällen 0,1 Volumenteile Ammoniumazetat (7,5 M) eingesetzt, seltener auch 0,05 Volumenteile Natriumchlorid (5 M). In Gegenwart von Ammoniumazetat werden freie Nukleotide und Oligonukleotide bis ca. 30 Basenpaare nicht gefällt. Da das Ammoniumion die T4-Polynukleotidkinase hemmen kann, sollte vor einer Phosphorylierungsreaktion mit der T4-Polynukleotidkinase mit einem ammoniumfreien Salz gefällt werden.

Die DNS wurde mit 0,1 Volumenteilen Ammoniumazetat und 2,5 Volumenteilen Ethanol versetzt und bei 12000 x g 30 min zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde mit 2,5 Volumenteilen Ethanol 70 % (v/v) 5 min bei 12000 x g zentrifugiert, anschließend für etwa 10 min getrocknet und in H₂O gelöst.

7.1.5 SPALTUNG VON DNS DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionsendonukleasen können Fremd-DNS z.B. von Bakteriophagen von eigener DNS anhand spezifischer Methylierungsmuster und Basensequenzen unterscheiden und durch Spaltung zerstören. Bei der Rekombination und Analyse von DNS werden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet. Meist wird eine Sequenz von vier, sechs oder acht Basen erkannt; die Erkennungssequenzen sind normalerweise Palindrome. Es werden entweder glatte Enden mit einem 5'-Phosphat und einem 3'-OH erzeugt oder bei versetzten Schnittstellen einzelsträngige, kohäsive Enden.

Die Herstellung der Reaktionsansätze erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Zu präparativen Zwecken wurden 1-1,5 µg DNS in 40 µl Gesamtvolumen drei Stunden bei optimaler Temperatur -je nach Enzym unterschiedlich, meist aber 37 °C- inkubiert. Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 µg DNS in 20 µl Gesamtvolumen etwa eine Stunde bei optimaler Temperatur inkubiert.

7.1.6 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNS DURCH ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP/CIP)

Entstehen bei der Spaltung eines Plasmids mit Restriktionsendonukleasen kompatible Enden, würde es bei einer Ligationsreaktion zur Rezirkularisierung des Plasmids kommen, ohne dass die gewünschte DNS inseriert wird. Um dies zu verhindern, müssen die freien 5'-Phosphatgruppen des Plasmids mit alkalischer Phosphatase entfernt werden. Die alkalische Phosphatase wird normalerweise aus dem Dünndarm von Kälbern isoliert und deshalb auch als *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* bezeichnet.

Reaktionsansatz:

26 µl geschnittene Plasmid-DNS in H₂O
3 µl 10 x Dephosphorylierungspuffer
1 µl Alkalische Phosphatase
1 h bei 37 °C inkubieren
1 µl Alkalische Phosphatase
30 min bei 37 °C inkubieren, anschließend die Alkalische Phosphatase durch zehnmütiges Inkubieren bei 75 °C inaktivieren und die DNS durch GTG-Agarose-Gelelektrophorese oder Fällung mit Ammoniumazetat/Ethanol aufreinigen bzw. fällen.

10 x Dephosphorylierungspuffer (Roche)

0,5 M Tris-HCl
1 mM EDTA, pH 8,5

7.1.7 PHOSPHORYLIERUNG VON DNS

Um DNS-Fragmente ligieren zu können, muss am 5'-Ende eine Phosphatgruppe vorhanden sein. PCR-Produkte, die mit nicht-phosphorylierten Oligonukleotiden erzeugt wurden, müssen deshalb vor der Ligation phosphoryliert werden.

Reaktionsansatz:

26 µl PCR-Produkt in H₂O
3 µl 10 x Puffer für T4 DNS-Ligase
1 µl T4-Polynukleotidkinase (Roche)
30 min bei 37 °C inkubieren, anschließend die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) 10 min bei 75 °C inaktivieren.

Zusammensetzung des Puffers für die Phosphorylierung:

In der Regel wird der gleiche Puffer verwendet, der auch für die Ligierung angewendet wird; falls der Puffer kein ATP enthält, muss es in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt werden.

7.1.8 AUFFÜLLEN VON ÜBERHÄNGENDEN ENDEN (FILL-IN)

Überhängende DNS-Enden können von T4-DNS-Polymerase geglättet und die entstandenen Enden gleichzeitig mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Die T4-DNS-Polymerase füllt hierbei 5'-Überhänge durch ihre 3'-5'-Polymeraseaktivität auf und entfernt 3'-Überhänge durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität.

Reaktionsansatz:

22,5 µl	DNS in H ₂ O
3 µl	10 x Puffer für T4 DNS-Ligase (inklusive 1 mM ATP)
1,25 µl	1,25 mM dNTP
2 µl	T4-Polynukleotidkinase
1 µl	T4-DNS-Polymerase (Roche)

30 min bei 37 °C inkubieren, anschließend 10 min bei 75 °C inaktivieren.

7.1.9 DNS-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFREINIGUNG UND ANALYSE

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNS-Fragmenten. Da die DNS negativ geladene Phosphatgruppen enthält, wandert sie bei einer angelegten Spannung von 50-150 Volt im elektrischen Feld zur Anode. Zur Auftrennung nach der Größe kommt es, weil Agarose oder Polyacrylamid ein Netzwerk bilden, durch welches kleine Fragmente schneller wandern können als große. Um die DNS sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid verwendet, welches in die DNS-Helix interkaliert und bei UV-Anregung mit 254 nm Wellenlänge orange fluoresziert.

Alle DNS-Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die zugesetzten Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol laufen etwa in Höhe von 200 bp (Bromphenolblau) bzw. 60 bp (Xylencyanol) und erlauben abzuschätzen, wie weit die DNS-Fragmente gelaufen sind. Die Zugabe von Glycerol erhöht die Dichte der Probe und erlaubt präzises Übersichten der Geltasche. Ein parallel aufgetrennter Größenstandard („1kb Ladder“ von Invitrogen oder M9-Marker, Eigenherstellung) ermöglichte das Abschätzen der Fragmentgrößen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet.

<u>10 x TBE-Puffer pH 8,0</u>		<u>10 x Ladepuffer</u>	
0,89 M	Tris-HCl	40 % (w/v)	Harnstoff
0,89 M	Borsäure	40 % (w/v)	Glycerol, wasserfrei
0,02 M	EDTA	50 mM	EDTA, pH 8,0
		10 mM	Tris-HCl, pH 7,0
		0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
		0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

AGAROSE-GELE

Zu präparativen Zwecken wurde SeaKem GTG-Agarose (Cambrex) verwendet, zu analytischen Zwecken normale Agarose (Roth). In 0,6 bis 1 %igen (w/v) Agarose-Gelen wurden DNS-Fragmente ab 0,5 kb aufgetrennt.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wird Agarose zunächst mit 1 x TBE-Puffer aufgeköcht, nach Abkühlen auf 50 °C werden pro 100 ml Gelansatz 5 µl Ethidiumbromid 1 % (w/v) zupipettiert und die Lösung in einen

Gelträger mit Probenkamm gegossen. Das feste Gel wird samt Gelträger in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt.

POLYACRYLAMID-GELE

DNS-Fragmente, die kleiner als 1,0 kb sind können in 5-7 %igen Polyacrylamid-Gelen optimal aufgetrennt werden.

Ein 40 %iges (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid-Gemisch (29 Teile Acrylamid, 1 Teil Bisacrylamid) wird mit 1 x TBE auf entsprechende Endkonzentration verdünnt und anschließend mit 0,12 % (v/v) TEMED und 0,08 % (w/v) APS die Polymerisation gestartet. Das noch nicht polymerisierte Gel wird zwischen zwei abgedichtete Glasplatten mit Abstandshalter gegossen. Nach Polymerisation erfolgt die Elektrophorese. Anschließend wird die aufgetrennte DNS durch Inkubation des Gels in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für zehn Minuten angefärbt.

Ansatz Polyacrylamid-Gel 6,7 %ig:

5 ml	40 % Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)
3 ml	10 x TBE
35 µl	TEMED
80 µl	APS (30 %)
ad 30 ml	H ₂ O

7.1.10 ISOLIERUNG VON DNS AUS GELEN - ELEKTROELUTION

Um eine DNS-Bande aus einem GTG-Agarosegel zu isolieren, wird sie unter UV-Licht der Wellenlänge 305-320 nm (Transilluminator 4000, Stratagene) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und in einen autoklavierten Dialyseschlauch (Dialysis Tubing MWCO 12000, Sigma) überführt. Dieser wird dann mit 300 µl H₂O befüllt, mit Dialyseklammern verschlossen und in ein Puffereservoir (1 x TBE) zwischen zwei Elektroden gelegt. Bei einer angelegten Stromstärke von 135 mA wird die DNS aus dem Gelstück eluiert. Anschließend wird die DNS-Lösung aus dem Schlauch pipettiert, der Schlauch mit 100 µl H₂O gespült und die DNS aus der vereinigten Lösung mit Ethanol ausgefällt.

Die Dialyseschläuche müssen vor Gebrauch 5-6 x mit 10 mM EDTA (pH 8) autoklaviert werden um Kationen zu entfernen, die bei der Herstellung der Dialyseschläuche anfallen. Die Lagerung erfolgt in Ethanol bei 4 °C.

7.1.11 LIGATION VON DNS-FRAGMENTEN

Bei einer Ligationsreaktion werden DNS-Fragmente und linearisierte Plasmide über kompatible Enden verknüpft. Dies geschieht durch die Aktivität der T4-DNS-Ligase, welche unter Verbrauch von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindungen zwischen der freien OH-Gruppe am 3'-Ende des einen DNS-Stranges und der Phosphatgruppe am 5'-Ende des zweiten DNS-Stranges katalysiert.

Reaktionsansatz:

25 µl	Plasmid-DNS
50-150 µl	Fragment-DNS
1,5 µl	10 x Puffer für T4 DNS-Ligase
1 µl	T4-DNS-Ligase
ad 15 µl	H ₂ O

Inkubation für 16 Stunden bei 12-16 °C oder für 24-48 Stunden bei 4 °C.

7.1.12 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN

Eine 5 ml-Übernachtskultur LB-Medium ohne Antibiotikum wurde mit einer einzelnen Kolonie „E.coli XL-1 Blue“ (Stratagene) beimpft. 1 ml der Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium ohne Antibiotikum pipettiert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,35-0,4 inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und die Zellen 10 min bei 4500 x g und 4 °C pelletiert. Das Bakteriensediment wurde in 10 ml kaltem 1 x TSS-Puffer suspendiert, in Portionen zu 300 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Ermittlung der Anzahl Bakterien-Kolonien pro µg DNS wurden Bakterien auf Eis aufgetaut und eine Transformation mit 10-50 ng eines Testplasmids durchgeführt. Dann wurde der Transformationsansatz 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Angestrebt wird ein Kompetenzwert von 10⁷ bis 10⁸ Transformanden/µg Plasmid-DNS.

1 x TSS-Puffer

10 %	PEG 3350
50 mM	MgCl ₂
5 %	DMSO
ad 50 ml	LB-Medium

7.1.13 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION VON DNS

Eine 5 ml-Übernachtskultur LB-Medium wurde mit einer einzelnen Kolonie „E.coli XL-1 Blue MRF`Kan“ (Stratagene), beimpft. Falls der Bakterienstamm selbst eine Antibiotikaresistenz trägt, kann optional auch das entsprechende Antibiotikum, wie hier 50 µg/ml Kanamycin, zur Übernachtskultur pipettiert werden. Zwei Kolben mit je 400 ml LB-Medium wurden mit je 0,5 ml der Vorkultur bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6 inkubiert.

Die Ansätze wurden auf vier sterile Zentrifugenbecher aufgeteilt und 15 min bei 4500 x g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig dekantiert und die Bakterien in 4 x 250 ml eiskaltem H₂O suspendiert, es folgt eine 15-minütige Zentrifugation mit 4500 x g bei 4 °C. Die Überstände wurden vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die Pellets in 2 x 250 ml eiskaltem H₂O suspendiert und

anschließend für 15 min mit 4500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden erneut vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Pellets in 2 x 100 ml eiskaltem sterilem 10 %igem Glycerol aufgenommen, in einem Zentrifugenbecher vereinigt und erneut für 15 min mit 4500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgezogen, das Pellet in 1,5 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert, zu 60 µl portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Kompetenz wurde durch eine Elektroporation mit 10-50 ng pBTL als Testplasmid ermittelt; der Transformationsansatz wurde 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt und auf LB-Agar mit 34 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Kompetenz berechnet.

Für eine erfolgreiche Elektroporation ist es wichtig, dass sämtliche Ionen in der Bakteriensuspension entfernt sind; ist dies nicht der Fall kommt es nach Anlegen der Spannung (siehe unten) zu einem Kurzschluss. Deshalb müssen die o.g. Waschschritte durchgeführt werden. Angestrebt wird ein Wert von 10^8 - 10^9 Transformanden pro µg Plasmid.

7.1.14 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION VON PLASMIDEN IN KOMPETENTE BAKTERIEN

Durch einen schnellen Temperaturwechsel wird die DNS über Mechanismen, die nicht genau bekannt sind, in die Bakterienzelle aufgenommen.

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zu einem kompletten Ligationsansatz oder 20 ng Plasmid-DNS gegeben. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis; dann wurde das Bakterien-DNS-Gemisch im Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 min lang in einem Wasserbad oder Heizblock bei 42 °C inkubiert und danach 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium verdünnt und 1-1,5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden mit einem Drigalsky-Spatel direkt auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum plattiert, der Rest wurde zentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in einem kleinen Volumen SOC-Medium resuspendiert und auf einer weiteren LB-Agar-Platte verteilt. Die Agar-Platten wurden anschließend 16 h bei 37 °C inkubiert.

7.1.15 ELEKTROPORATION VON PLASMIDEN IN KOMPETENTE BAKTERIEN

Bei der Elektroporation führt eine kurze Hochspannung zur Entstehung von Poren in der Zellwand, durch welche dann die DNS in die Zelle gelangt.

Zur Elektroporation muss sich die DNS in einer ionenfreien Lösung befinden. Deshalb wird der Ligationsansatz vor der Elektroporation gefällt, wobei das Gesamtvolumen der DNS-Lösung 5 µl nicht überschreiten soll. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 40 µl Bakteriensuspension wurden durch auf- und abpipettieren mit der DNS vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt.

Alle Elektroporationen wurden mit dem GenePulser der Firma BioRad durchgeführt.

- Bedingungen für 1 mm Küvetten: 400 Ω; 1,5 kV; 25 µF; die Zeitkonstante sollte 7,7-9,4 betragen
- Bedingungen für 2 mm Küvetten: 200 Ω; 2,5 kV; 25 µF; die Zeitkonstante sollte 4,6-4,9 betragen

Nach dem Elektroporieren wurden unverzüglich (jede Verzögerung vermindert die Vitalität der Zellen) 960 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben und der Transformationsansatz in ein 12 ml-Röhrchen überführt. Es folgten Inkubation bei 200 rpm und 30 °C (Bacteriomatch[®]) bzw. 37 °C (Bacteriomatch[®] II). Danach wurden von diesem Ansatz bei Kotransformationen des Bacteriomatch[®]-Systems 100 µl ausplattiert, bei Kotransformationen des Bacteriomatch[®] II-Systems 200 µl. In Abhängigkeit vom Plasmid wurde bei 30 °C oder 37 °C für 16-24 h inkubiert.

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

1 % (w/v) Caseinhydrolysat
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % (w/v) NaCl
 Autoklavieren: 20 min, 121 °C, 1,2 bar.
 Antibiotika bei 50 °C zugeben,
 Endkonzentrationen:
 Ampicillin 100 µg/ml
 Carbenicillin 600 µg/ml
 Chloramphenicol 34 µg/ml
 Kanamycin 50 µg/ml
 Tetracyclin 15 µg/ml

SOC-Medium

LB-Medium versetzen mit
 10 mM MgSO₄ (autoklaviert)
 10 mM MgCl₂ (autoklaviert)
 0,4 % (w/v) Glucose (sterilfiltriert)

LB-Agar

LB-Medium versetzen mit
 1,5 % (w/v) Agar
 Autoklavieren: 20 min, 121 °C, 1,2 bar.
 LB-Agar im Wasserbad auf 52 °C abkühlen,
 Antibiotika-Zugabe siehe links.
 LB-Agar in Petrischalen gießen,
 bei 4 °C lichtgeschützt lagern

7.1.16 PLASMID-PRÄPARATION IM KLEINEN MAßSTAB (MINI-PRÄPARATION)

Die Plasmid-Mini-Präparation ist eine einfache Methode um Plasmide bei der Herstellung rekombinanter DNS zu isolieren.

Eine Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers in 5 ml LB-Medium mit einem Antibiotikum (je nach Resistenzgen des zu präparierenden Plasmids) überführt und 16-24 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 1,5 ml dieser Vorkultur wurden in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und die Bakterien bei 5000 rpm 5 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) sedimentiert. Das Sediment wurde in 300 µl STETL-Puffer suspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und die Bakterien anschließend bei 95 °C 1 min lysiert. Nach Inkubation für 2 min bei 4 °C wurde der Ansatz 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und Zellreste anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt, 300 µl Isopropanol zupipettiert und durch Schütteln mit dem Ansatz vermischt. Die DNS wurde durch 30 min Zentrifugieren bei 13000 rpm ausgefällt und mit 1 ml 70 % Ethanol 5 min bei 13000 rpm gewaschen. Anschließend wurde das Pellet 10 min lang getrocknet und in 40 µl 0,04 % RNase A resuspendiert.

Durch eine Restriktionsendonukleasenspaltung und die Auftrennung der entstandenen DNS-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die präparierte DNS analysiert.

STETL-Puffer

8 % (w/v)	Saccharose
5 % (w/v)	Triton X-100
50 mM	Tris-HCl pH 8,0
50 mM	EDTA pH 8,0
Vor Verwendung 10 µl/ml frisch angesetzte Lysozymlösung (10 mg/ml) zugeben.	

RNAse A Lösung

1 % (w/v)	RNAse A
10 mM	Tris-HCl pH 7,5
15 mM	NaCl
15 min bei 100 °C inkubieren, abkühlen lassen.	

RNAse-H₂O

200 µl	RNAse A-Lösung
ad 50 ml	H ₂ O

7.1.17 PLASMID-PRÄPARATION IM PRÄPARATIVEN MASSSTAB (MAXI-PRÄPARATION)

Zur Gewinnung großer Mengen reiner Plasmid-DNS wurde ein „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ verwendet: 400 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 1 ml aus einer 5 ml-Vorkultur, die das zu präparierende Plasmid enthält, beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 x g, 4 °C 15 min sedimentiert und das Sediment in 10 ml P1-Puffer (+RNAse A) suspendiert und in ein 30 ml-Corex Röhrchen überführt. Dann erfolgte durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer (SDS-NaOH) in 5-minütiger Inkubationszeit die alkalische Lyse der Bakterien, wonach 10 ml P3-Puffer (Kaliumazetat) zugegeben wurde. Während einer Inkubation bei 4 °C für 20 min fiel das schwerlösliche Kaliumdodecylsulfat zusammen mit denaturierten Proteinen und chromosomaler DNS aus, wohingegen die Plasmid-DNS in Lösung blieb. Nach 30 min Zentrifugation mit 20000 x g bei 4 °C wurde der Überstand auf die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule geladen. Hier wurde die DNS über ihre negativ geladenen Phosphatgruppen von Diethylaminoethanol-Gruppen (DEAE) des Säulenmaterials zurückgehalten. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die DNS mit 15 ml Hochsalz-QF-Puffer von der Säule eluiert. Abschließend wurde die DNS nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol durch 30 min Zentrifugation bei 15000 x g, 4 °C gefällt und mit 5 ml Ethanol 70 % bei gleichen Bedingungen 10 min gewaschen. Das entstandene Pellet wurde getrocknet und in 200-400 µl H₂O aufgenommen.

Die Konzentration der DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

7.1.18 SEQUENZIEREN VON DNS

Alle hergestellten rekombinanten Plasmide wurden nach der „Cycle Sequencing“-Methode nach Sanger et al., 1977 sequenziert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip einer modifizierten PCR, auf der DNS-Synthese in Gegenwart von Didesoxynukleotiden (ddNTP). Diese konkurrieren während der PCR-Reaktion mit den dNTPs und fungieren aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe als Kettenterminatoren. Nach Abschluss der PCR sind alle möglichen Amplifikate entstanden, die mit einem Didesoxynukleotid enden.

Zur Strangabbruchreaktion wurde ein „ABI Prism Big Dye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V 1.1“ (Applied Biosystems) verwendet. Da die vier verwendeten ddNTPs mit verschiedenen Fluorophoren gekoppelt sind, konnte die PCR in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden. Zur Analyse wurde ein „Abi Prism 310 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) eingesetzt. Hierbei wurden die

entstandenen DNS-Fragmente durch Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die jeweiligen Fluorophore durch Spektralphotometrie detektiert. Durch die „Data Collection Software No. 3.0.0“ (Applied Biosystems) wurde aus den Daten des Spektralphotometers die Abfolge der unterschiedlichen Fluoreszenzemissionen berechnet und aus ihnen ein Chromatogramm erstellt. Unter Verwendung der „Sequencing Analysis 3.7 Software“ (Applied Biosystems) wurde aus dem Chromatogramm die Basen-Abfolge der Matrizen-DNS berechnet.

Reaktionsansatz:

100-500 ng	Matrizen-DNS
1 µl	Oligonukleotid (10 pmol/µl)
1,5 µl	BigDye® Terminator
	Ready Reaction Mix
ad 12 µl	Licrosolv (Merck, Darmstadt)

PCR-Programm:

1 Zyklus	1 min bei 95 °C
30 Zyklen	30 sec bei 95 °C
	2,30 min bei 55 °C
∞	bei 4 °C

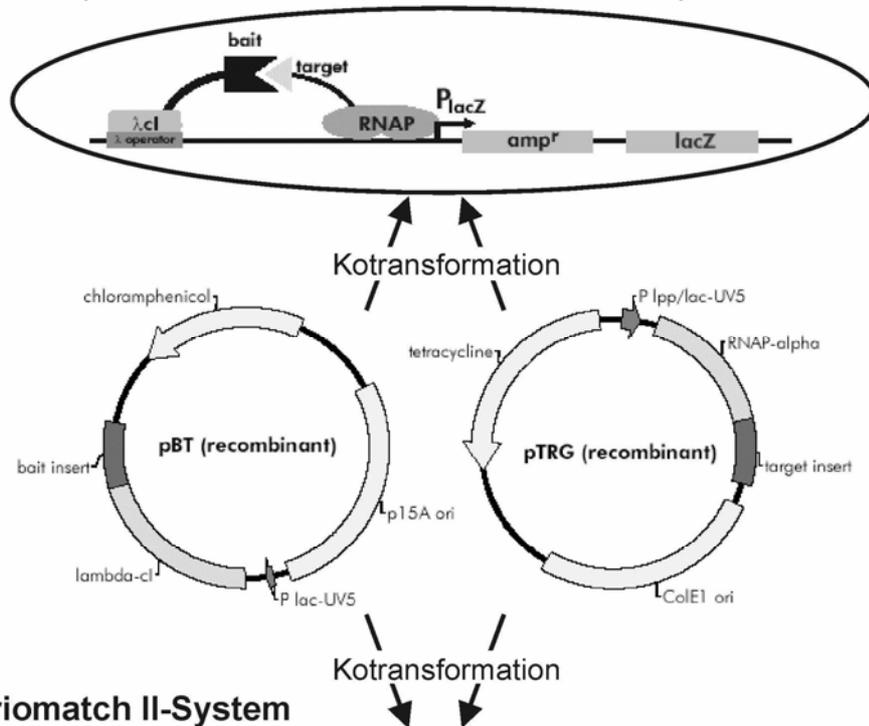
Vor der Kapillarelektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Zur Aufreinigung des Reaktionsansatzes wurden 96-Lochplatten mit Filtrationseinheit (Whatman Microplate Devices Unifilter) mit Sepharose (Sephadex™ G-50, Amersham Pharmacia) befüllt und pro Loch mit 300 µl Licrosolv-Wasser 2,5 h gequollen. Dann wurde die 96-Lochplatte bei 2930 x g für 5 min zentrifugiert, das Loch nochmals mit 150 µl Licrosolv-Wasser befüllt und der Zentrifugiervorgang unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in das Loch auf die gequollene Matrix pipettiert und nochmals 5 min bei 2930 x g zentrifugiert. Dem gereinigten PCR-Ansatz wurden 8 µl HiDi-Formamid (deionisiertes Formamid) zur Denaturierung zugegeben; der Ansatz kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

7.2 ÜBERSICHT: BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM

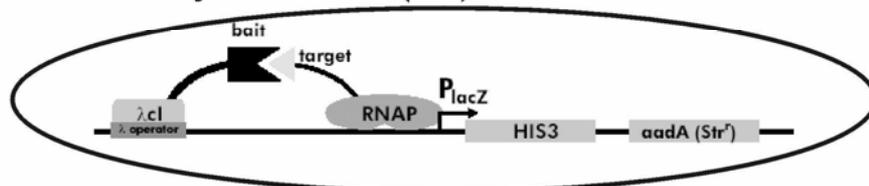
Ein Zwei-Hybrid-System dient zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, beispielsweise von Protein X mit Protein Y. Im Bakterien-Zwei-Hybrid-System der Firma Stratagene (Dove et al., 1997) wird die DNS des Proteins X im pBT-Plasmid mit der DNS für ein Volllängen-Bakteriophage λ -Repressor-Protein (λ cI) fusioniert, der sogenannte Köder oder „bait“. Die DNS von Protein Y wird im pTRG-Plasmid mit der DNS für die RNS-Polymerase α -Untereinheit fusioniert, die sogenannte Beute oder „prey“ bzw. „target“. Beide Plasmide werden in einen Reporter-Bakterienstamm kotransformiert. In der Bakterienzelle werden die Fusionsproteine synthetisiert, der λ cI-Teil des Bait-Proteins bindet an die λ -Operator-Sequenz strangaufwärts des Reporterpromotors. Wenn Protein X und Protein Y interagieren, wird die RNS-Polymerase des Target-Proteins in räumliche Nähe zum Promotor gebracht und kann daran binden. In Folge wird die Transkription der Reportergene aktiviert und die Bakterienzelle kann auf einem Selektionsmedium zur Kolonie heranwachsen.

1) Bacteriomatch-System

Kompetente Bakterienzelle mit Bacteriomatch-Reporterkassette



2) Bacteriomatch II-System



Kompetente Bakterienzelle mit Bacteriomatch II-Reporterkassette

Abbildung 5: Übersicht über Funktionsweise von Bacteriomatch[®] und Bacteriomatch[®]II: Zur Untersuchung auf Interaktion zwischen zwei Proteinen X und Y wird zunächst die DNS von X in das pBT-Plasmid inseriert, wobei sie aminoterminal an eine λ cI-DNS fusioniert wird, die DNS von Y wird in das pTRG-Plasmid inseriert, wobei sie aminoterminal an die Sequenz der RNS-Polymerase α fusioniert wird. Anschließend werden beide Plasmide entweder in die kompetenten Reporter-Bakterienzellen des Bacteriomatch[®]-Systems oder des Bacteriomatch[®]II-Systems kotransformiert. In den Bakterien werden die beiden Fusionsproteine λ cI-X und RNS-Polymerase α -Y synthetisiert. Das λ cI-X-Fusionsprotein bindet an den λ -Operator der Reporter-kassette. Nur wenn Y mit X interagieren kann, wird die RNS-Polymerase α in räumliche Nähe zum Promotor gebracht, bindet daran und die Reportergene werden abgelesen. Dies sind beim Bacteriomatch[®]-System amp^R (Cabenicillinresistenz) und lacZ (β -Galaktosidase), beim Bacteriomatch[®]II-System HIS3 (Fähigkeit zur Histidinsynthese) und aadA (Streptomycinresistenz).

Anwendung der Bakterien-Zwei-Hybrid-Systeme zur Durchsicherung von cDNS-Bibliotheken: in das pBTL-Plasmid wurde die DNS des TRPV6-C-Terminus inseriert, in das pTRG-Plasmid die cDNS-Klone der jeweiligen Bibliothek. 1) zur Durchsicherung der Plazenta-cDNS-Bibliothek wurden beide Plasmide in Bacteriomatch[®]-Reporterbakterien kotransformiert, bei Protein-Protein-Interaktion wurden die Reportergene amp^R (Cabenicillinresistenz) und lacZ (β -Galaktosidase) abgelesen, der Klon konnte auf einem Selektionsmedium mit Carbenicillin und X-Gal/IPTG wachsen. 2) zur Durchsicherung der Pankreas-cDNS-Bibliothek wurden beide Plasmide in Bacteriomatch[®]II-Reporterbakterien kotransformiert, eine Protein-Protein-Interaktion bewirkte die Ablesung der Reportergene HIS3 (Fähigkeit zur Histidinsynthese) und aadA, was den Klon zum Wachstum auf Histidin-Mangelmedium mit Streptomycin befähigte (Grafik modifiziert nach Angaben des Herstellers).

Die Vorteile eines Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems gegenüber einem Hefe-System liegen im schnelleren Wachstum der Bakterien und höherer Transformationseffizienz; zudem ist die Isolierung von DNS aus Bakterien einfacher als aus Hefen. Die Wahrscheinlichkeit, dass *E. coli* ein Homolog zum untersuchten eukaryotischen Interaktionspartner besitzt, ist gering. Auch besteht bei Untersuchung eukaryotischer regulatorischer Proteine in Bakterien kaum die Gefahr, dass sie in den bakteriellen Zellzyklus eingreifen und toxisch wirken. Zudem muss die DNS nicht wie bei Hefen in den Zellkern gelangen, was bei Untersuchung von Membranproteinen ein entscheidender Vorteil sein könnte.

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie beispielsweise Glykosylierung, ist nicht möglich, was aber nicht von Nachteil sein muss. Weiterhin kann es zu Fehlfaltungen der zu untersuchenden Proteine kommen.

7.2.1 PLASMIDE UND KOMPETENTE BAKTERIEN

MODIFIKATION DES PBT-PLASMIDS

In die Not I-Restriktionsschnittstelle des pBT-Plasmids wurde ein (Gly₄Ser)₃-Linker eingefügt, das modifizierte Plasmid wurde pBTL genannt. Im Fusionsprotein entsteht so ein bewegliches Gelenk zwischen λ cI und dem zu untersuchenden Protein, welches die sterische Behinderung von möglichen Protein-Protein-Interaktionen einschränken sollte.

KONSTRUKTION REKOMBINANTER PBTL- UND PTRG-PLASMIDE

Beim Entwurf der Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der zu untersuchenden DNS ist darauf zu achten, dass der Leserahmen eingehalten wird, um korrekte aminoternale λ cI- bzw. RNS Polymerase α -Fusionsproteine zu erhalten. Da alle Bakterienstämme des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems eine supE44 Mutation tragen, die einen Amber Suppressor darstellt, wird TAG nicht als Stop-Codon erkannt. Die gerichtete Inserierung von DNS in pBTL über die BamHI- und XhoI-Schnittstellen kann Probleme bereiten, weil die Schnittstellen beider Enzyme überlappen.

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

EIGENHERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN FÜR BACTERIOMATCH[®] UND BACTERIOMATCH[®] II

Die von Stratagene käuflich erworbenen Original-Bakterienzellen (Seite 32) wurden nach den zuvor beschriebenen Methoden kultiviert und kompetent gemacht; „Bacteriomatch[®] Reporter Strain Competent Cells XL-1 Blue MRF`Kan“ wurden elektroporationskompetent gemacht, „Bacteriomatch[®] II Validation Reporter Competent Cells XL-1 Blue MRF`Kan“ wurden sowohl elektroporationskompetent als auch hitzeschockkompetent gemacht.

7.2.2 TRANSFORMATION DES pBTL- UND pTRG-PLASMIDS IN KOMPETENTE BAKTERIEN

Um die potenzielle Toxizität für die Wirtszelle zu minimieren, müssen sowohl pTRG- als auch pBTL-Plasmid in Wirtsstämmen mit einem $lacI^q$ -Gen kultiviert werden. Sollen die Bakterien auf nährstoffreichem LB-Agar wachsen, muss die Inkubationstemperatur 30 °C betragen.

Zur Transformation im Bacteriomatch[®]-System wurde ein durch Ethanol-fällung entsalzter und auf 4 µl eingeeingter Ligationsansatz mit 40 µl elektroporationskompetenter „Bacteriomatch[®] Reporter Strain Competent Cells“ (Seite 32) gemischt und in einer 2-mm-Elektroporationsküvette elektroporiert (Bedingungen siehe Seite 42). Nach Zugabe von 960 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1,5 h im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 30 °C regeneriert.

Für Transformationen im Bacteriomatch[®]II-System wurde ein kompletter Ligationsansatz zu 100 µl hitzeschockkompetenter „Bacteriomatch[®]II Validation Reporter Competent Cells“ in ein 14-ml-Falcon-Polypropylen-Röhrchen 2059 pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock für 35 sec bei 42 °C, 2 min Eisinkubation und Zugabe von 960 µl SOC-Medium. Die Bakterien wurden anschließend für 1,5 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

Bei beiden Bacteriomatch-Systemen wurden 100 µl Transformationsansatz direkt auf eine LB-Agar Platte ausplattiert; die pelletierten Bakterien des Restansatzes auf eine weitere. Das pBTL-Plasmid trägt ein Chloramphenicol-Resistenzgen; Bakterien wurden hierzu auf LB-Agar mit 34 µg/ml Chloramphenicol kultiviert. Das Plasmid pTRG enthält ein Tetracyclin-Resistenzgen; Bakterien, die dieses Plasmid tragen, wachsen auf LB-Agar mit 15 µg/ml Tetracyclin. Die Inkubation erfolgte für 17-30 h bei 30 °C und anschließend, wenn nötig, bis zur gewünschten Koloniengröße bei Raumtemperatur.

7.2.3 PRÄPARATION VON pBTL UND pTRG

Beide Plasmide des Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems sind Low-Copy-Plasmide, d.h. es sind nur mit wenige Plasmid-Kopien pro Wirtszelle vorhanden: das pBTL-Plasmid liegt mit ca. 10 Kopien pro Wirtszelle vor, das pTRG-Plasmid ist mit ca. 20-30 Kopien pro Wirtszelle vertreten.

Zur analytischen Präparation im Mini-Maßstab wurden folgende Modifikationen im Vergleich zum Standard-Protokoll (Seite 43) vorgenommen: statt 300 µl STETL wurde das Bakteriensediment in 800 µl STETL suspendiert; die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 13000 rpm anstelle von 15 min und die DNS wurde anschließend aus dem Überstand mit 800 µl Isopropanol anstelle von 300 µl ausgefällt.

Für Kotransformations-Experimente wurde die Plasmid-DNS mit einem „Qiagen Plasmid Mini Kit“ aus 8 ml Vorkultur oder einem „Qiagen Plasmid Midi Kit“ aus 100 ml Vorkultur nach einem Protokoll für Low-Copy-Plasmide gemäß den Angaben des Herstellers präpariert.

7.3 BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

Der Bacteriomatch[®] Reporter-Bakterienstamm enthält eine Reporter-kassette mit zwei Reportergenen: amp^R codiert für eine β -Lactamase, lacZ für eine β -Galaktosidase (siehe Abbildung 5, Seite 46). Da das System bei Anwendung des Hersteller-Protokolls nicht funktionierte, wurde das Protokoll optimiert: 1) Zur Kotransformation der Plasmide in den Reporterstamm wurde kein Hitzeschock, sondern eine Elektroporation durchgeführt. 2) Statt 10 ng Plasmid wurden jeweils 50 ng Plasmid zur Kotransformation eingesetzt. 3) Nur mit 600 μ g/ml Carbenicillin im Selektionsmedium LB-CTCK-Agar (statt 250 μ g/ml) und einer fixen Kombination von X-Gal/IPTG auf den Selektionsplatten konnte ein unspezifisches Wachstum des Reporterstammes unterdrückt werden. Bei Interaktion der zu untersuchenden Proteine kam es zu Wachstum blauer Kolonien auf LB-CTCK-Agar.

7.3.1 HERSTELLUNG DES LB-CTCK-AGARS FÜR DAS BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

LB-Agar wird bei 121 °C, 1,2 bar für 20 min autoklaviert und im Wasserbad auf 52 °C abgekühlt. Folgende Antibiotika wurden unter Rühren zugegeben:

- Chloramphenicol 34 μ g/ml, zum Test auf Anwesenheit von pBTL
- Tetracyclin 15 μ g/ml, zum Test auf Anwesenheit von pTRG
- Carbenicillin 600 μ g/ml, Test auf Aktivierung des 1. Reportergens Amp^R
- Kanamycin 50 μ g/ml Test auf Kanamycin-Resistenz des Reporterstammes

Der Agar wurde in Petrischalen gegossen, der feste Agar wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Carbenicillin darf nicht durch Ampicillin ersetzt werden, da es stabiler ist und weniger empfindlich gegen Abbau durch β -Lactamasen. So wird dem Wachstum von Satellitenkolonien und falsch positiven Kolonien vorgebeugt.

7.3.2 KOTRANSFORMATIONSEXPERIMENT IM BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

Negativkontrolle: Jedes rekombinante pBTL-Plasmid wurde zuerst mit dem leeren pTRG-Plasmid und jedes rekombinante pTRG-Plasmid zuerst mit dem leeren pBTL-Plasmid kotransformiert, um zu testen, ob das zu untersuchende Protein alleine eine Transkriptionsaktivierung auslöst. Eine Detektion falsch positiver Interaktionen wurde so vermieden.

Positivkontrolle: In jedem Satz Kotransformationsexperimente wurde eine Positivkontrolle mit den Kontrollplasmiden pBT-LGF2 und pTRG-GAL11^P, deren Interaktion in E.coli bereits beschrieben wurde (Dove and Hochschild, 1998), als interner Standard durchgeführt.

Elektroporationskompetente „Bacteriomatch[®] Reporter Strain Competent Cells“ wurden auf Eis aufgetaut. Je 50 ng pBTL- und pTRG-Plasmid, welche die auf Interaktion zu untersuchende DNS enthielten, wurden zu 40 μ l elektroporationskompetenter Bakterien pipettiert und gemischt. Die DNS wurde wie oben beschrieben in einer 2 mm Küvette bei 200 Ω , 2,5 kV und 25 μ F elektroporiert, die Zeitkonstante sollte 4,6-4,9 betragen. Auf jeder LB-CTCK-Agar-Platte wurde 15 min vor dem Ausplattieren der elektroporierten Bakterien ein Mix aus 20 μ l 20 mg/ml X-Gal in DMF; 20 μ l 0,1 M IPTG und 60 μ l H₂O verteilt. Anschließend wurden je 100 μ l eines Transformationsansatzes auf eine LB-CTCK-Agarplatte + X-Gal/IPTG

ausplattiert und die Platten bei 30 °C 16-24 h inkubiert bis Kolonien sichtbar waren. Die Kolonien wurden ausgezählt.

7.4 BACTERIOMATCH® II-SYSTEM

Im Bacteriomatch® II-System wird ein anderer Reporterstamm eingesetzt (Joung et al., 2000). Dieser besitzt als erstes Reporter-gen ein Hefe-*HIS3*-Gen, welches die Bakterien zur Histidinsynthese befähigt und als zweites Reporter-gen *aadA*, welches für eine Streptomycin-Resistenz kodiert (siehe Abbildung 5, Seite 46). Die „Bacteriomatch® II Validation Reporter Competent Cells“ tragen eine *hisB*-Mutation, die durch das *HIS3*-Gen der Reporter-kassette komplementiert wird und so das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium ermöglicht. Dies ist in geringem Maße auch ohne Transkriptionsaktivierung des *HIS3*-Gens möglich, da die Reporter-kassette immer auf niedrigem Niveau abgelesen und das *HIS3*-Genprodukt, eine Imidazolacetol-Phosphat-Transaminase, synthetisiert wird. Um das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium komplett zu unterdrücken, muss dem Medium 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zugegeben werden. 3-AT fungiert als kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Enzyms, Bakterienwachstum auf Histidin-Mangelmedium mit 3-AT erfordert die Transkriptionsaktivierung der Reporter-kassette. Zur Untersuchung starker Protein-Protein-Interaktionen eignet sich 5 mM 3-AT, sollen schwächere Interaktionen untersucht werden, kann die 3-AT-Konzentration reduziert werden.

Jeder Kotransformationsansatz wird auf zwei Medien ausplattiert: Auf dem Selektionsmedium 3-AT-Agar („Selective Screening Medium“) wird die Protein-Protein-Interaktion untersucht, eine Transkriptionsaktivierung ermöglicht das Kolonienwachstum. Das Kontrollmedium No-3-AT-Agar („Nonselective Screening Medium“) enthält nur Chloramphenicol und Tetracyclin als Selektionsmarker der beiden Plasmide pTRG und pBTL; es dient zur Kontrolle der Kotransformationseffizienz.

7.4.1 HERSTELLUNG DER MEDIEN FÜR DAS BACTERIOMATCH® II-SYSTEM

10 x M9-Salze

85 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
30 g	KH ₂ PO ₄
10 g	NH ₄ Cl
5 g	NaCl
ad 1 Liter	H ₂ O dest.

20 min bei 121 °C, 1,2 bar autoklavieren.

M9-Medium Additiva (für 500 ml M9⁺-Medium)

In sterilen Flaschen mischen:

Lösung I

10 ml	20 % (w/v) Glucose (sterilfiltriert)
5 ml	Adenin HCl (sterilfiltriert)
50 ml	10 x His dropout amino acid supplement (BD/Clontech; 15 min bei 121 °C, 1,2 bar autoklaviert)

Lösung II

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

Lösung II zu Lösung I geben, mischen.

M9⁺ His-dropout Broth (500 ml)

In steriler Flasche mischen:

380 ml	H ₂ O dest.
50 ml	10 x M9-Salze
67,5 ml	M9-Medium Additiva (ein Ansatz)

Bei 4 °C lagern.

No-3-AT Agar (500 ml)

In 500-ml-Flasche mischen:

380 ml	H ₂ O dest.
7,5g	Agar

20 min bei 121 °C, 1,2 bar autoklavieren.

Den Agar im Wasserbad auf 70 °C abkühlen, dann steril zugeben:

50 ml	10 x M9-Salze
-------	---------------

Den Agar im Wasserbad auf 52 °C abkühlen,
einen Ansatz M9-Medium Additiva mischen mit

625 µl	Chloramphenicol (20 mg/ml, Endkonzentration 25 µg/ml)
625 µl	Tetracyclin (10 mg/ml, Endkonzentration 12,5 µg/ml)

Den gesamten Ansatz M9-Medium Additiva (68,75 ml) mit dem
Agar/ M9-Salz-Gemisch verrühren, sofort in Petrischalen gießen.

Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

5 mM 3-AT Agar (500 ml)

Prozedere wie bei No AT Agar, allerdings wird dem Ansatz

M9-Medium Additiva zusätzlich zu den beiden Antibiotika noch zugefügt:

2,5 ml	1 M 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) (gelöst in DMSO)
--------	---

3-AT ist hitzelabil, es zersetzt sich bei über 55 °C; Agar unbedingt richtig temperieren.

5 mM 3-AT Agar + Streptomycin (500 ml)

Prozedere wie bei 5 mM 3-AT Agar, allerdings wird dem Ansatz

M9-Medium Additiva zusätzlich zu Chloramphenicol und Tetracyclin noch zugefügt:

0,5 ml	Streptomycin (12,5 mg/ml, Endkonzentration 25 µg/ml)
--------	--

7.4.2 KOTRANSFORMATIONSEXPERIMENT IM BACTERIOMATCH®II-SYSTEM

Für jede eingesetzte rekombinante DNS wurde zuerst durch eine Negativkontrolle ausgeschlossen, dass sie alleine eine Transkriptionsaktivierung auslöst (siehe Seite 49). Ebenso wurde zu jedem Kotransformationsexperiment eine Positivkontrolle durchgeführt. Bei einem gelungenen Kotransformationsexperiment sollten alle No-3-AT-Agarplatten als Anzeichen guter Transformationseffizienz dicht bewachsen sein. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion sind die 5 mM 3-AT-Agarplatten dicht bewachsen, findet dagegen keine Protein-Protein-Interaktion statt, werden keine Kolonien detektiert. Im Bacteriomatch®II-System gab es kein unspezifisches Kolonienwachstum.

Elektroporationskompetente „Bacteriomatch®II Validation Reporter Competent Cells“ wurden auf Eis aufgetaut. Je 50 ng pBTL- und pTRG-Plasmid, einschließlich der fusionierten und auf Interaktion zu untersuchenden DNS, wurden zu 40 µl Bakterien pipettiert und gemischt. Dieser Ansatz wurde in einer 1 mm Küvette bei 400 Ω, 1,5 kV und 25 µF elektroporiert, die Zeitkonstante sollte 7,7-9,4 betragen. Dann wurden unverzüglich (Verzögerungen unbedingt vermeiden) 960 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben, die Bakteriensuspension in ein 12-ml-Röhrchen überführt und 1,5 h durch Inkubation bei 37 °C und 200 rpm regeneriert.

Es folgte die Umbettung der Bakterien in das Minimalmedium: die Bakterien wurden bei 5000 rpm 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert, das SOC-Medium entfernt und 1 ml M9⁺ His-Dropout Broth zugegeben, in welchem das Pellet resuspendiert wurde. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min wurde der Überstand erneut entfernt und die Bakterien in 1 ml M9⁺ His-Dropout Broth resuspendiert. Nun wurden die Bakterien 2 h bei 200 rpm und 37 °C an das Minimalmedium adaptiert.

Abschließend wurden die Bakterien auf zwei Selektionsmedien ausplattiert: pro Kotransformationsansatz wurden 200 µl auf eine No-3-AT-Agarplatte und 200 µl auf eine 5 mM 3-AT-Agarplatte plattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und nach Bedarf noch 16 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur, bis Kolonien sichtbar waren.

7.5 KONSTRUKTION EINER PLAZENTA-CDNS-BIBLIOTHEK ZUR DURCHSUCHUNG IM BACTERIOMATCH®-SYSTEM

Eine cDNS-Bibliothek repräsentiert die exprimierten Gene bzw. Transkripte dieser Gene in einer Zelle oder in einem Gewebe. Die Summe der Transkripte ist die mRNS. Diese ist anfällig gegen Degradierung durch RNAsen. Mithilfe der Reversen Transkriptase kann jedoch ein DNS-Strang synthetisiert werden, der komplementär zur mRNS ist. In weiteren enzymatischen Schritten wird ein zweiter DNS-Strang synthetisiert, der komplementär zum ersten ist und in seiner Sequenz der mRNS entspricht. Zur Verwendung dieses cDNS-Doppelstrangs werden Restriktionsendonuklease-Schnittstellen eingefügt, so dass die cDNS in ein Plasmid eingefügt werden kann. Zur Konstruktion der Bibliothek wurde ein „Bacteriomatch® Two-Hybrid System Library Construction Kit“ (Stratagene #240069) verwendet. Die hier verwendete mRNS wurde als Poly(A)⁺ RNS von U. Wissenbach aus Plazenta von Mensch präpariert.

CDNS-ERSTSTRANG-SYNTHESE

An den 3'-terminalen Poly-A-Schwanz der Poly(A)⁺ RNS wurde ein Oligo(dT)-Primer, welcher am 5'-Ende eine Xho I-Schnittstelle enthält, hybridisiert und mithilfe der Reversen Transkriptase zum Erststrang verlängert. Dabei wurden methylierte dCTPs eingebaut, um die cDNS im weiteren Syntheseverlauf vor unerwünschter Modifikation durch Restriktionsendonukleasen zu schützen.

Reaktionsansatz:

5 µl	10 x Erststrang-Puffer
3 µl	10 mM dATP, dGTP, TTP; 5 mM 5-Methyl dCTP
2 µl	Oligo(dT)-Primer (1,4 µg/µl)
X µl (5 µg)	Poly(A) ⁺ RNS
ad 47,5 µl	DEPC-H ₂ O
1 µl	Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl)

Zur Anlagerung der Oligo(dT)-Primer wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde zugegeben

1,5 µl StrataScript Reverse Transkriptase (50 U/µl)

Es wurde 1 Stunde bei 42 °C inkubiert.

Die im Protokoll angegebenen 5 µg Poly(A)⁺ RNS ergaben im ersten Versuch zu wenig cDNS, daher wurden im zweiten Durchlauf 2 x 12 µg Poly(A)⁺ RNS eingesetzt.

CDNS-ZWEITSTRANG-SYNTHESE

Die an den Erststrang gebundene RNS wurde durch RNase H fragmentiert; die Fragmente dienten der DNS-Polymerase I als Primer zur Zweitstrang-DNS-Synthese.

Folgende Komponenten wurden bei <16 °C zum Erststrang-Ansatz pipettiert:

20 µl	10 x Zweitstrang-Puffer
6 µl	10mM dATP, dGTP, TTP; 26mM dCTP
114 µl	H ₂ O
2 µl	[α- ³² P] dATP (800 Ci/mmol)
2 µl	RNase H (1,5 U/µl)
11 µl	DNS Polymerase I (9,0 U/µl)

Der Ansatz wurde 2,5 Stunden bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

GLÄTTEN DER CDNS-ENDEN

Die überhängenden Enden der in der Zweitstrang-Synthese entstandenen Doppelstrang-cDNS wurden durch eine *Pfu*-DNS-Polymerase entfernt oder aufgefüllt.

Zum Reaktionsansatz aus der Zweistrang-Synthese wurden pipettiert:

23 µl	dNTP-Mix
2 µl	<i>Pfu</i> DNS Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 72 °C inkubiert und anschließend mit 200 µl Phenol-Chloroform (1:1 (v/v); pH 7-8) intensiv gemischt. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge erfolgte Trennung der Phasen: Die obere wässrige Phase, welche die DNS enthält, wurde in

ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Extraktionsvorgang mit einem Volumenteil Chloroform noch einmal wiederholt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Zur wässrigen Phase wurden 20 µl 3 M Natriumazetat und 400 µl Ethanol 100 % (v/v) zugegeben, der Ansatz gemischt, die cDNS bei -20 °C über Nacht ausgefällt und bei 13000 rpm für 1 Stunde sedimentiert. Die cDNS wurde dann mit 500 µl Ethanol 70 % (v/v) für 2 min bei 13000 rpm gewaschen und anschließend getrocknet.

LIGATION DER ECOR I-ADAPTER

EcoR I-Adapter: 5`-OH-AATTCGGCACGAGG-3`
3`-GCCGTGCTCCp-5`

Die cDNS wurde in 9 µl EcoR I-Adapter-Lösung (0,4 µg/µl) aufgenommen, dann wurden hinzupipettiert:

1 µl 10 x Ligasepuffer
1 µl 10 mM rATP
1 µl T4 DNS Ligase (4 U/µl)

Die Ligation erfolgte 2 Tage lang bei 4 °C. Danach wurde die Ligase bei 70 °C 30 min im Wasserbad inaktiviert.

PHOSPHORYLIERUNG DER ECOR I ENDEN

Zum auf Raumtemperatur temperierten Ligationsansatz wurden zugegeben:

1 µl 10 x Ligasepuffer
2 µl 10 mM rATP
5 µl H₂O
2 µl T4 Polynukleotid-Kinase (5,0 U/µl)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss die Kinase 30 min bei 70 °C inaktiviert.

ENZYMATISCHE MODIFIKATION MIT XHO I

Dem Reaktionsansatz wurden zupipettiert:

28 µl Xho I buffer supplement
3 µl Xho I (40 U/µl)

Es folgte eine Inkubation für 1,5 Stunden bei 37 °C.

Dann wurden 5 µl STE-Puffer und 125 µl 100 % (v/v) Ethanol in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und die cDNS über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurde die cDNS bei 13000 rpm und 4 °C 1 h pelletiert, das Pellet getrocknet und in 14 µl STE-Puffer aufgenommen. Schließlich wurden noch 3,5 µl Column-Loading Dye hinzupipettiert.

GRÖSSENFRAKTIONIERUNG DER CDNS

Die Autrennung der cDNS-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte durch Gelchromatographie auf einer 1-ml-Säule. Als Säule wurde eine Pipette verwendet, die mit CL-2B Sepharose gefüllt und mit STE-Puffer äquilibriert wurde. Danach wurde die cDNS (17,5 µl in STE-Puffer) auf die Säule geladen. Nach dem Einlaufen der cDNS wurden 3 ml STE-Puffer auf die Säule pipettiert. Als die Lauffront die -0,4 ml-Markierung der Pipette erreicht hatte, wurden 13 Fraktionen zu je 3 Tropfen (ca. 100 µl) gesammelt, bis die Lauffront bei der 0,3 ml-Markierung angelangt war. Die Fraktionen wurden zur Entfernung von

Proteinresten mit Phenol-Chloroform (1:1 (v/v); pH 7-8) extrahiert und die cDNS wurde mit zwei Volumenteilen Ethanol 100 % (v/v) über Nacht wie beschrieben gefällt, gewaschen und in 3,5 µl H₂O suspendiert. Die cDNS konnte in den einzelnen Fraktionen aufgrund des eingebauten α-³²-dATPs mittels eines Szintillationszählers identifiziert werden. Die cDNS-Quantifizierung erfolgte zusätzlich durch Färbung mit Ethidiumbromid und Photometer.

Die cDNS aller Fraktionen wurden auf PAGE-Gelen aufgetrennt, und aufgrund des eingebauten ³²P detektiert. Da zu Beginn 2 x 12 µg mRNA eingesetzt worden waren, existierten zwei parallele Ansätze, welche als Ansatz A und Ansatz X bezeichnet worden waren. Die Größen-fractionierte cDNS wurde zu drei Ansätzen vereinigt: cDNS > 1000 bp (Fraktionen 5A+6X), cDNS ~1000 bp (Fraktionen 7A+8X) und cDNS <1000 bp (Fraktionen 8A+9X).

LIGATION DER CDNS-FRAGMENTE IN DAS PTRG-PLASMID

Vor der Ligation im präparativen Maßstab wurde zuerst eine Test-Ligation mit 30 ng Ansatz 7A+8X und 30 ng pTRG XR, Gesamtvolumen 5,4 µl durchgeführt. Die anschließende Test-Transformation mit 1,6 µl des Ligationsansatzes in 100 µl kompetente Zellen wurde wie unten beschrieben durchgeführt. Nach Ausplattieren auf LB-Agar wurden 2,2 x 10⁵ Kolonien pro µg Plasmid erhalten. Bei einer Transformationseffizienz des Test-Ligationsansatzes von 1 x 10⁵ sind laut Stratagene zwei Ligationen im präparativen Maßstab ausreichend. Hierzu wurde für jeden der drei Ansätze 5A+6X, 7A+8X und 8A+9X eine Ligation durchgeführt.

Reaktionsansatz:

X µl	cDNS (~ 145-155 ng; Verhältnis 3 Teile Plasmid-DNS: 1 Teil Insert-DNS)
3 µl	10 x Ligasepuffer
3 µl	10 mM ATP
1,5 µl	pTRG XR (150 ng, Xho I und EcoR I geschnitten)
ad 27 µl	H ₂ O
3 µl	T4 DNS-Ligase (4 U/µl)

Es wurde für 16 Stunden bei 12 °C ligiert.

Die Ligationsansätze wurden vereinigt, die Plasmid-cDNS ausgefällt und quantifiziert. Eine Amplifikation dieser cDNS wurde nicht durchgeführt; sondern direkt zu einer Test-Kotransformation eingesetzt.

7.6 DURCHSUCHUNG DER PLAZENTA-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

Die Bibliothek wurde auf einen Interaktionspartner für den Carboxyterminus („C-Terminus“) des humanen TRPV6-Proteins hin durchsucht. Die inserierte DNS wurde zuvor durch Sequenzierung auf Leserahmen und Sequenz überprüft. Eine Proteinexpression mit C-Terminus/pBTL aus einer beimpften Vorkultur wurde gemäß Stratagene-Protokoll durchgeführt. Durch eine Negativkontrolle wurde ausgeschlossen, dass hTRPV6-C-Terminus/pBTL alleine die Transkription der Reportergene des Bacteriomatch[®]-Systems aktivierte.

HITZESCHOCK-KOTRANSFORMATION DER VEREINIGTEN BIBLIOTHEK AX

Zuerst wurde eine Test-Kotransformation in „XL-1 Blue MRF`Kan Library Reporter Competent Cells“ durchgeführt: Hierzu wurden 100 µl der Zellen auf Eis aufgetaut und in einem 14 ml-Polypropylen-Röhrchen mit 2 µl β-Mercaptoethanol 10 min inkubiert. Dann wurden 60 ng cDNS in pTRG und 50 ng hTRPV6-C-Terminus in pBTL zupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 33 sec, Eisinkubation für 2 min und Zugabe von 0,9 ml SOC-Medium. Die Zellen wurden für 1,5 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf vier LB-TCK-Platten (Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin) ausplattiert. Nach Inkubation bei 30 °C für 24 Stunden wurden die Kolonien ausgezählt. Nach dem gleichen Schema wurde die restliche cDNS in pTRG (~1350 ng), verteilt auf elf Transformationsansätze mit 1500 ng hTRPV6-C-Terminus/pBTL kotransformiert. Pro Ansatz wurden 122 ng cDNS/pTRG und 136 ng hTRPV6-C-Terminus/pBTL in 100 µl kompetente Zellen wie oben beschrieben kotransformiert und auf 22 LB-CTCK-Agarplatten (Durchmesser 150 mm) mit 250 µg/ml Carbenicillin ausplattiert. Eine Kontrolle auf Aktivierung des zweiten Reportergens β-Galaktosidase erfolgte durch Überführen der Kolonien auf LB-CTCK-Agarplatten mit X-Gal/IPTG.

PRÄPARATION DER AUF LB-CTCK GEWACHSENEN KOLONIEN

Von allen Kolonien wurden LB-Medium-Vorkulturen angeimpft, die Bakterien vermehrt und daraus die DNS präpariert. Die DNS wurde mit EcoR I und Xho I geschnitten und nach Agarose-Gelelektrophorese die Größe der im pTRG-Plasmid enthaltenen cDNS-Fragmente erfasst.

SEQUENZANALYSE

Alle auf LB-CTCK-Agar mit X-Gal/IPTG gewachsenen, blauen Kolonien wurden durch Sequenzierung auf den richtigen Leserahmen hin überprüft.

RETEST DER INTERAKTION VON KLONEN MIT RICHTIGEM LESERAHMEN

Die Isolierung des rekombinanten pTRG-Plasmids, das ein Tetracyclin-Resistenzgen enthält, erfolgte durch Selektion mithilfe von Tetracyclin. Um das pTRG-Plasmid (Tetracyclin-Resistenz) aus einem mit pTRG und pBTL kotransformierten Bakterienklon zu isolieren, wurde der Klon in einer 5 ml-Kultur mit 15 µg/ml Tetracyclin inkubiert und die Plasmid-DNS anschließend isoliert. Diese DNS wurde dann in den Bacteriomatch®-Reporterstamm „XL-1 Blue MRF`Kan“ transformiert und auf LB-Tetracyclin-Agar ausplattiert. Eine Kolonie von dieser Platte wurde ein zweites Mal in einer 5-ml-Kultur mit 15 µg/ml Tetracyclin kultiviert und das rekombinante pTRG-Plasmid anschließend isoliert und quantifiziert.

Dann wurden die Protein-Protein-Interaktionen durch Retransformation überprüft. Hierzu wurde das rekombinante pTRG-Plasmid durch Elektroporation einmal mit dem leeren pBTL-Plasmid in den Bacteriomatch®-Reporterstamm kotransformiert, um zu testen, ob das rekombinante pTRG alleine die Transkription der Reportergene des Bacteriomatch®-System aktiviert (Negativkontrolle). In einer zweiten Kotransformation mit dem TRPV6-C-Terminus/pBTL wurde auf Interaktion mit TRPV6 getestet.

7.7 AMPLIFIKATION EINER PANKREAS-CDNS-BIBLIOTHEK

Eine cDNS-Bibliothek aus humanem Pankreas, die bereits in das pTRG-Plasmid inseriert und zur Anwendung im Bacteriomatch® II-System bestimmt war, wurde von Stratagene erworben. Es handelte sich um eine bereits amplifizierte Bibliothek (1×10^9 cfu/ml), die $1,82 \times 10^6$ unabhängige Klone enthalten sollte. Zur Isolierung der rekombinanten pTRG-Plasmide mussten zuerst die Bakterien vermehrt werden. Führt man diesen weiteren Amplifikationsschritt in einer Flüssigkultur durch, besteht die Gefahr, dass sich die ursprünglichen Plasmid-Mengenverhältnisse innerhalb der Bibliothek zugunsten der Plasmide mit kleinen inserierten Fragmenten verschieben, da Klone mit kleineren Fragmenten sich schneller vermehren. Es wurde deshalb eine Amplifikation in halbfestem Agar vorgenommen.

7.7.1 BAKTERIENAMPLIFIKATION IN HALBFESTEM AGAR

Diese Methode wird auch als „Solid State Preparation“ bezeichnet (Kriegler, 1990). Bakterien werden in einer halbfesten Agarose-Gel-Matrix suspendiert und wachsen unter anaeroben Bedingungen, bis das Nährmedium in direkter Umgebung verbraucht ist. So erreichen alle Kolonien unabhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit eine ähnliche Größe, die langsam wachsenden werden nicht benachteiligt.

Im Einzelnen wurden acht Liter SeaPrep-Agarose-Medium in acht 1-Liter-Flaschen 45 min autoklaviert, auf 37 °C temperiert, dann 15 µg/ml Tetracyclin und 1,4 µl Bibliothek-Bakterienstock ($=8,2 \times 10^5$ cfu/l, Maximum: 2×10^6 cfu/l) zugegeben. SeaPrep Agarose geliert erst bei 8-11 °C, deshalb wurden die Ansätze 3 h in Eiswasser verfestigt und bei 30 °C unter anaeroben Bedingungen, d.h. bei dicht geschlossenem Deckel, inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde kontrolliert, indem Proben entnommen und auf LB-Agar mit 15 µg/ml Tetracyclin ausplattiert wurden. Diese Werte wurden mit zuvor ermittelten Test-Wachstumskurven verglichen.

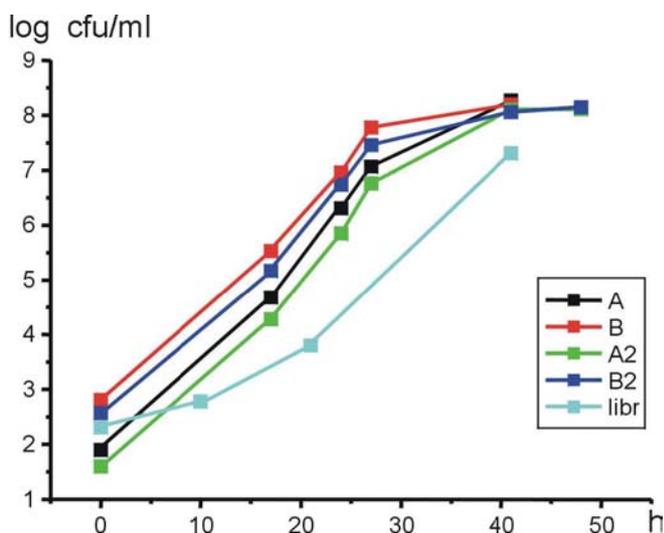


Abbildung 6: Bakterien-Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen. Mit A, B, A2, B2 sind verschiedene Wachstums-Testreihen bezeichnet; Die Wachstumskurve der Pankreas-Bibliothek ist mit „libr“ bezeichnet.

Die Ernte der Bakterien erfolgte nach 40 h in der Wachstumsphase. Die Kulturansätze wurden in Zentrifugenbecher überführt und die Bakterien bei 21 °C und 12000 x g 25 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 4 ml LB-Medium suspendiert, vereinigt und mit 10000 x g für 15 min zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden auf sechs 30 ml-Corex Röhrchen verteilt und eine Qiagen Plasmid Maxi Präparation wie oben für Low-Copy-Plasmide beschrieben durchgeführt.

2 x LB-Medium, pH 7,0-7,2

2 % (w/v)	Caseinhydrolysat (Pepton)
1 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl

SeaPrep-Agarose-Medium

2xLB-Medium versetzen mit
0,3 % (w/v) SeaPrep Agarose (Biozym)
45 min bei 121 °C, 1,2 bar autoklavieren.
Im Wasserbad auf 37 °C abkühlen.
Agarose 2-3 Stunden bei 4 °C in Eiswasser fest werden lassen.

7.8 DURCHSUCHUNG DER AMPLIFIZIERTEN PANKREAS-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH® II-SYSTEM

Die Bibliothek wurde nach einem Interaktionspartner für den Carboxyterminus des humanen TRPV6-Proteins durchsucht. Durch eine Negativkontrolle wurde zuvor ausgeschlossen, dass der hTRPV6-Carboxyterminus im pBTL-Plasmid (hTRPV6-C-Terminus/pBTL) alleine die Transkription der Reportergene des Bacteriomatch® II-Systems aktivierte.

KOTRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION DER HUMANEN PANKREAS BIBLIOTHEK

Zuerst wurde eine Test-Kotransformation von je 50 ng hPankreas-cDNS/pTRG und hTRPV6-C-Terminus/pBTL in „Bacteriomatch® II Electrocompetent Reporter Cells“ (Stratagene, #200195) wie unten beschrieben durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf nichtselektivem No-3-AT-Agar plattiert und die Kolonienzahl ermittelt. So wurde festgestellt, wie viele Transformationsansätze theoretisch zur Erfassung der gesamten Bibliothek benötigt werden.

Im Anschluss wurden 10 Kotransformationen nach folgendem Protokoll durchgeführt: Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 50 ng amplifizierte hPankreas-DNS im pTRG-Plasmid und 50 ng hTRPV6-C-Terminus im pBTL-Plasmid wurden zu 40 µl elektroporationskompetenten Bakterien pipettiert und gemischt und anschließend wie beschrieben eine Elektroporation durchgeführt. Es folgte die Umbettung der Bakterien in das Minimalmedium: hierzu wurden die Bakterien bei 3500 rpm 10 min sedimentiert und nach Dekantierung des SOC-Mediums in 1 ml M9⁺ His-Dropout Broth suspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach einer dritten Zentrifugation bei 3500 rpm, 10 min wurden die Bakterien in 1 ml M9⁺ His-Dropout Broth suspendiert und 2 Stunden bei 200 rpm und 37 °C an das Minimalmedium adaptiert. Alle 10 Kotransformationsansätze wurden vereinigt und jeweils 500 µl auf insgesamt 18 Petrischalen (Durchmesser 150 mm) mit 5 mM 3-AT-Agar plattiert. Die Platten wurden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend noch 16 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur, bis Kolonien sichtbar waren. Im Anschluss wurden alle Kolonien auf 7 mM 3-AT-Agarplatten mit Streptomycin überführt und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

7.9 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

7.9.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle die Kultur der eukaryotischen Zellen betreffenden Arbeiten wurden unter einer Reinraumwerkbank mit sterilen Pipetten, Zellkulturflaschen und Medien von Frau Heidi Löhr durchgeführt.

HEK293

HEK293-Zellen (CRL-1573, ATCC, Manassas, VA USA) wurden in *Minimal Essential Medium* (MEM, Invitrogen) kultiviert, dem 10 % fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen) zugesetzt waren. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach der Behandlung mit Trypsin.

HEK293-TSA201

HEK293-tsA201-Zellen (HEK293-Zellen, transfiziert mit großem SV 40 T-Antigen, ECACC Katalog No. 85120602) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Invitrogen) kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte mit Trypsin.

Die HEK293-tsA201-Zellen exprimieren das große SV 40 T-Antigen stabil. Das SV 40 große T-Antigen bindet an den SV 40 *Origin of Replication* der Expressionsplasmide. Dies führt zu verstärkter intrazellulärer Plasmidexpression und somit auch zu einer erhöhten Gen- und Proteinexpression im Vergleich zu den ursprünglichen HEK293-Zellen.

ZELLINIEN, DIE TRP-PROTEINE STABIL EXPRIMIEREN

Klonale HEK293 1d hTRPV6b-Zellen.

Klonale HEK293 A3 hTRPM8-Zellen.

Beide Zelllinien wurden von Frau Heidi Löhr hergestellt.

7.9.2 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNS in eukaryotische Zellen eingebracht; dies geschieht mithilfe von Transfektionsreagenzien wie beispielsweise Polyfect (Qiagen) oder Fugene. Polyfect (Qiagen) ist ein aktiviertes Dendrimer mit sphärischer Struktur. Von einem zentralen Kern gehen strahlenförmige Zweige aus, deren Enden aus positiv geladenen Aminogruppen bestehen. Durch die Assoziation mit Polyfect erhält die DNS eine kompakte Struktur, welche das Eindringen der DNS in die Zelle erleichtert. Fugene 6 (Roche) ist eine Mischung verschiedener nicht-liposomenbildender Lipide.

TRANSFEKTION MIT POLYFECT BZW. FUGENE

Die Transfektion erfolgte 24 h nachdem die Zellen in Schalen (Durchmesser 3,1 cm) ausgesät worden waren und zu 60-70 % konfluent waren. Pro Schale wurden zuerst 2-3 µg Plasmid-DNS mit 100 µl Optimem-1 Medium/Glutamax-I (Invitrogen) gemischt; anschließend wurden 9 µl Polyfect-Reagenz zugegeben und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen in der Schale wurden 1,5 ml

Zellkulturmedium pipettiert, zum Transfektionsansatz 600 µl. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Pro Schale wurden zuerst 6 µl Fugene 6 (Roche) direkt in 100 µl Optimem-1 Medium/Glutamax-I (Invitrogen) pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, nicht mit dem Kunststoff des Reaktionsgefäßes in Kontakt zu kommen, um die Transfektionseffizienz nicht zu reduzieren. Dann wurden 2-3 µg Plasmid-DNS zugegeben und der Ansatz für 15-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml frischem Zellkulturmedium versehen und das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben.

7.9.3 KO-IMMUNPRÄZIPITATION VON PROTEINEN

Diese Methode dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Protein X wird dieses Protein präzipitiert und anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wird das Protein auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Für den Fall, dass andere Proteine Y, Z, ..., mit dem Protein X assoziiert sind, werden auch diese aufgetrennt und transferiert. Sie lassen sich mit dem entsprechenden Antikörper Y, Z, ..., nachweisen.

Transfizierte HEK293-Zellen wurden aus acht konfluent bewachsenen Schalen mit insgesamt 60 cm² geerntet. Zur Ernte wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg/ml Trypsin, 0,2 mg/ml EDTA) für eine Minute inkubiert. Dadurch kommt es zur Ablösung der Zellen, die nach Zugabe von 700 µl Medium suspendiert wurden. Die Zellen wurden mit 1200 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, das Sediment mit 10 ml PBS gewaschen und erneut mit 1200 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das gesamte Experiment wurde bei 4 °C durchgeführt. Außerdem wurden Proteaseinhibitoren hinzugegeben. Die Zellen wurden in 1 ml RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. RIPA-Puffer enthält Detergenzien wie Deoxycholsäure, Nonidet P40 und Natriumdodecylsulfat, wodurch die Zellen lysiert werden. Das Zellysate wurde sukzessive jeweils 10 mal durch 0,7 mm-, 0,55 mm- und 0,4 mm-Kanülen geschert. Anschließend wurden 50 µl des Lysates für eine Proteinfällung abgenommen, der Rest wurde bei 4 °C für 15 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Um eine unspezifische Bindung der Proteine des Zellysates zu erkennen wurden 80 µl Protein A Sepharose jeweils 3 mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, dann mit dem Zellysate-Überstand für 2 h bei 4 °C in einem Schüttler (Vibrax-VXA, IKA) inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert. Der Überstand bzw. das Zellysate wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 2-6 µg des affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpers bei 4 °C im Schüttler über Nacht inkubiert. Die sedimentierte Sepharose wurde 5 mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und anschließend mit 80 µl 2 x Laemmli-Puffer bei -20 °C eingefroren. Mit diesem Ansatz wird kontrolliert, inwieweit das gesuchte Protein auch ohne Antikörper an die Sepharose bindet.

Dem Zellysate/Antikörper-Gemisch wurden 80 µl gewaschene Sepharose A zugesetzt und der Ansatz für 2 Stunden bei 4 °C im Schüttler inkubiert. Hierbei bindet das Protein A der Sepharose den Fc-Teil des Antikörpers, wobei Protein A sich gut zur Bindung polyklonaler Antikörper eignet. Im nächsten Schritt wurde die Sepharose in der Zentrifuge sedimentiert und 20 µl des Überstands wurden als Kontrolle abgenommen, mit 20 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C eingefroren. Das Sediment, welches

Protein A, den gebundenen Antikörper sowie Proteine, die von diesem Antikörper erkannt werden enthielt, wurde 5 mal für 2 min mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, die Proteine in 80 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und der Ansatz bei -20 °C eingefroren.

Zur Präzipitation mit einem monoklonalen Antikörper wurden folgende Schritte abgewandelt: Für die Bindung des monoklonalen GFP-Antikörpers (Roche) wurde ein ein Protein A/G-Gemisch eingesetzt. Zur Präinkubation wurden 100 µl Protein A/G Sepharose-Gemisch (1:1) 3 mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und 2 Stunden oder über Nacht mit dem Zellysate-Überstand bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte Zugabe von 6 µg affinitätsgereinigtem monoklonalem Antikörper und Inkubation des Ansatzes für 3 Stunden bei 4 °C im Schüttler. Anschließend wurden 100 µl Protein A und G Sepharose-Gemisch (1:1) 3 mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, zu dem Ansatz pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinen sedimentiert, der Überstand zur Kontrolle entnommen, die sedimentierten Proteine 5 mal für 2 min mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, in 80 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

RIPA-Puffer

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl, pH 8
0,5 %	Natriumdeoxycholat
1 %	Nonidet P40
0,1 %	SDS
5 mM	EDTA, pH 8

2 x Laemmli-Puffer

<u>(Proteinauftragspuffer) pH 6,8</u>	
8 % (w/v)	SDS
120 mM	Tris-HCl
20 % (v/v)	Glycerol
10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

Proteaseinhibitoren

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

7.9.4 PROTEINFÄLLUNG

Zur Aufkonzentrierung können Proteine aus Lösungen oder Lysaten ausgefällt werden:

FÄLLUNG MIT TRICHOLORESSIGSÄURE (TCA)

Ein Volumenteil Proteinlösung wurde mit einem Volumenteil 40 % (w/v) TCA gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, das Proteinpellet zweimal mit Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

FÄLLUNG MIT ACETON/METHANOL

Ein Volumen Proteinlösung wurde mit zwei Volumenteilen Aceton vermischt, der Ansatz für 10 min bei 4 °C inkubiert und die Proteine anschließend bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit vier Volumenteilen Methanol wurden die sedimentierten Proteine luftgetrocknet und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

7.9.5 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteingemische in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

SDS ist negativ geladen und bildet mit Proteinen Komplexe mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis, welche sich nur noch in ihrer Größe unterscheiden. In einem großporigen Sammelgel werden die Proteine fokussiert, im kleinporigen Trenngel aufgetrennt. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 30-120 kD eignen sich 10 %ige Trenngele.

Vor Auftrennung durch SDS-PAGE wurden alle Proteine für 3 min bei 95 °C denaturiert, nur hTRPV6 wurde für 30 min bei 37 °C denaturiert. Die hitzedenaturierten, mit 2 x Laemmli-Proteinauftragspuffer versetzten Proteinproben und ein Protein-Größenstandard wurden in die Geltaschen geladen; die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80 V, danach wurde die Spannung auf 150 V hochgesetzt.

Stammlösungen/Ausgangsstoffe	10 %iges Trenngel	Stammlösungen/Ausgangsstoffe	6,5 %iges Sammelgel
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml	4 x Sammelgelpuffer	1,25 ml
40 % (w/v) Acrylamid: N, N'-Methylenbisacrylamid (29:1)	2,5 ml	40 % (w/v) Acrylamid: N, N'-Methylenbisacrylamid (29:1)	0,81 ml
H ₂ O	4,91 ml	H ₂ O	2,9 ml
APS 10 %	75 µl	APS 10 %	37,5 µl
TEMED	15 µl	TEMED	7,5 µl

4 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4 % SDS

4 x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,4 % SDS

10 x SDS-Elektrophoresepuffer, pH 8,3

1 % (w/v) SDS
250 mM Tris
1,92 M Glycin

7.9.6 COOMASSIE-FÄRBUNG

Mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 können Proteinmengen ab 0,2 µg in Gelen sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurde das Polyacrylamidgel 30-60 min lang erst in der Färbelösung und anschließend in der Entfärbelösung inkubiert.

Coomassie-Färbelösung

0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
45 % Ethanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung

6 % (w/v) Ethanol
9 % (w/v) Essigsäure

7.9.7 WESTERN-BLOT ANALYSE

Mit dieser Methode werden Proteine aus Gelen elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und anschließend mit einem Antikörper detektiert. Es wurde eine Nitrozellulosemembran eingesetzt; diese besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität und eignet sich für Proteinfärbungen.

Das Gel wurde luftblasenfrei in Kontakt zur Nitrozellulosemembran gebracht, in einer Kunststoffkassette fixiert und in die Blotting-Apparatur (Mini Trans-Blot, Bio-Rad) eingebaut. Die Kammer der Apparatur wurde mit Puffer gefüllt und die Proteine für 1,5 Stunden bei 350 mA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Die vorgefärbten Proteinstandards wurden auf der Membran markiert und freie Bindungsstellen der Membran durch eine Stunde Inkubation in Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit den transferierten Proteinen für 16 Stunden bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert.

Blotting-Puffer pH 8,3

1 % (w/v)	SDS
250 mM	Tris-HCl
1,92 M	Glycin
20 % (w/v)	Methanol

Blockierungspuffer

5 % (w/v)	Magermilchpulver in TBS
-----------	-------------------------

7.9.8 SICHTBARMACHUNG DES GEBUNDENEN ERSTANTIKÖRPERS MITTELS CHEMOLUMINESZENZ

Hierzu wird Luminol, ein zyklisches Diacylhydrazid, unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid und Peroxidase oxidiert. Die Peroxidase ist an den Zweitantikörper gekoppelt. Dieser Zweitantikörper erkennt die Fc-Region des Erstantikörpers, d.h. er bindet nur dort, wo bereits ein Erstantikörper gebunden hat. Der Blot wurde eine Stunde bei 21 °C mit dem Zweitantikörper inkubiert, 2 mal 10 min mit TBST und 2 mal 5 min mit TBS gewaschen. Im Anschluss wurde er für 1 min mit frisch angesetztem Chemolumineszenz-Reagenz (Western Lightning Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus, PerkinElmer) in eine Plastikfolie möglichst blasenfrei eingeschweißt. Die entstehende Lumineszenz wurde mit Röntgenfilmen nach 5 sec bis 45 min detektiert.

10 x TBS-Puffer pH 7,5

500 mM	Tris-HCl
1,5 M	NaCl

1 x TBST-Puffer

0,1 %	Tween 20
ad 1 Liter	1 x TBS

7.9.9 WIEDERVERWERTUNG EINES BLOTS

Die gebundenen Antikörper können durch Inkubation des Blots mit SDS und β -Mercaptoethanol wieder entfernt werden. Hierzu wurde der gewaschene Blot 4 mal für 5 min mit TBST gewaschen und dann 30 min bei 50 °C mit Detergenz-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 6 mal für 5 min in TBST gewaschen und eine Stunde mit Blockierungspuffer inkubiert.

<u>Detergenz-Puffer ("Stripping-Puffer")</u>		<u>Blockierungspuffer</u>	
62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8	5 % (w/v)	Magermilchpulver in TBS
2 % (w/v)	SDS		
0,7 % (v/v)	β -Mercaptoethanol		

7.9.10 PROTEINBESTIMMUNG MIT DEM BCA-REAGENZ

Die Proteinquantifizierung mit Hilfe der BCA-Methode beruht darauf, dass Proteine mit Kupferionen im alkalischen Milieu einen Komplex ausbilden. Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden vermutlich zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonin-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex ausbilden, dessen Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Von der Lösung, deren Proteinkonzentration zu bestimmen war, wurden mehrere Verdünnungen angesetzt, das BCA-Reagenz (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce) wurde gemäß den Angaben des Herstellers frisch angesetzt. Von jeder Verdünnung wurden zwei Ansätze zu je 50 μl mit 300 μl BCA-Reagenz versetzt. Parallel dazu wurden zwei Eichkurven mit BSA (0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angesetzt und ebenfalls von jeder BSA-Eichverdünnung 50 μl mit 300 μl BCA-Reagenz gemischt. Proteinproben und Eichreihen wurden im Schüttler 45 min bei 60 °C inkubiert, anschließend wurden alle Lösungen in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 540 nm im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

7.9.11 OBERFLÄCHEN-BIOTINYLIERUNG

Die Methode dient zur Untersuchung der Oberflächenlokalisierung von Proteinen. Die Vorstellung dabei ist, dass sämtliche extrazelluläre Anteile von Proteinen intakter eukaryotischer Zellen mit NHS-LC-Biotin markiert und anschließend die biotinylierten Proteine nach der Lyse der Zelle mit Avidin-Agarose präzipitiert werden. Nach der Auftrennung der präzipitierten Proteine im SDS-Gel und ihrem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran kann das untersuchte Protein mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden.

Zwölf kleine Kulturschalen mit HEK293 Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion auf Eis platziert und zweimal mit 1 ml PBSB pH 8,0 (4 °C) gewaschen. Es folgte die Biotinylierung mit 0,5 mg/ml Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) für 30 min bei 4 °C auf einer Wippe, anschließend wurde die Reaktion durch wiederholtes Waschen mit PBSB pH 8,0 mit Zusatz von 0,1 % BSA gestoppt und ein weiteres Mal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Zum Ernten wurden die Zellen für 5 min mit PBS pH 7,4 in Gegenwart von 2 mM EDTA inkubiert und anschließend vorsichtig mit einer Pipette suspendiert. Dann wurden sie mit 1000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in 300 μl Lysispuffer bei 4 °C suspendiert und durch Aufziehen in Injektionskanülen (0,7/ 0,55/ 0,4 mm) geschert. Das Zelllysate wurde für 30 min bei 4 °C in einem Schüttler inkubiert und dann für 5 min bei 4 °C

mit 1000 x g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt; 20 µl des Zelllysats-Überstandes wurden mit 20 µl 2 x Laemmli versetzt und bei -20 °C eingefroren. Dieser Ansatz dient als Kontrolle für die eingesetzte Menge des untersuchten Proteins. Im nächsten Schritt wurden 900 µg Protein 3 Stunden bei 4 °C an 150 bis 200 µg Avidin-Agarose (ImmunoPure Immobilized Avidin, Pierce) gebunden. Anschließend wurde der Ansatz mit 1000 x g zentrifugiert, die sedimentierten Proteine mit Lysispuffer, dem 0,25 M NaCl zugesetzt war, viermal gewaschen und hierbei jeweils für 3 min mit 1000 x g zentrifugiert, in 150 µl 2 x Laemmli aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. Vom Überstand wurden 100 µl abgenommen und die enthaltenen Proteine mit TCA gefällt, um festzustellen, wieviel des untersuchten Proteins nicht an die Avidin-Agarose gebunden wurde.

PBS pH 7,4

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,42 g	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O
ad 1 Liter	H ₂ O

PBSB pH 8,0

1 mM	MgCl ₂
0,5 mM	CaCl ₂
ad 1 Liter	PBS

PBSB pH 8,0 mit 0,1% BSA

1 ml	5 % BSA in PBSB
49 ml	PBSB pH 8

Lysispuffer

1 %	Triton X 100
1mM	EDTA
Proteaseinhibitorenmix	
ad 50 ml	PBS pH 7,4

7.9.12 SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ist eine weitere Methode zur Auftrennung von Proteinen oder Proteinkomplexen, wobei die nativen Proteine in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten entsprechend ihrer Größe, Form und Dichte aufgetrennt werden. Proteine mit größerem Molekulargewicht sedimentieren hierbei schneller als solche mit kleinerem Molekulargewicht.

Zunächst wurden die Bedingungen definiert, um einen gleichmäßig kontinuierlichen Gradienten zu erhalten. Hierzu wurde Bromphenolblau (finale Konzentration 0,00125% (w/v)) zu einer 30 %igen Saccharose-Lösung gegeben, die mit einer 10 %igen Saccharose zur Herstellung eines kontinuierlichen Gradienten mithilfe eines dafür gebauten Mischers benutzt wurde. Der Gradient wurde anschließend fraktioniert und die Bromphenolblau-Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen bei 580 nm untersucht. Es wurden solche Mischbedingungen gewählt, bei denen die Bromphenolblau-Konzentration aufgetragen gegen die Fraktionen eine Gerade ergab.

Im eigentlichen Experiment wurden HEK293-Zellen aus 4 bis 6 Kulturschalen 2 Tage nach Transfektion wie beschrieben geerntet, lysiert, und das Zelllysats sukzessive geschert und in einem 1 ml-Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Zur Stabilisierung der Proteinkomplexe wurde dann Glycerol in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugegeben und das Zelllysats eine Stunde bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Im Anschluss wurden nicht-solubilisierbare Bestandteile durch Zentrifugieren bei 100000 x g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der Gradientenpuffer wurde auf Eis mit Proteaseinhibitoren versetzt und daraus eine 10 % (w/v) bzw. 20 %

(v/w) Saccharose-Lösung hergestellt. Mit einem Gradientenmischer wurden aus beiden Saccharoselösungen zwei kontinuierliche 10 bis 20 prozentige Gradienten in Ultrazentrifugenröhrchen (11,2 ml) hergestellt.

300 µl der solubilisierten Proteine wurden auf den ersten Saccharosegradienten geschichtet, 300 µl eines Markerprotein-Gemisches (siehe unten) auf den zweiten und beide in einem NVT 65-Festwinkel-Rotor bei 4 °C zentrifugiert. Um zu verhindern, dass der Gradient bei der Umorientierung im Vertikalrotor zerstört wird, wurde die Zentrifuge langsam angefahren (vier Minuten um von 0 auf 170 rpm zu beschleunigen) bzw. abgebremst (vier Minuten um von 170 rpm auf 0 abzubremesen). Der eigentliche Lauf wurde mit 200000 x g für 90 min durchgeführt. Danach wurden 18 Fraktionen zu jeweils 620 µl in Eppendorfgläser gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 35 µl in ein weiteres Eppendorfglas überführt und mit 5 x Laemmli-Puffer versetzt, sowie 250 µl bzw. 550 µl mit TCA gefällt und in 30 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proteine dieser Proben wurden anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Im nächsten Schritt wurde ein Western-Blot durchgeführt. Mit dem Gradienten, der die Markerproteine enthielt, wurde ebenso verfahren. Allerdings wurden die Markerproteine nach SDS-Gelelektrophorese direkt mit Coomassie angefärbt.

Alternativ wurden tsA201-Zellen aus 20 Schalen geerntet, und mikrosomale Proteine aus den Zellen nach einer von Lockwich beschriebenen Methode präpariert. Zu den mikrosomalen Proteinen wurden 200 µl Solubilisierungs-Puffer mit Proteaseinhibitoren und Glycerol in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) gegeben und die Proteine wie beschrieben solubilisiert. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation und die weitere Analyse, wobei ein anderer Probenpuffer (5 x Laemmli-Puffer „Spezial“) verwendet wurde. Die Proteine wurden vor der Elektrophorese nicht für 30 Minuten bei 37 °C, sondern für vier Minuten bei 95 °C inkubiert.

Markerproteine	nativ	denaturiert	eingesetzt pro Gradient
Thyroglobulin	670 kDa	670 kDa	0,5 mg
Ferritin	440 kDa	19 bzw. 21 kDa	1,0 mg
Katalase	240 kDa	60 kDa	1,0 mg
β-Galactosidase	116 kDa	116 kDa	0,1 mg

Solubilisierungspuffer

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl pH 8
0,5 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
5 mM	EDTA

Gradientenpuffer

20 mM	Tris-HCl
5 mM	EDTA
0,1 % (w/v)	Triton X-100

5 x Laemmli-Puffer „Spezial“

(modifizierter Proteinauftragspuffer)

20 % (w/v)	SDS
125 mM	Tris-HCl pH 6,8
60 % (v/v)	Glycerol
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
quantum satis	H ₂ O
Zum Lösen erwärmen.	
Vor Gebrauch Zugabe von	
25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

7.9.13 PRÄPARATION MIKROSOMALER PROTEINE NACH LOCKWICH ET AL., 2000

AUSGANGSMATERIAL KULTIVIERTE ZELLEN

HEK293-Zellen aus drei großen Kulturflaschen (je 175 cm²) wurden durch Trypsinieren geerntet, einmal mit PBS gewaschen, sedimentiert und lysiert. Dann wurde das Zelllysate für 20 min bei -80 °C eingefroren, im Eisbad wieder aufgetaut und durch 0,55-mm-Kanülen geschert. 3 ml Zelllysate wurden in einem 30 ml-Corex Röhrchen mit 15 ml Saccharosepuffer (4 °C) versetzt und 15 min bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend für 45 min bei 50000 x g. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die sedimentierten Proteine in 400 µl Saccharosepuffer aufgenommen, der Ansatz durch 0,9 mm- und 0,55 mm Kanülen geschert, portioniert und bei -80 °C als „mikrosomale Proteine“ eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde regelmäßig bestimmt.

AUSGANGSMATERIAL GEWEBE

Plazentagewebe von sechs bis sieben Mäusen wurde in 30 ml-Corex Röhrchen zu je 7 ml Lysispuffer (4 °C) gegeben und mit einem Ultraturax zerkleinert. Zum weiteren Aufschluss wurde das Homogenat bei -80 °C für 20 min gefroren, im Eisbad wieder aufgetaut, mit einem Glas-Teflon-Potter weiter homogenisiert und durch 0,9-mm- und 0,55-mm Kanülen geschert. 3,5 ml des Homogenats wurden in ein 30-ml-Corex Röhrchen mit 17,5 ml Saccharosepuffer (4 °C) gegeben und die oben beschriebenen Zentrifugationsschritte durchgeführt. Diese Präparation wurde von Lockwich et al., 2000 beschrieben.

Lysispuffer pH 8,0

100 mM	Tris-HCl
1 mM	MgCl ₂
0,5 mM	AEBSF
0,1 mM	PMSF

Saccharosepuffer pH 7,4

0,25 mM	Saccharose
10 mM	Tris-HCl
1 mM	DTT
0,3 mM	Aprotinin
0,5 mM	AEBSF
0,167 mM	Pepstatin
0,167 mM	Leupeptin

7.9.14 DEGLYKOSYLIERUNG VON GLYKOPROTEINEN

Transmembranproteine können im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat durch Addition spezifischer Zuckerreste modifiziert werden. Im Endoplasmatischen Retikulum erfolgt zunächst durch N-glykosidische Bindung an einen Asparaginrest die Übertragung eines mannosereichen Oligosaccharids („High-Mannose-Typ“). Danach beginnt der Umbau der Oligosaccharidstruktur, indem terminale Mannose- und Glukosereste entfernt werden. Im Golgi-Apparat werden dann weitere Mannose-Zucker entfernt und stattdessen andere Zuckerreste übertragen („Komplex-Typ“). Anhand des Glykosylierungsmusters kann man also den Reifegrad eines Glykoproteins erkennen. So zeigen unvollständig prozessierte Glykoproteine eine mannosereiche Glykosylierung und vollständig prozessierte Glykoproteine eine komplexe Glykosylierung. Um festzustellen, ob ein Protein glykosyliert ist und zur Bestimmung des Reifegrades eines Glykoproteins wird eine Behandlung mit Glykosidasen durchgeführt. Die Endoglykosidase H oder Endo H spaltet innerhalb eines angehängten Oligosaccharids zwischen den ersten zwei N-Acetylglucosamin-Resten Zuckerketten vom High-Mannose-Typ und vom Hybrid-Typ (Mischung aus High-Mannose- und Komplex-Typ). Die Amidase N-Glykosidase F (NGase F) spaltet alle N-glykosidischen Bindungen zwischen dem

Asparaginrest und der Zuckerkette.

Um festzustellen, ob hTRPM8 ein Glykoprotein ist, wurde eine mikrosomale Proteinfraction aus TRPM8 exprimierenden HEK293-Zellen in Gegenwart von NGase F bzw. Endo H inkubiert. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Mithilfe des anti-TRPM8-Antikörpers sollte nachgewiesen werden, ob sich die elektrophoretische Mobilität des mit Glykosidasen behandelten TRPM8-Proteins verändert hat. Es wurden jeweils zwei Ansätze angesetzt, je einer mit und einer ohne Enzym um unspezifische Effekte allein durch die Inkubation auszuschließen.

Reaktionsansatz NGaseF (Gesamtvolumen 20 µl):

50 µg (3,42 µl)	TRPM8 Mikrosomen
2 µl	10 x Denaturierungspuffer
2 µl	10 x PMSF
4,58 µl	H ₂ O
Gemisch 3 min bei 95 °C denaturieren.	
1 % (w/v) (2 µl)	Nonidet P-40 (NP-40)
2 µl	10 x G7-Puffer
4 µl	NGase F
2 h bei 30 °C im Wasserbad inkubieren.	
20 µl	2 x Laemmli-Puffer
3 min bei 95 °C denaturieren.	

Reaktionsansatz Endo H (Gesamtvolumen 20 µl):

50 µg (3,42 µl)	TRPM8 Mikrosomen
2 µl	10 x Denaturierungspuffer
2 µl	10 x PMSF
6,58 µl	H ₂ O
Gemisch 3 min bei 95 °C denaturieren.	
2 µl	10 x G5-Puffer
4 µl	Endo H
2 h bei 30 °C im Wasserbad inkubieren.	
20 µl	2 x Laemmli-Puffer
3 min bei 95 °C denaturieren.	

Denaturierungs-Puffer

0,5 % (w/v)	SDS
1 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
0,1 mM	PMSF

7.10 MESSUNGEN DER TRPV6-STRÖME

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden von Barbara Niemeyer durchgeführt. Hierzu wurden HEK293- oder HEK-TRPV6-Zellen mit der cDNS des zu untersuchenden Proteins transfiziert. 48-72 Stunden nach der Transfektion wurden Ströme einzelner Zellen bei 22-25 °C in der Ganzzellkonfiguration mit hitzepolierten Patch-Pipetten (3-10 MΩ unkompensierter Serienwiderstand) gemessen. Die Zellkapazität und Serienwiderstände wurden bei jeder Spannungsrampe aufgezeichnet. Die Membranströme wurden bei 1,5 kHz gefiltert und mit einer Abtastfrequenz von 5-10 kHz digitalisiert. Die Ströme der einzelnen transfizierten Zellen wurden mit einem EPC-9 Patch Clamp-Verstärker, kontrolliert durch die Pulse 8.3 Software (HEKA Electronics), aufgenommen. Die Pipettenlösung enthielt 140 mM Aspartat, 10 mM EGTA, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes (pH 7,2 mit CsOH eingestellt). Die Badlösung enthielt 115 mM Triethylammoniumchlorid, 10 mM CsCl, 2,8 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Glukose, 20 mM Hepes (pH 7,4 mit NaOH eingestellt) und 30 mM CaCl₂. In der Ganzzellkonfiguration wurden die Ganzzellströme gemessen, indem ausgehend von einem Haltepotential von +70 mV alle 10 Sekunden 100 ms lange Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV angelegt wurden, bis die Ströme bei -80 mV maximale Werte erreichten. Die Ströme gemessen in pA wurden durch die Kapazität der gesamten Zellen -gemessen in pF- geteilt, um die unterschiedlichen Zellgrößen zu berücksichtigen. Die Daten, die als Standardfehler des Mittelwertes (±S.E.M) angegeben sind, wurden nicht um das „liquid junction-Potential“ korrigiert.

8 ERGEBNISSE

8.1 TRPV6 HOMOMULTIMERISIERUNG

Die cDNS von TRPV6 kodiert für ein aus 725 Aminosäureresten bestehendes Transmembranprotein mit wahrscheinlich sechs Transmembrandomänen. Man geht davon aus, dass Amino- bzw. Carboxyterminus intrazellulär lokalisiert sind und dass zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs eine Porenregion liegt. Die Transmembrandomänen lassen sich aus einem Kyte-Doolittle Hydrophathie-Plot vorhersagen (Kyte and Doolittle, 1982). Im Carboxyterminus befindet sich eine Calmodulin-Bindungsstelle, welche als Sensor für eine kalziumabhängige Regulierung des TRPV6-Kanals fungiert (Niemeyer et al., 2001). Der Amino-terminus enthält als Strukturelemente sechs putative Ankyrin-Repeats (Wissenbach et al., 2001), deren Sequenzen in Abbildung 7 dargestellt sind. Mit dem Algorithmus SMART (siehe Seite 33) werden zwar nur fünf Ankyrin-Repeats festgestellt; dies könnte daran liegen, dass z. B. Ankyrin-Repeat 5 (ANK 5) in der Sequenz von der Ankyrin-Repeat-Konsensussequenz abweicht (Mosavi et al., 2002) (Abbildung 7).



Abbildung 7: Sekundärstruktur und Konsensus-Sequenz der TRPV6 (V6) ANK-Repeats. Ank c¹ zeigt die Konsensus-Sequenz eines künstlich hergestellten Ankyrin-Repeats (Mosavi et al., 2002), Ank c² den Ankyrin-Repeat-Konsensus nach Michaely et al.; + zeigt einen unpolaren Aminosäurerest an. Dunkelgraue Felder kennzeichnen identische Aminosäurereste, hellgraue Felder konservierte Aminosäurereste, eingerahmte Felder zeigen nicht konservierte Stellen an. Unterstrichene Aminosäurereste sind -gemäß der Konsensussequenz- an der konvexen dreidimensionalen Ankyrin-Repeat-Oberfläche lokalisiert (Michaely et al., 2002). Die Zylinder zeigen die Position der beiden helikalen Segmente innerhalb des Ankyrin-Repeats an. Die tiefgestellten Nummern kennzeichnen die Aminosäurereste, mit denen ein TRPV6-ANK-Repeat beginnt und endet, die ganz rechts stehenden Zahlenpaare (X/Y) zeigen an, aus wie vielen Aminosäureresten die beiden putativen Helizes jeweils gebildet werden.

Obwohl Ankyrin-Repeats Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, ist nicht geklärt ob sie bei der Dimerisierung bzw. Multimerisierung von Ionenkanal-Proteinen eine Rolle spielen. TRPV6-Monomere können sich sowohl zu funktionellen homotetrameren als auch zusammen mit TRPV5 zu heterotetrameren

Kanälen zusammenlagern (Hoenderop et al., 2003); welche Aminosäurereste innerhalb des Proteins für den Kanalzusammenbau wichtig sind, ist allerdings nicht bekannt. Um Interaktionsdomänen für den Zusammenbau homomultimerer TRPV6-Kanäle zu identifizieren, wurden Protein-Protein-Interaktionen sowohl durch Ko-Immunpräzipitationen als auch mittels eines Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems untersucht. Für die Ko-Immunpräzipitations-Experimente wurden eine Reihe TRPV6-Fusionsproteine mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) hergestellt. Diese wurden transient in eine Zelllinie transfiziert, die bereits TRPV6 stabil exprimiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Für den Fall, dass beide Proteine -das mit EGFP fusionierte und das „normale“ TRPV6-Protein- aneinander binden, sollte es möglich sein, beide Proteine zu ko-präzipitieren. Außerdem lieferten Untersuchungen mit Oberflächen-Biotinylierung und Fluoreszenzmikroskopie Aussagen über die Lokalisierung einzelner TRPV6-Proteinfragmente in der Zelle. Die Fähigkeit von TRPV6 zur Homomultimerbildung wurde zusätzlich durch Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Es gibt zwei allelische Varianten von TRPV6, welche sich durch die drei Polymorphismen R157C, V378M und T681M unterscheiden. Diese treten immer gekoppelt auf, die RVT-Variante wird als TRPV6a bezeichnet, die CMM-Variante als TRPV6b. Bisher gibt es keine Hinweise, dass sich TRPV6a von TRPV6b funktionell unterscheidet. Alle Experimente dieser Arbeit wurden deshalb nur mit einer Variante, mit TRPV6b von Mensch (GeneBank™ accession number CAC20417) durchgeführt.

8.1.1 UNTERSUCHUNG DER HOMOTYPISCHEN TRPV6-INTERAKTION DURCH KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Als Erstes wurden Ko-Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt, um zu zeigen, dass ein TRPV6-Protein mit einem zweiten TRPV6-Protein interagieren kann. Zur Durchführung dieser Experimente wurde die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie (Seite 59) mit einer cDNS, welche für ein carboxyterminal mit EGFP fusioniertes TRPV6 kodiert, transfiziert. Aus Lysaten dieser Zellen wurde mittels des polyklonalen Antikörpers 429 das „normale“ TRPV6-Protein präzipitiert. Das TRPV6-EGFP-Fusionsprotein dagegen wird von Antikörper 429 nicht gebunden, da das entsprechende Epitop aus dem TRPV6-EGFP-Fusionsprotein deletiert wurde. Wenn TRPV6-EGFP an TRPV6 bindet, wird das Fusionsprotein ko-präzipitiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dann wurde untersucht, ob das TRPV6-EGFP-Fusionsprotein mithilfe eines Antikörper anti-GFP detektiert werden konnte (Abbildung 8).

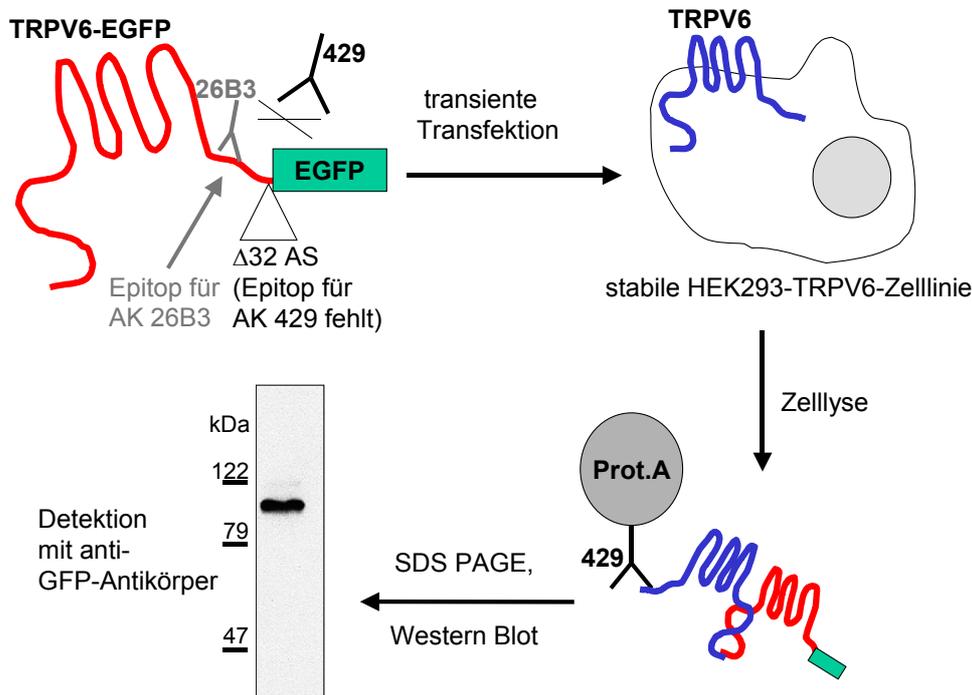


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ko-Immünpräzipitation des TRPV6-Proteins mit dem TRPV6-EGFP-Fusionsprotein. Aus der cDNS eines TRPV6-EGFP-Fusionsproteins wurde die Sequenz, die den letzten 32 Aminosäureresten entspricht, deletiert und somit auch das Epitop für den polyklonalen Antikörper 429 (AK 429), welches innerhalb der letzten 13 Aminosäurereste liegt. Das Epitop für den monoklonalen Antikörper 26B3 (AK 26B3) blieb erhalten. Diese cDNS wurde in eine stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert und ein Lysat dieser Zellen hergestellt. Anschließend wurde das TRPV6-Protein mit Antikörper 429 präzipitiert und der Antikörper samt aller gebundenen Proteine aus dem Lysat isoliert, indem mit Protein A-Sepharose inkubiert wurde. Falls das TRPV6-EGFP-Fusionsprotein an TRPV6 bindet, wird es ko-präzipitiert und kann nach Auftrennung des Proteingemischs im SDS-Gel im Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert werden.

Das Experiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt und es zeigte sich, dass das TRPV6-Fusionsprotein, welches ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa hat, mit dem TRPV6-Protein ko-präzipitierte. Das TRPV6-Protein konnte also mit dem TRPV6-EGFP-Fusionsprotein interagieren (Abbildung 9 A, linke Spur). Durch ein Kontrollexperiment sollte ausgeschlossen werden, dass der Antikörper 429 das TRPV6-Fusionsprotein, welchem wie oben erwähnt das Epitop 429 fehlt, erkennen kann. Hierzu wurde das TRPV6-Fusionsprotein in normale HEK293-Zellen transfiziert und ein Lysat dieser Zellen wie in Abbildung 8 beschrieben behandelt. Im Western Blot war mit einem anti-GFP-Antikörper kein Signal zu erkennen, was zeigt, dass das Fusionsprotein nicht durch Antikörper 429 gebunden wird (Abbildung 9 A, rechte Spur). Auch bei umgekehrter Versuchsanordnung, wenn zur Präzipitation 6 µg anti-GFP-Antikörper eingesetzt wurden und mit Antikörper 429 im Western Blot detektiert wurde, ko-immunpräzipitierten TRPV6 und das TRPV6-Fusionsprotein (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde die Spezifität des Antikörpers 429, dessen Epitop innerhalb der letzten 13 Aminosäurereste von TRPV6 liegt (Hirnet et al., 2003), überprüft. Hierzu wurde das TRPV6-Protein aus

einem Lysat der stabilen HEK293-TRPV6-Zelllinie mit Antikörper 429 präzipitiert. Der Antikörper erkennt sowohl die unglykosylierte Form von TRPV6, welche ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa hat, als auch die glykosylierte Form, deren Molekulargewicht ca. 85 bis 100 kDa beträgt (Abbildung 9 B, linke Spur). Zur Detektion von TRPV6 wurde der monoklonale Antikörper 26B3 eingesetzt, dessen Epitop an Position 669-678 liegt (Abbildung 8). In Lysaten aus HEK293-Zellen, die TRPV6 nicht exprimieren, erkennt der Antikörper 429 kein Protein (Abbildung 9 B, rechte Spur); das heißt der Antikörper erkennt sehr spezifisch TRPV6.

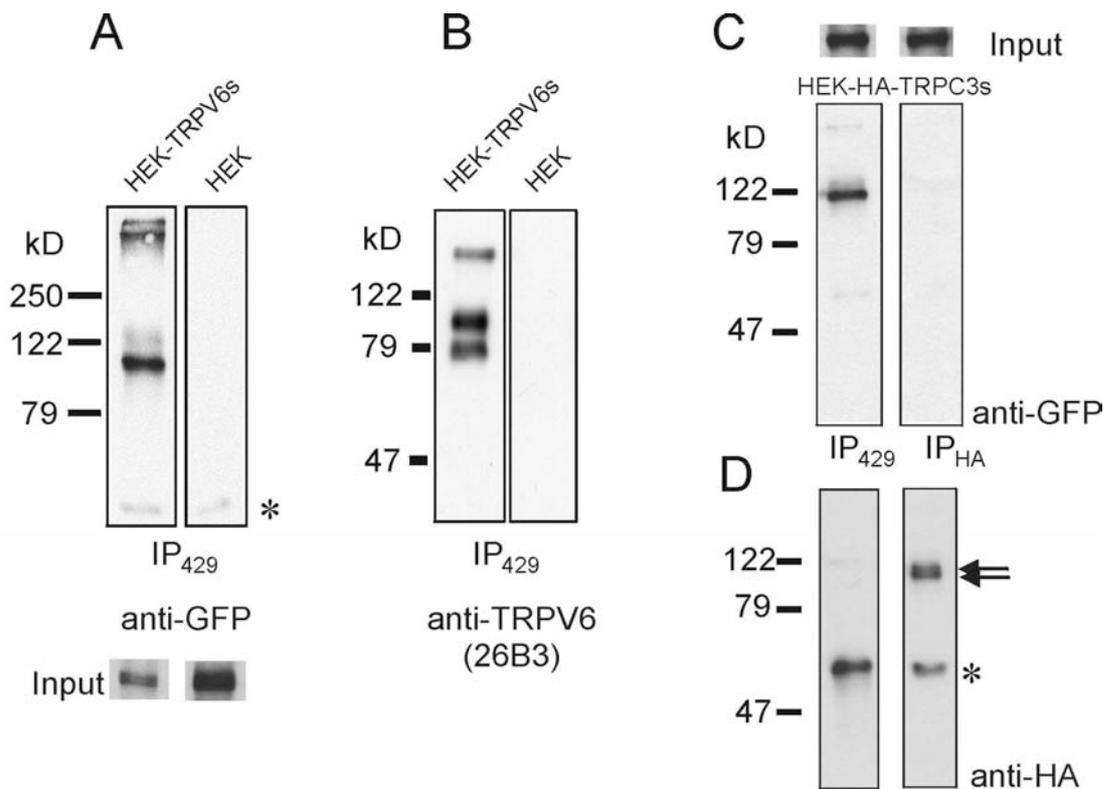


Abbildung 9: Untersuchung der homotypischen TRPV6-Interaktion durch Ko-Immunpräzipitation des TRPV6-Proteins mit einem TRPV6-EGFP-Fusionsprotein, dem das Epitop für den Antikörper 429 fehlt. *A*, linke Spur: nach Transfektion des TRPV6-Fusionsproteins in eine stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie (HEK-TRPV6s) kann TRPV6 mit 2 µg Antikörper 429 präzipitiert werden, wobei das 110 kDa große Fusionsprotein ko-präzipitiert. Rechte Spur: nach Transfektion von TRPV6-EGFP in HEK293-Zellen kann das Fusionsprotein mit Antikörper 429 nicht präzipitiert werden, da ihm das 429-Epitop fehlt. Zur Detektion wurde ein anti-GFP-Antikörper (1:1000) eingesetzt. *B*, linke Spur: zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers 429 wurde TRPV6 aus der stabilen HEK293-TRPV6-Zelllinie (HEK-TRPV6s) mit 2 µg Antikörper 429 präzipitiert, er erkennt glykosyliertes und unglykosyliertes TRPV6 (Hirnet et al., 2003). Rechte Spur: in normalen HEK293-Zellen erkennt der Antikörper 429 kein Protein. Zur Detektion wurde der Antikörper 26B3 (1:100) eingesetzt. *C*, linke Spur: nach Transfektion eines TRPV6-EGFP-Fusionsproteins mit intaktem 429-Epitop in eine HEK293-Zelllinie, die mit Hämagglutinin fusioniertes TRPC3 stabil exprimiert (HEK/HA-TRPC3s), kann TRPV6-EGFP mit Antikörper 429 präzipitiert werden. Rechte Spur: bei Präzipitation von HA-TRPC3 mit einem HA-Antikörper ko-präzipitiert TRPV6-EGFP nicht. *D*, linke Spur: bei Präzipitation von TRPV6-EGFP mit Antikörper 429 ko-präzipitiert HA-TRPC3 nicht. Rechte Spur: mit 3 µg anti-HA-Antikörper lässt sich TRPC3 präzipitierten und mit HA-Antikörper detektieren (Pfeile). * kennzeichnet Banden, die infolge einer unspezifischen Reaktion des Zweitantikörperkonjugates entstehen. IP steht für Immunpräzipitation mit dem jeweils genannten Antikörper.

Außerdem wurde eine weitere Kontrolle für die Spezifität der Ko-Immunpräzipitation von TRPV6 mit Antikörper 429 durchgeführt: In eine HEK293-Zelllinie, welche das mit einer Hämagglutinin-Sequenz fusionierte TRPC3-Protein von Mensch stabil exprimiert, wurde ein TRPV6-EGFP-Fusionsprotein, bei dem das 429-Epitop erhalten war, transfiziert. Aus Lysaten dieser Zellen konnte mit Antikörper 429 das TRPV6-Fusionsprotein präzipitiert werden (Abbildung 9 C, linke Spur), allerdings ko-präzipitierte TRPC3 nicht (Abbildung 9 C, rechte Spur). Umgekehrt konnte einem HA-Antikörpers HA-TRPC3 präzipitiert werden (Abbildung 9 D, rechte Spur), aber das TRPV6-Fusionsprotein ko-präzipitierte nicht (Abbildung 9 D, linke Spur). Obwohl sowohl TRPV6 als auch TRPC3 Ankyrin-Repeats im Aminoterminus enthalten, konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden.

8.1.2 EINGRENZUNG DER INTERAKTIONSTELLE MIT VERKÜRZTEN TRPV6-KONSTRUKTEN

Als Nächstes sollte untersucht werden, welche Proteindomäne innerhalb von TRPV6 für die TRPV6-TRPV6-Interaktion entscheidend ist. Hierzu wurden verkürzte, carboxyterminal mit EGFP fusionierte TRPV6-Fragmente hergestellt und durch Ko-Immunpräzipitation auf Interaktion mit dem Volllängen-TRPV6-Protein getestet. Zunächst wurden nur drei TRPV6-Fragmente getestet: der Aminoterminus, welcher die Ankyrin-Repeats ANK 1 bis 6 enthält, der Carboxyterminus, bei welchem das Epitop für den Antikörper 429 deletiert war, und die intrazelluläre Region zwischen Transmembrandomäne 4 und 5. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde anschließend die Interaktionsregion durch die Herstellung und Untersuchung weiterer verkürzter Fragmente enger eingegrenzt.

HERSTELLUNG DER VERKÜRZTEN KONSTRUKTE

Die verkürzten TRPV6-Fragmente wurden durch PCR-Amplifikation hergestellt. Hierbei wurden zusätzliche Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen und eine Kozak-Sequenz zur Optimierung der Translations-Initiation gefolgt von einem Start-ATG eingefügt. Die Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend in ein pcDNA3-Plasmid mit inserierter EGFP-Sequenz ligiert, so dass TRPV6-Fusionsproteine mit carboxyterminalem EGFP entstanden. Alle Konstrukte wurden sequenziert. Genaue Angaben über die jeweils eingefügten Schnittstellen können der Konstruktliste (Seite 24) entnommen werden. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte.

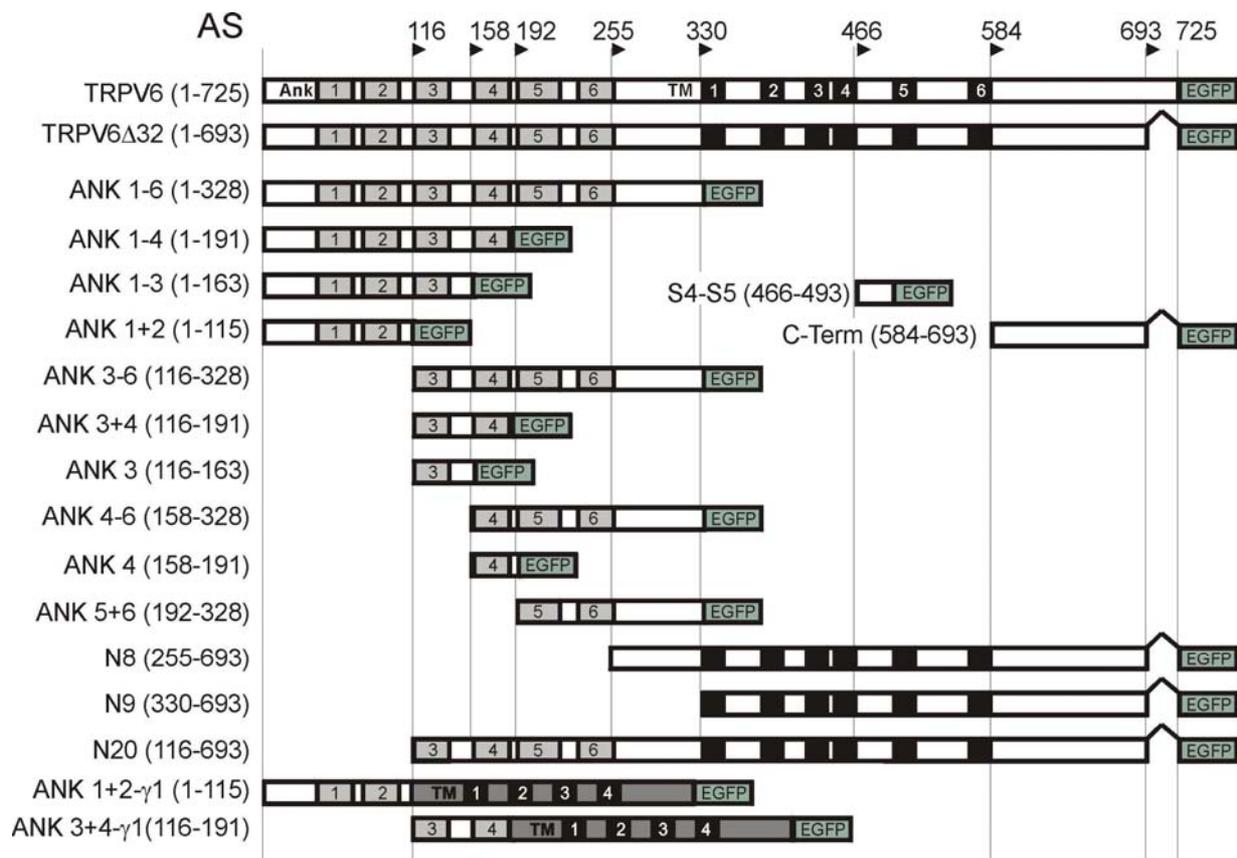


Abbildung 10: Übersicht über die TRPV6-EGFP-Fusionskonstrukte zur Ko-Immunpräzipitation. Die grauen nummerierten Felder kennzeichnen putative Ankyrin-Repeats, die schwarzen Felder putative Transmembrandomänen. Die dachförmige Klammer steht für die Deletion der letzten 32 Aminosäurereste von TRPV6, welche das Epitop für den Antikörper 429 enthalten. Das mit EGFP beschriftete Feld steht für die carboxyterminale Fusion des Proteins mit EGFP. Die Position der Aminosäurereste (AS) ist in Nummern angegeben. Δ bedeutet Deletion.

Zusätzlich zu den verkürzten EGFP-Fusionsproteinen wurden die beiden Konstrukte ANK 1+2/γ1 und ANK 3+4/γ1 hergestellt, die Gründe hierfür werden weiter unten erläutert. Zur Klonierung der beiden Konstrukte ANK 1+2/γ1 und ANK 3+4/γ1 wurde die für die γ1-Untereinheit kodierende cDNS-Sequenz zwischen dem jeweiligen TRPV6-Fragment und EGFP eingefügt (Abbildung 10). Die γ1-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals Ca_v1.1 von Maus ist ein 223 Aminosäurereste umfassendes Protein, welches vier Transmembrandomänen enthält und nicht mit TRPV6 interagiert. Das γ1-cDNS-Fragment wurde mit Mfe I-Schnittstellen versehen und in die beiden mit EcoR I geschnittenen Konstrukte ANK 1+2-EGFP/pcDNA3 und ANK 3+4-EGFP/pcDNA3 ligiert. Dies war möglich, weil die Erkennungssequenzen von EcoR I (GAATTC) und Mfe I (CAATTG) miteinander kompatibel sind.

KO-IMMUNPRÄZIPITATION DER VERKÜRZTEN KONSTRUKTE MIT TRPV6

Die verkürzten TRPV6-Fragmente wurden mittels Ko-Immunpräzipitation auf Interaktion mit dem TRPV6-Protein untersucht. Hierzu wurde die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie mit der cDNS der verkürzten TRPV6-EGFP-Fusionsproteine transfiziert. Aus Lysaten der transfizierten Zellen wurde mit Antikörper 429 das TRPV6-Protein präzipitiert und durch Detektion mit einem anti-GFP-Antikörper festgestellt, ob die verkürzten TRPV6-EGFP-Fusionsproteine ko-präzipitierten.

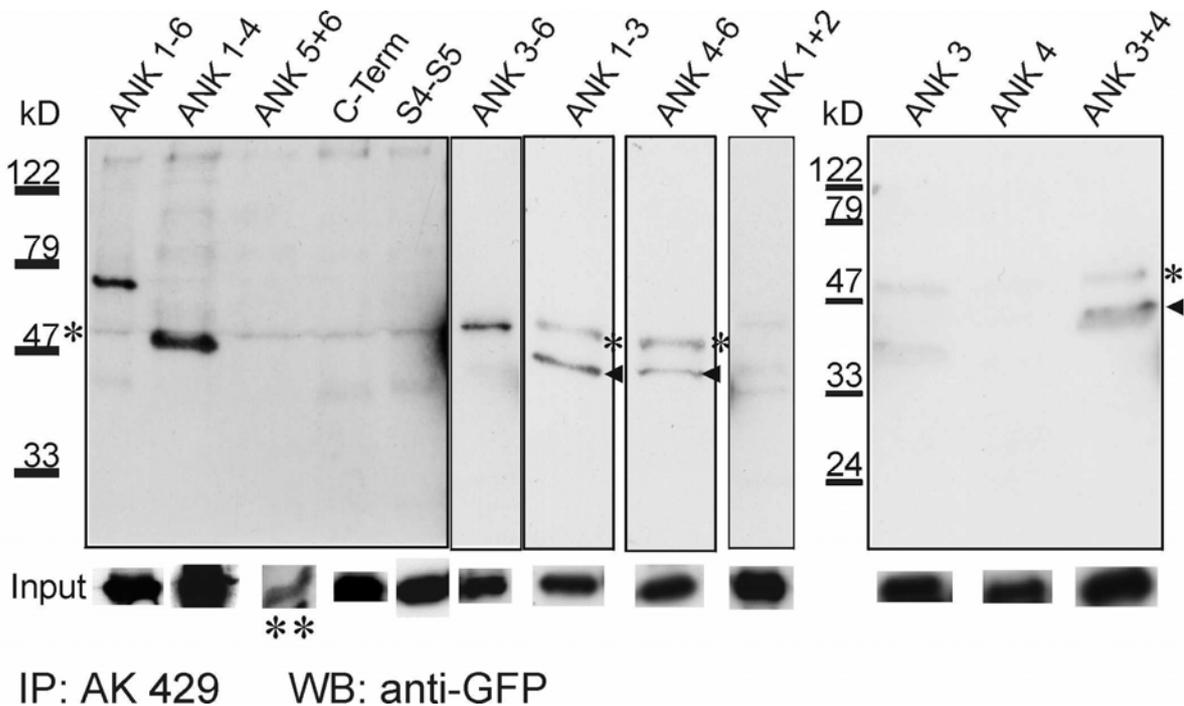


Abbildung 11: Zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne wurden verkürzte TRPV6-EGFP-Fusionsproteine auf ihre Fähigkeit zur Ko-Immunpräzipitation mit TRPV6 untersucht. Zum Präzipitieren wurden jeweils 2 µg Antikörper 429 eingesetzt, zum Detektieren anti-GFP (1:1000). Um die jeweils eingesetzte Menge an Fusionsprotein vergleichen zu können, sind Protein-Fällungen der Zellysate (Input) gezeigt. *unspezifische Bande des Zweitantikörpers. **das schwache Input-Signal ist bedingt durch schwache Expression von ANK 5+6, die in drei unabhängigen Experimenten mit diesem Konstrukt auftrat. IP bedeutet Immunpräzipitation.

Als Erstes wurden das Fragment ANK 1-6, welches den TRPV6-Aminoterminus umfasst, das Fragment C-Term, das den TRPV6-Carboxyterminus umfasst, und das Fragment S4-5, das die intrazelluläre Region zwischen Transmembrandomäne 4 und 5 enthält, auf Interaktion mit TRPV6 untersucht. Nur ANK 1-6 zeigte eine Interaktion mit TRPV6, was auf eine Interaktionsstelle im Aminoterminus hindeutet (Abbildung 11). Zur weiteren Eingrenzung der Interaktionsregion wurde der Aminoterminus in kürzere Fragmente aufgeteilt, wobei die sechs im Aminoterminus enthaltenen Ankyrin-Repeats berücksichtigt wurden, da sie wahrscheinlich strukturgebende Elemente sind (siehe auch Abbildung 7).

Bei der Untersuchung der aminoterminalen Fragmente auf Interaktion mit TRPV6 stellte sich heraus, dass das um zwei Ankyrin-Repeats verkürzte ANK 1-4 noch mit TRPV6 interagieren konnte, während der Teil

des Aminoterminus, der die Ankyrin-Repeats 5+6 umfasste, nicht interagiert. Allerdings konnte wegen der schwachen Expression von ANK 5+6 eine Interaktion mit TRPV6 nicht völlig ausgeschlossen werden (Abbildung 11). Weiterhin ko-präzipitierte ANK 1+2 nicht mit TRPV6, für ANK 3-6 dagegen war ein abgeschwächtes Signal zu erkennen. Für ANK 1-3 war das Interaktionssignal mit TRPV6 etwas stärker als für ANK 4-6, aber beide Konstrukte interagierten jeweils nur schwach mit TRPV6. Diese Daten deuten auf eine Lokalisierung der vorrangigen Interaktionsstelle in der Region ANK 3 hin. Jedoch war das Interaktionssignal zwischen dem Konstrukt, welches die Region ANK 3+4 enthielt mit dem TRPV6-Protein insgesamt sehr schwach. Für die Fusionsproteine, welche entweder nur ANK 3 oder ANK 4 enthielten, waren keine signifikanten Interaktionssignale mit TRPV6 zu erkennen (Abbildung 11).

Parallel zu den Ko-Immunpräzipitationen wurden die verkürzten EGFP-Fusionsproteine von B. Niemeyer durch Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Lokalisierung in HEK293- und COS-Zellen geprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die Fusionsproteine ANK 3+4-EGFP und ANK 3-EGFP in Zellkompartimenten zu finden waren, welche mithilfe des Fluoreszenzmarkers „Mito-Tracker“ als Mitochondrien identifiziert werden konnten (Abbildung 12). Diese Lokalisierung der Proteine könnte der Grund dafür sein, dass in der Ko-Immunpräzipitation keine Interaktion mehr detektiert wurde. Zusätzlich deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die in den Ko-Immunpräzipitations-Experimenten beobachteten Interaktionen nicht durch artifizielle Zusammenlagerung der Proteine nach der Zellsolubilisierung entstanden sind.

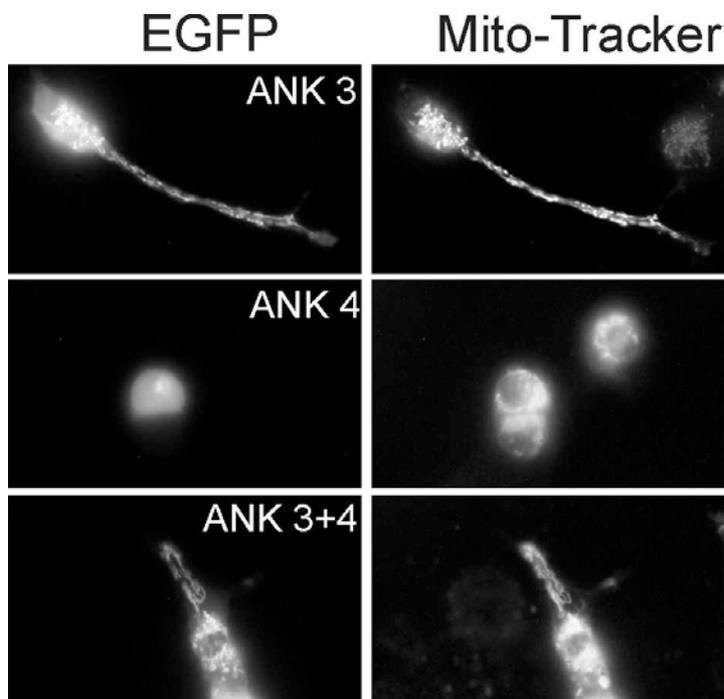


Abbildung 12: Lokalisierung von ANK 3, ANK 4 und ANK 3+4. Die linke Spalte zeigt die EGFP-Fluoreszenz lebender transfizierter Zellen. In der rechten Spalte wurden die gleichen Zellen mit dem Fluoreszenzmarker „Texas Red“-Mito-Tracker (Molecular Probes) behandelt, welcher in den Mitochondrien der Zelle akkumuliert.

Um die Lokalisierung des ANK 3+4-Fusionsproteins an die Plasmamembran zu ermöglichen, wurde die γ 1-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals $Ca_v1.1$ von Maus zwischen ANK 3+4 und EGFP eingefügt und anschließend dieses Konstrukt mittels Ko-Immunpräzipitation auf Interaktion mit dem TRPV6-Protein untersucht. Dieses Experiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Das Einfügen der γ 1-Untereinheit in das ANK 3+4-EGFP-Konstrukt führte zu einer Lokalisation in der Plasmamembran und ermöglichte dort die Interaktion mit TRPV6 (Abbildung 13 B). Gleichzeitig wurde eine Interaktion von γ 1-EGFP mit TRPV6 ausgeschlossen: γ 1-EGFP ist in der stabilen HEK293-TRPV6-Zelllinie zwar an der Plasmamembran lokalisiert (B. Niemeyer, persönliche Mitteilung), ko-präzipitierte aber nicht mit dem TRPV6-Protein (Abbildung 13 A).

Da für das mit TRPV6 verwandte Protein TRPV5 in der Region ANK 1 eine Bindungsstelle postuliert worden war (Chang et al., 2004), wurde auch zwischen ANK 1+2 und EGFP eine γ 1-Untereinheit eingefügt. Die Ko-Immunpräzipitation zeigte, dass ANK 1+2- γ 1-EGFP mit dem TRPV6-Protein interagiert, allerdings schwächer als ANK 3+4- γ 1-EGFP (Abbildung 13 C).

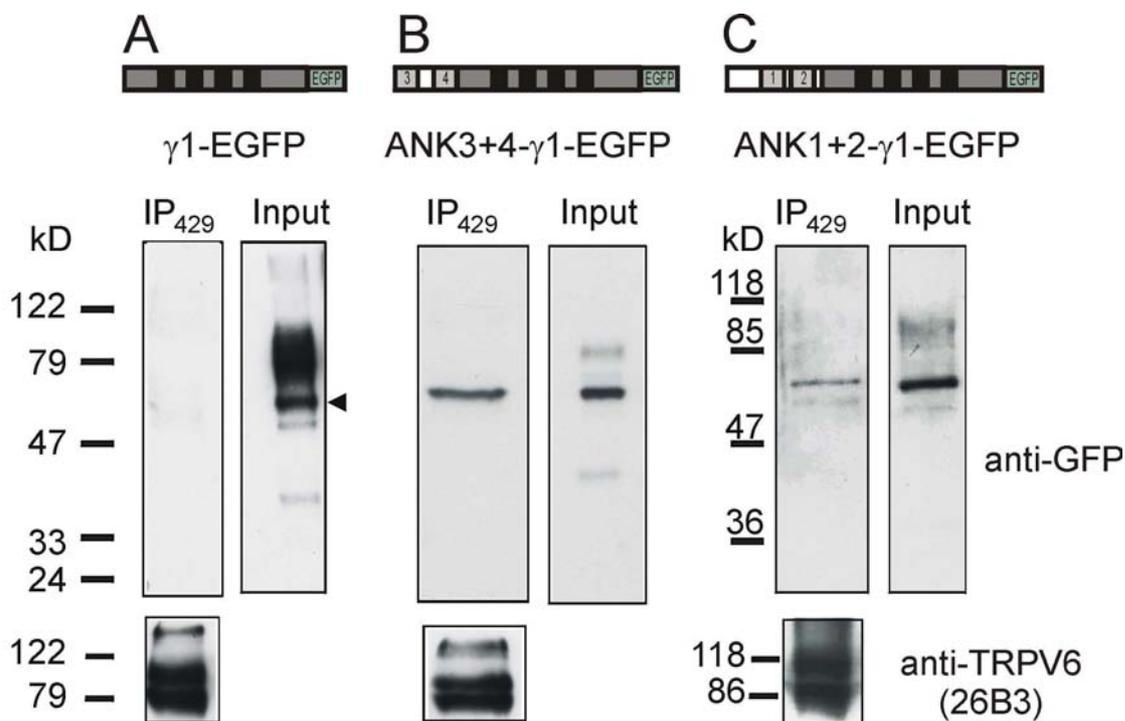


Abbildung 13: Ko-Immunpräzipitation von γ 1-EGFP, ANK 1+2-EGFP und ANK 3+4-EGFP mit TRPV6. Die Fusionskonstrukte wurden in die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert und TRPV6 mit je 2 μ g Antikörper 429 präzipitiert. Zur Detektion wurde ein anti-GFP-Antikörper (1:1000) eingesetzt. A: das γ 1-EGFP-Fusionsprotein ko-präzipitiert nicht mit TRPV6. B: ANK 3+4- γ 1-EGFP bindet an TRPV6. C: ANK 1+2- γ 1-EGFP bindet schwach an TRPV6. Die Redetektion der Blots mit dem Antikörper 26B3 zeigt das von Antikörper 429 gebundene TRPV6-Protein. IP bedeutet Immunpräzipitation.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Untersuchungen eine mögliche Interaktionsdomäne im Bereich der aminoterminalen Ankyrin Repeats, wobei der Region um die Ankyrin Repeats 3 und 4 eine besondere Rolle zuzukommen scheint.

8.1.3 HOMOMULTIMERISIERUNG VERSCHIEDENER ANK-EGFP-FUSIONSPROTEINE

Falls der Aminoterminus eine oder mehrere Homomultimerisierungs-Domänen enthält, könnte vermutet werden, dass aminoterminaler TRPV6-Proteinfragmente Homomultimere bilden können. Um dies zu untersuchen, wurden die drei Fusionsproteine ANK 1+2-EGFP, ANK 3+4-EGFP und ANK 5+6-EGFP auf ihre Fähigkeit zur Homomultimerbildung untersucht. Hierzu wurde die cDNS des jeweiligen Fusionsproteins in HEK293-Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden Zellysate hergestellt, indem 1 x Laemmli-Puffer zugegeben und durch Kanülen geschert wurde. Diese wurden entweder stark denaturierenden Bedingungen ausgesetzt, d.h. Zugabe von 10 mM Dithiothreitol, 1,43 M β -Mercaptoethanol und Denaturierung bei 95 °C, oder schwach denaturierenden Bedingungen, d.h. keine Zugabe von Dithiothreitol und β -Mercaptoethanol und Denaturierung bei 37 °C. Danach folgten die Auftrennung des Proteingemischs im SDS-Gel, der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion mit einem anti-GFP-Antikörper.

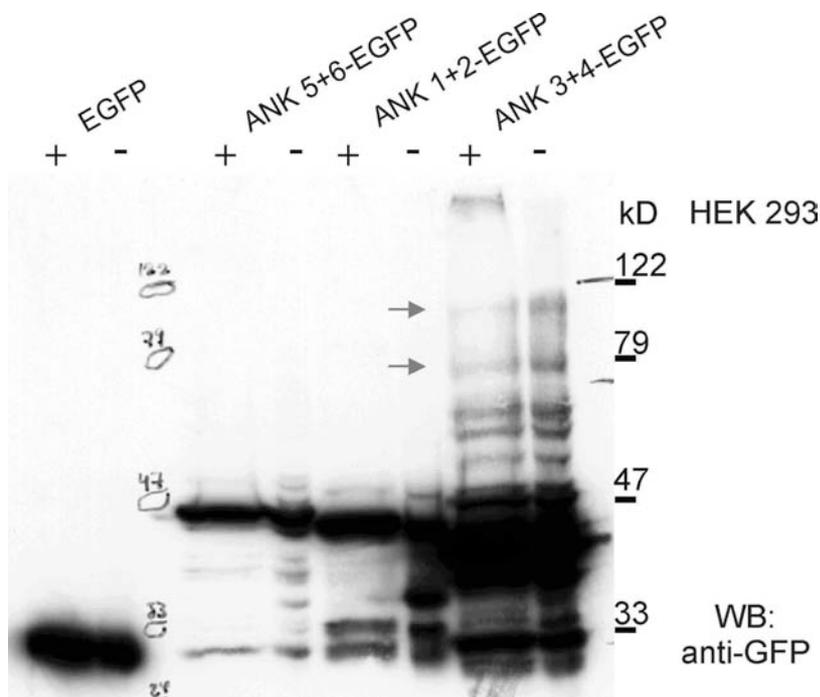


Abbildung 14: Lysate transfizierter HEK293-Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Auf das SDS-Gel wurden jeweils 25 μ l Lysat aufgetragen. Nur bei ANK 3+4-EGFP sind Signale auf der Höhe von Dimeren und Trimeren (Pfeile) zu erkennen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper (1:1000). (+) stark denaturierend: Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer mit 10 mM DTT und 1,43 M β -Mercaptoethanol, Denaturierung bei 95 °C. (-) schwach denaturierend: Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer ohne DTT und β -Mercaptoethanol, Denaturierung bei 37 °C. Errechnete Molekulargewichte: EGFP 26,9 kDa; ANK 5+6-EGFP 42,7 kDa; ANK 1+2-EGFP 40,2 kDa; ANK 3+4-EGFP 35,1 kDa; ANK 3+4-EGFP-Dimer 70,2 kDa; ANK 3+4-EGFP-Trimer 105,3 kDa.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, liegen das EGFP-Protein und die beiden Fusionsproteine ANK 1+2-EGFP und ANK 5+6-EGFP als Monomere vor. Nur ANK 3+4-EGFP zeigt Signale, deren Größe dem Molekulargewicht eines Dimers (unterer Pfeil) und Trimers (oberer Pfeil) des ANK 3+4-EGFP-Fusionsproteins entsprechen könnten. Diese Signale sind unter schwach denaturierenden Bedingungen intensiver als

unter stark denaturierenden (Abbildung 14). Bedingt durch geringere Proteinexpression sind die Signale der Monomere von ANK 1+2-EGFP und ANK 5+6-EGFP schwächer als das von ANK 3+4-EGFP. Allerdings erscheinen auch bei längerer Exposition des Western Blots für ANK 1+2-EGFP und ANK 5+6-EGFP keine Signale, die denen von Homomultimeren entsprechen könnten (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die verschiedenen Abbauprodukte der ANK-EGFP-Fusionsproteine ist unklar.

8.1.4 DELETION ODER AUSTAUSCH VON ANKYRIN-REPEATS

Wie bereits in Abbildung 11 und Abbildung 13 gezeigt wurde, waren bisher verkürzte TRPV6-Fragmente auf Interaktion mit dem TRPV6-Protein untersucht worden, um die Interaktionsregion einzugrenzen, die für die homotypische TRPV6-Interaktion wichtig ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass in der Region um die Ankyrin-Repeats 3 und 4 möglicherweise eine Interaktionsstelle lokalisiert ist. Deshalb wurde als nächstes verschieden große Bereiche dieser Region aus dem TRPV6-Protein entfernt und so drei verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt. Außerdem wurde die deletierte Region ANK 3 in TRPV6 durch die Sequenz anderer Ankyrin-Repeats ersetzt. Anschließend wurde untersucht, ob die hergestellten TRPV6-Konstrukte in der Ko-Immunpräzipitation noch eine Interaktion mit dem TRPV6-Protein zeigten.

HERSTELLUNG VON KONSTRUKTEN MIT DELETION BZW. AUSTAUSCH IN DER REGION ANK 3 UND 4

Zunächst wurde in die cDNS von TRPV6 eine Mlu I-Erkennungsstelle (ACGCGT) eingeführt, indem die Nukleotide ³³³ATC³³⁵ gegen GCG ausgetauscht wurden. Hierzu wurde zunächst mittels PCR-Amplifikation, bei welcher ein TRPV6/pCAGGS-IRES-GFP-Plasmid als Template diente, ein DNS-Fragment hergestellt. Das amplifizierte DNS-Fragment enthielt die Sac I-Restriktionsschnittstelle von pCAGGS und die Basenpaare 1-333 von TRPV6, an welche am 3'-Ende die drei auszutauschenden Basen und eine weitere Sac I-Schnittstelle gefügt wurden. Da TRPV6 die Sac I-Restriktionsschnittstelle ³³⁷GAGCTC³⁴² besitzt, konnte anschließend das Amplifikat in ein mit Sac I geschnittenes TRPV6/pCAGGS-IRES-GFP-Plasmid eingefügt werden. Die so erzeugte Mutation führte im Protein zum Austausch von Serin gegen Arginin, das Plasmid wurde als ¹¹²S/R-Mutante bezeichnet. Diese ¹¹²S/R -Mutante verhält sich sowohl in der Ko-Immunpräzipitation als auch bei der Strommessung wie TRPV6 (Abbildung 19 A und B).

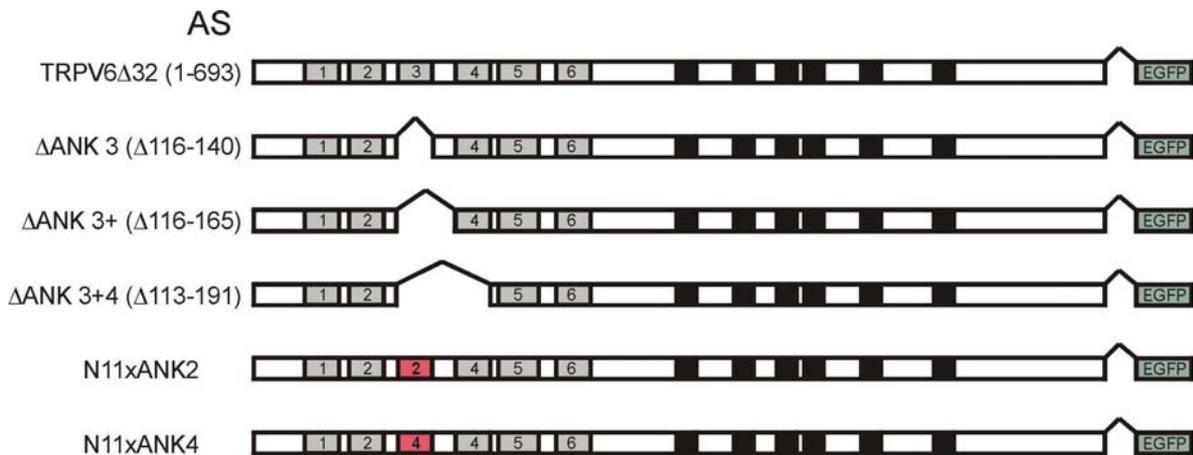


Abbildung 15: Aus dem TRPV6-Protein wurden verschiedene Fragmente in der Region ANK 3+4 entfernt. Es wurden entweder nur ANK 3 (Δ ANK3), ANK 3 mit der Verbindungsregion zwischen ANK 3 und ANK 4 (Δ ANK3+) oder ANK 3 und ANK 4 (Δ ANK3+4) deletiert. Diese Deletionen sind durch eine dachförmige Klammer im Bereich der Ankyrin Repeats (graue nummerierte Felder) gekennzeichnet. Außerdem wurde im Fall von Δ ANK3 die Deletion wieder aufgefüllt (rote Felder); bei N11xANK 2 wurde die Sequenz von ANK 2 in die Deletion eingesetzt; bei N11xANK 4 die Sequenz von ANK 4. Die an EGFP grenzende dachförmige Klammer steht für die Deletion der letzten 32 Aminosäurereste von TRPV6, das mit EGFP beschriftete Feld für das fusionierte EGFP-Protein. Die Position der Aminosäurereste (AS) ist in Nummern angegeben. Δ bedeutet Deletion.

Basierend auf der ¹¹²S/R -Mutation wurden die Deletionsmutanten Δ ANK 3, Δ ANK 3+ und Δ ANK 3+4 erzeugt, denen entweder nur ANK 3, die Verbindungsregion zwischen ANK 3 und ANK 4 oder ANK 3 und ANK 4 fehlen (Abbildung 15). Zur Herstellung dieser Konstrukte wurde zuerst ein TRPV6-¹¹²S/R /pCAGGS-IRES-GFP-Plasmid mit Mlu I und EcoR V geschnitten. Die entstandene Lücke zwischen den Basenpaaren 331 und 1150 wurde durch verschieden lange TRPV6-Fragmente wieder aufgefüllt: Die Herstellung dieser Fragmente erfolgte mittels PCR-Amplifikation. Sie begannen jeweils mit dem TRPV6-Sequenzabschnitt hinter der jeweiligen zu deletierenden Region, also bei Δ ANK 3 mit Bp 421, bei ANK 3+ mit Bp 496 und im Falle von ANK 3+4 mit Bp 574; und endeten jeweils mit der EcoR V-Schnittstelle (Bp 1149). Beim Einfügen in das TRPV6-¹¹²S/R /pCAGGS-IRES-GFP-Plasmid entstanden so die Deletionen (siehe auch Tabelle 2, Seite 87). Zur Umklonierung in andere Plasmide wurde durch PCR-Amplifikation, bei der die Deletionskonstrukte als Templates dienten, cDNS hergestellt, die mit einer Hind III-Schnittstelle und dem Start-ATG von TRPV6 begannen und mit der EcoR V-Schnittstelle endeten. Diese wurden in die mit Hind III und EcoR V geschnittenen Plasmide TRPV6-EGFP/pcDNA3 oder TRPV6 Δ 32-EGFP/pcDNA3 eingefügt. Zur Herstellung der Austauschmutanten N11xANK 2 und N11xANK 4 wurden zunächst aus TRPV6 die Fragmente ANK 2, welches die Basenpaare 234-285 umfasste, und ANK 4, das die Basenpaare 489-561 enthielt, amplifiziert, wobei Mlu I-Schnittstellen angefügt wurden. Die Fragmente wurden anschließend in ein mit Mlu I geschnittenes Δ ANK 3/pCAGGS-Plasmid ligiert. Bedingt durch die Klonierungsstrategie verblieben hinter der zweiten Mlu I-Schnittstelle die fünf zusätzlichen Aminosäurereste „TRELY“. Die Umklonierung der veränderten Bereiche in ein TRPV6 Δ 32 EGFP/pcDNA3-Plasmid erfolgte wie oben beschrieben. Ein genauer Überblick über die Deletions- und Austauschkonstrukte ist auch in Tabelle 2 (Seite 87) gegeben.

KO-IMMUNPRÄZIPITATION DER DELETIONS- UND AUSTAUSCHKONSTRUKTE MIT TRPV6

Falls in der Region um die Ankyrin-Repeats 3 und 4 tatsächlich eine dominante Interaktionsdomäne liegt, so sollte ein TRPV6-Protein, aus welchem diese Region entfernt wurde, nicht mehr mit TRPV6 ko-immunpräzipitieren. Um dies zu untersuchen, wurden die Deletionsmutanten Δ ANK 3, Δ ANK 3+ und Δ ANK 3+4 durch Ko-Immunopräzipitation auf Interaktion mit TRPV6 getestet.

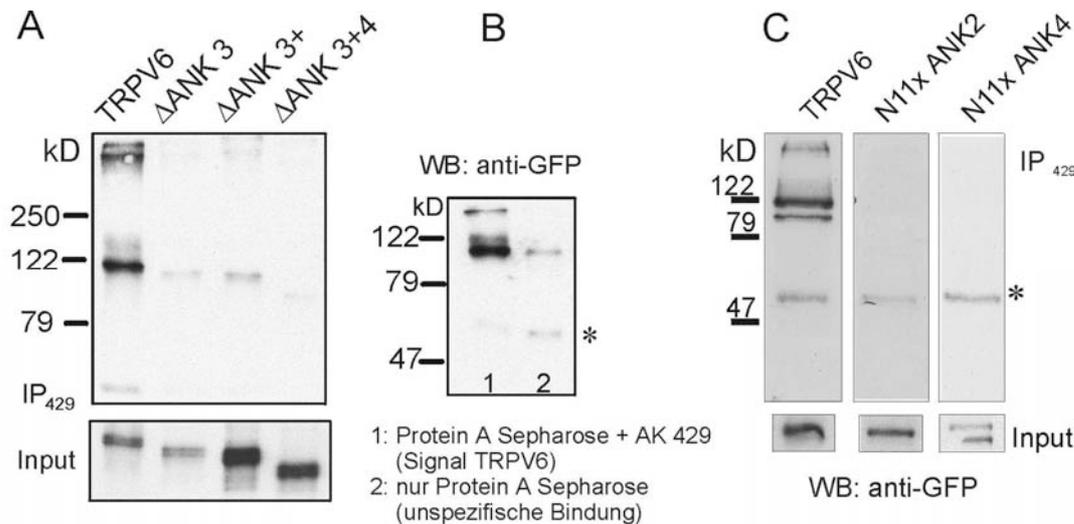


Abbildung 16: Nach Deletion der Region ANK 3+4 aus TRPV6 findet keine Interaktion mehr mit dem TRPV6-Protein statt. *A:* Ko-Immunopräzipitation von TRPV6 Δ 32-EGFP (hier als TRPV6 bezeichnet) und den drei TRPV6-Deletionsmutanten mit TRPV6. Die zu untersuchenden Konstrukte wurden in die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert. Lysate dieser Zellen wurden mit 2 μ g Antikörper 429 inkubiert, zur Detektion im Western Blot wurde anti-GFP (1:1000) eingesetzt. *B:* (2) TRPV6 bindet, möglicherweise bedingt durch die hydrophoben Transmembrandomänen, schwach unspezifisch an Protein A Sepharose; zum Vergleich der Signalintensität ist in (1) das Ko-Immunopräzipitationssignal von TRPV6 Δ 32-EGFP mit TRPV6 gezeigt. *C:* Nach Austausch von ANK 3 gegen ANK 2 oder ANK 4 kommt keine Interaktion mit TRPV6 zustande. Als Positivkontrolle ist die Interaktion von TRPV6 Δ 32-EGFP mit TRPV6 gezeigt (linke Spur). * markiert eine unspezifische Zweitantikörper-Bande (vgl. Abbildung 11). In der Input-Kontrolle ist die jeweils eingesetzte Menge des Deletions- bzw. Austauschkonstrukts gezeigt. IP steht für Immunopräzipitation.

Hierzu wurden die verschiedenen, mit EGFP fusionierten Deletions- und Austauschkonstrukte in der stabilen HEK293-TRPV6-Zelllinie exprimiert und diese Zellen lysiert. Das TRPV6-Protein wurde mit Antikörper 429 präzipitiert, dann wurden die Proteingemische im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde mit einem anti-GFP-Antikörper untersucht, ob die Deletions- und Austauschkonstrukte mit dem TRPV6-Protein ko-präzipitierten. Obwohl Δ ANK 3+ und Δ ANK 3+4 gut exprimiert wurden, wie in der Input-Kontrolle zu erkennen ist, konnte keine der drei Mutanten mit dem TRPV6-Protein interagieren. Die schwachen Banden, die für die Deletionskonstrukte in Abbildung 16 A zu erkennen sind, entstehen durch eine geringe unspezifische Bindung der hydrophoben Transmembranregion an Protein A Sepharose (Abbildung 16 B); mit anderen Konstrukten, die nur zytosolische Teile von TRPV6 umfassten, waren diese Banden nicht zu sehen (siehe Abbildung 11). Das fehlende Signal in der Ko-Immunopräzipitation kann nicht durch eine fehlerhafte Lokalisierung von Δ ANK 3+4 erklärt werden, da Δ ANK 3+4 eine mit dem TRPV6-Protein vergleichbare Oberflächen-Biotinylierung aufweist (siehe

Abbildung 20) und auch anhand von Fluoreszenzmikroskopie keine signifikanten Unterschiede zu TRPV6 detektiert wurden. Diese Experimente bestätigen, dass in der Region ANK 3+4 eine wichtige Interaktionsstelle liegt. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass die fehlende Interaktion auch durch eine eventuelle Zerstörung der Tertiärstruktur bedingt sein könnte.

Um die Tertiärstruktur des TRPV6-Proteins, insbesondere der Ankyrin-Repeats, zu erhalten, wurde die ANK 3-Domäne durch Fragmente, die entweder ANK 2 oder ANK 4 enthielten, ersetzt. Die so erhaltenen Konstrukte wurden als N11xANK 2 bzw. N11xANK 4 bezeichnet. Anschließend wurden beide Konstrukte durch Ko-Immunpräzipitation auf Interaktion mit dem TRPV6-Protein getestet. Weder der Ersatz von ANK 3 durch ANK 2 noch durch ANK 4 konnte die Interaktion wieder herstellen (Abbildung 16 C). Zudem bildete, wie durch Strommessungen festgestellt wurde, keine der Deletions- bzw. Austauschmutanten funktionelle Kanäle aus (B. Niemeyer, unveröffentlichte Daten). Eine Analyse der Sekundärstrukturen der Sequenzen von N11xANK 2 und N11xANK 4 mit dem Strukturalgorithmus Psipred zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die Analyse der TRPV6-Sequenz, was als Hinweis auf eine Erhaltung der Proteinstruktur gedeutet werden kann.

Aus diesen Experimenten können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden: 1) Wenn ANK 3 fehlt, kann keine Interaktion mehr mit TRPV6 stattfinden, die Region ANK 3 ist also die für die TRPV6-TRPV6 Interaktion essentielle Domäne. 2) Es existieren noch weitere Interaktionsstellen, die aber entweder alleine nicht stark genug an TRPV6 binden oder durch eine Veränderung der Tertiärstruktur bei den Deletions- bzw. Austauschmutanten maskiert sind.

8.1.5 GEZIELTE TRPV6-PUNKTMUTAGENESE, EINSCHUB UND AUSTAUSCH VON 5 AMINOSÄURERESTEN IN ANK 3+4

Um aufzuklären, welche Aminosäurereste der Region ANK 3+4 für die homotypische TRPV6-Interaktion wichtig sind, wurden an verschiedenen Stellen dieser Region Aminosäurereste zusätzlich eingefügt oder ausgetauscht. Die einzelnen Konstrukte wurden entweder durch Klonierung oder durch die Punktmutation von Aminosäureresten hergestellt. Anschließend wurden die TRPV6-Mutanten auf Funktionalität und Ko-Immunpräzipitation mit dem TRPV6-Protein getestet.

KLONIERUNG VON KONSTRUKTEN MIT MUTATIONEN DER REGION ANK 3+4

Die TRPV6-Konstrukte mit eingeschobenen oder ausgetauschten Aminosäureresten in der Region um Ankyrin-Repeat 3 bzw. 4 wurden wie folgt kloniert: Zur Herstellung der Mutante M5, bei welcher die Aminosäurereste ¹³⁶LLARR¹⁴⁰ zu TRELY mutiert wurden, und der Mutante +5, welche nach Position 140 den Einschub der fünf Aminosäurereste „TRELY“ enthält, wurden kurze TRPV6-Fragmente in ein mit Mlu I geschnittenes TRPV6-ΔANK3/pCAGGS-Plasmid eingefügt. Hierzu wurden mittels PCR zunächst zwei TRPV6-Fragmente mit den Basenpaaren 333-405 und 333-420 amplifiziert, wobei Mlu I-Erkennungssequenzen angefügt wurden. Die Fragmente wurden jeweils in das oben genannte Plasmid ligiert. Um die mutierte DNS in TRPV6Δ32 EGFP/pcDNA3 umzuklonieren, diente sie als PCR-Matrize für DNS-Fragmente, die mit einer Hind III-Schnittstelle und dem Start-ATG von TRPV6 beginnen und mit

einer EcoR V-Erkennungsstelle enden. Diese wurden in mit Hind III und EcoR V geschnittenes TRPV6 Δ 32 EGFP/pcDNA3 eingefügt.

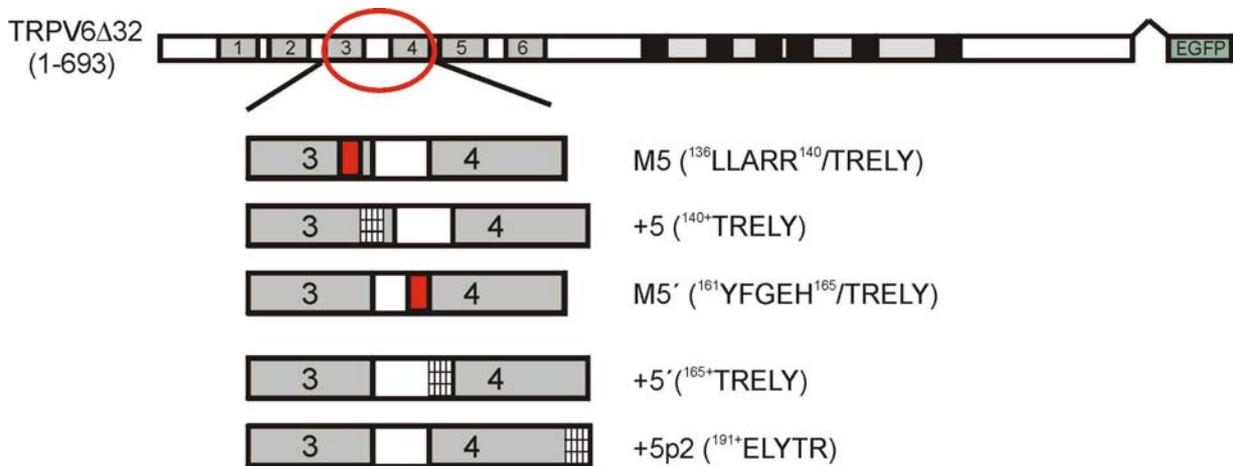


Abbildung 17: Austausch (roter Kasten) oder Einschub (Gitter) von 5 Aminosäureresten in der Region ANK 3+4. Bei +5 (¹⁴⁰⁺TRELY), +5' (¹⁶⁵⁺TRELY) bzw. +5p2 (¹⁶⁵⁺ELYTR) wurden nach den Positionen 140, 165 oder 191 je fünf Aminosäurereste zusätzlich eingeschoben. Die grauen nummerierten Felder kennzeichnen Ankyrin-Repeats, die schwarzen Felder Transmembrandomänen. Die dachförmige Klammer steht für die Deletion der letzten 32 Aminosäurereste von TRPV6, das mit EGFP beschriftete Feld für die carboxyterminale Fusion des Proteins mit EGFP. Die Positionen der Aminosäurereste sind in Nummern angegeben.

Die Konstrukte M5', bei welchem die Aminosäurereste ¹⁶¹YFGEH¹⁶⁵ zu „TRELY“ mutiert sind, und +5', welches nach Position 165 den Einschub der Aminosäurereste „TRELY“ enthält, wurden wie oben beschrieben hergestellt. Bei M5' wurde ein Fragment mit den Basenpaaren 333-480 und bei +5' eines mit den Basenpaaren 333-495 jeweils in mit Mlu I geschnittenes TRPV6- Δ ANK3+/pCAGGS ligiert und wie oben beschrieben in TRPV6 Δ 32 EGFP/pcDNA3 umklont.

Zur Klonierung von +5p2, welches nach Position 191 den Einschub der Aminosäurereste „ELYTR“ enthält, wurde zunächst durch PCR-Amplifikation ein TRPV6-Fragment hergestellt, welches die Basenpaare 333-573 enthielt samt einer angefügten Sequenz, die für die drei Aminosäurereste „ELY“ kodierte. Dieses Fragment wurde in ein mit Mlu I geschnittenes TRPV6- Δ ANK3+4/pCAGGS ligiert und wie oben beschrieben in TRPV6 Δ 32 EGFP/pcDNA3 umklont.

EINFÜHRUNG VON PUNKTMUTATIONEN IN TRPV6

Die verschiedenen Punktmutationen wurden alle nach dem Prinzip der gezielten Punktmutagenese mittels PCR in die TRPV6-Sequenz eingeführt (Seite 35). Bei ¹³⁸AR¹³⁹/EA und ¹³⁶LL¹³⁷/TR wurden zwei Aminosäurereste innerhalb von ANK 3 ausgetauscht. Diese beiden Mutationen wurden aufgrund der vorhergesagten Struktur potentieller ANK-Interaktionsflächen durchgeführt (Mosavi et al., 2002). Mit der LL/TR-Mutation sollte zudem untersucht werden, ob die Mutation der konservierten Aminosäurereste LL des mutierten Motivs LLARR der M5-Mutante für deren Phänotyp verantwortlich sind. Die Mutante ¹⁵³RR¹⁵⁴/QP wurde aufgrund der Spezifität dieser beiden Aminosäurereste im Vergleich zu allen anderen TRPV-Sequenzen hergestellt.

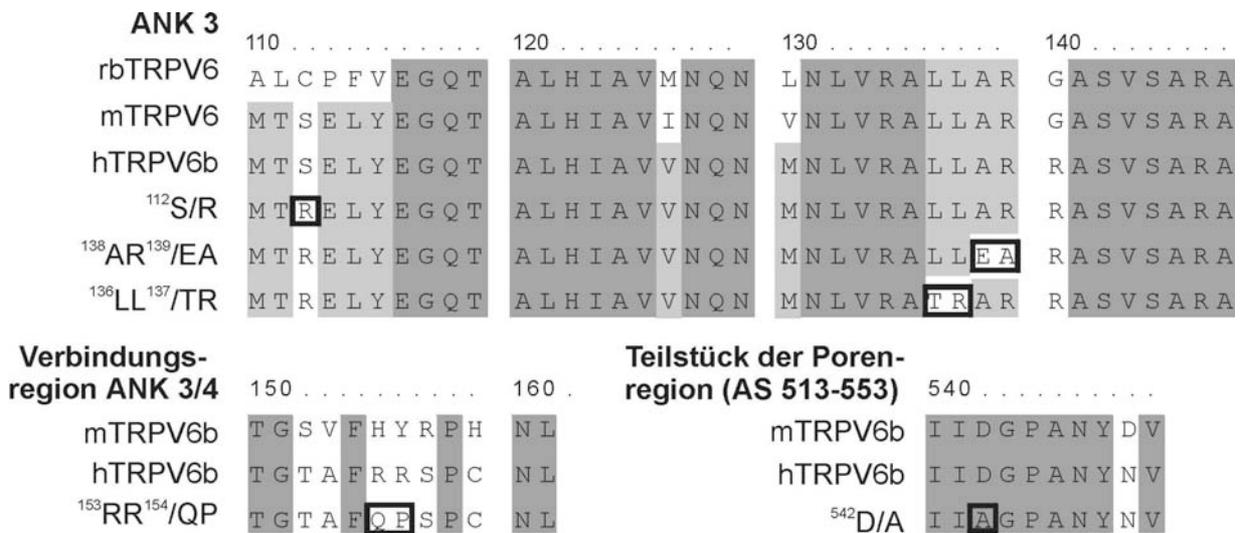


Abbildung 18: Schematische Darstellung der verschiedenen Punktmutationen in TRPV6. Durch die ¹¹²S/R - Mutation entsteht in der DNS eine Mlu I-Erkennungssequenz, welche zur Klonierung der Deletionskonstrukte genutzt wurde. ¹³⁸AR¹³⁹/EA und ¹³⁶LL¹³⁷/TR sind Punktmutationen innerhalb von ANK 3, ¹⁵³RR¹⁵⁴/QP liegt im Verbindungsstück zwischen ANK 3 und ANK 4. Bei ⁵⁴²D/A ist ein Aminosäurerest im Selektivitätsfilter der Porenregion von TRPV6 ausgetauscht. Die Mutationen sind schwarz eingerahmt. In Nummern sind die Positionen der Aminosäurereste (AS) angegeben. *rb*, Kaninchen (rabbit); *m*, Maus; *h*, Mensch (human). Dunkelgrau hinterlegt: identische Aminosäurereste; mittelgrau: ähnliche Aminosäurereste; weiß: variable Aminosäurereste.

Zusätzlich zu den Punktmutationen in der Region ANK 3 und ANK 4 ist auch die Mutante ⁵⁴²D/A aufgeführt, welche eine Punktmutation im Selektivitätsfilter der Porenregion enthält. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung dominant-negativer Effekte eingesetzt (Abbildung 22). Zum Vergleich konservierter Regionen wurden zusätzlich die Proteinsequenzen von Kaninchen, Maus und Mensch aufgeführt.

KO-IMMUNPRÄZIPITATION DER KONSTRUKTE MIT MODIFIZIERTER REGION ANK 3+4 MIT TRPV6

Die verschiedenen Konstrukte mit mutierten Aminosäureresten in der Region ANK 3+4 wurden auf Ko-Immunpräzipitation mit dem TRPV6-Protein getestet, um festzustellen, welche die für die Interaktion mit TRPV6 entscheidenden Aminosäurereste sind. Die Experimente wurden wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt. Zuerst wurde die ¹¹²S/R-Mutante auf Interaktion mit dem TRPV6-Protein getestet, da alle weiteren mutierten Konstrukte auf ihr basieren. Sie zeigte ein Signal (Abbildung 19 A, erste Spur), dessen Intensität mit dem eines TRPV6-EGFP-Fusionsproteins vergleichbar ist (z.B. gezeigt in Abbildung 9 A). Zudem konnten in Patch-Clamp-Analysen, welche von B. Niemeyer durchgeführt wurden, keine Unterschiede der ¹¹²S/R-Mutante im Vergleich zum TRPV6-Protein festgestellt werden (Abbildung 19 B). Der Austausch der fünf Aminosäurereste ¹³⁶LLARR¹⁴⁰ gegen „TRELY“ in Ankyrin-Repeat 3 hingegen, wie es bei Konstrukt M5 der Fall ist, führte zum vollständigen Verlust der Interaktion (Abbildung 19 A, zweite Spur). Wie in Patch-Clamp-Analysen festgestellt wurde, konnte M5 keinen funktionellen Ionenkanal ausbilden (Abbildung 19 B). Nach Berechnungen mit dem Psipred-Sekundärstruktur-Algorithmus sind die helikalen Strukturen von M5 im Vergleich zu TRPV6 nicht verändert. Allerdings sind die beiden

Leucinreste an Position 136 und 137 wahrscheinlich wichtig für die Stabilisierung der Tertiärstruktur von Ankyrin-Repeats (Michaely et al., 2002). Im Gegensatz zu M5 sind im Konstrukt +5 die Aminosäurereste $^{136}\text{LLARR}^{140}$ erhalten, an Position 140 wurden jedoch die fünf Aminosäurereste „TRELY“ eingeschoben. In der Ko-Immünpräzipitation war für +5 ein sehr schwaches Interaktionssignal mit TRPV6 zu erkennen (Abbildung 19 A, dritte Spur), allerdings wurde kein funktioneller Ionenkanal ausgebildet (Abbildung 19 A). Bei Konstrukt M5' wurde der Region ANK 4 die Mutation $^{161}\text{YFGEH}^{165}/\text{TRELY}$ eingefügt. Dies führte dazu, dass das Ko-Immünpräzipitationssignal mit TRPV6 zwar stärker war als bei M5, aber immer noch deutlich schwächer als bei $^{112}\text{S/R}$ (Abbildung 19 A, vierte Spur). Zudem bildete das exprimierte Konstrukt keinen funktionellen Kanal aus. Wurde nach Position 165 die Sequenz „TRELY“ eingeschoben, wie beispielweise bei +5' geschehen, war das Interaktionssignal ähnlich stark wie bei M5' (Abbildung 19 A, fünfte Spur); diese Mutante konnte ebenfalls keinen funktionellen Kanal ausbilden.

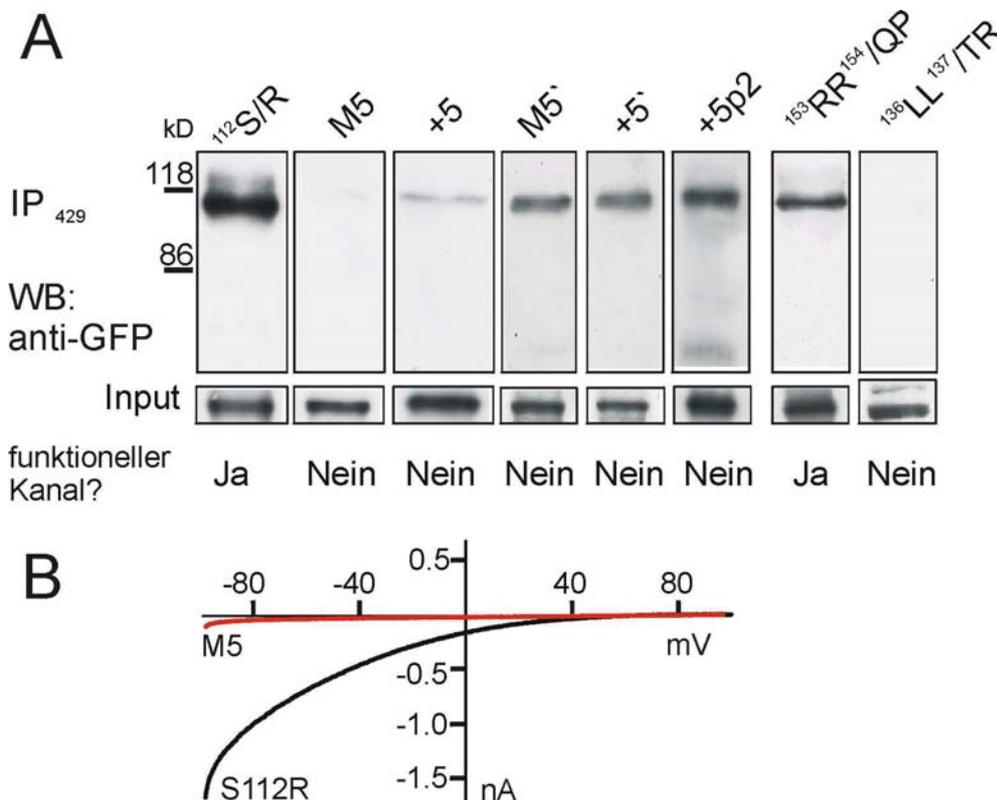


Abbildung 19: Mutationen in der Region ANK 3+4 beeinflussen die Interaktion des mutierten Proteins mit dem TRPV6-Protein. **A:** Die Mutation von fünf Aminosäureresten (M5) bzw. zwei Aminosäureresten ($^{136}\text{LL}^{137}/\text{TR}$) in ANK 3 zerstört die Interaktion mit TRPV6. Der Einschub bzw. Austausch von Aminosäureresten außerhalb von ANK 3 beeinflusst die Interaktion abhängig von der genauen Position unterschiedlich. Die Ko-Immünpräzipitationen wurden mit Lysaten transfizierter stabiler HEK293-TRPV6-Zellen durchgeführt. TRPV6 wurde jeweils mit 2 μg Antikörper 429 präzipitiert, anschließend wurde mittels eines anti-GFP-Antikörpers (1:1000) untersucht, ob die mutierten Proteine, welche alle als EGFP-Fusionsproteine vorlagen, ko-präzipitierten. Input: Überstände, detektiert mit anti-GFP. IP bedeutet Immunpräzipitation. Mittels Patch-Clamp-Analyse transfizierter HEK293-Zellen wurde von Frau Dr. Niemeyer überprüft, ob die Konstrukte funktionelle Kanäle ausbilden konnten. **B:** nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen zeigt die Mutante $^{112}\text{S/R}$ einen TRPV6-spezifischen Kalziumstrom, M5 hingegen zeigt keinen Strom.

Bei der Mutante +5p2 wurden nach ANK 4 an Position 191 die fünf Aminosäurereste „ELYTR“ eingeschoben; dieses mutierte Protein interagiert stark mit TRPV6 (Abbildung 19 A, sechste Spur). Zur Ausbildung eines funktionellen Ionenkanals war +5p2 trotz Lokalisierung an der Zellmembran (Abbildung 20) aber nicht fähig, wie sich aus der Strom-Spannungs-Kennlinie des exprimierten Proteins ableiten lässt.

Da von Mohler et al. vermutet worden war, dass die Spezifität der Interaktionen von Ankyrin-Repeat-Proteinen durch die Aminosäurereste in den Verbindungsregionen zwischen den Ankyrin-Repeats bestimmt wird (Mohler et al., 2002), haben wir die Sequenzen verschiedener TRPV-Mitglieder in diesen Bereichen verglichen. Es fiel auf, dass nur TRPV5 und TRPV6 an den Positionen 153 und 154 positiv geladene Aminosäurereste aufweisen, also stellte sich die Frage, ob diese vielleicht für die homotypische Interaktion spezifisch sind. Der Austausch ¹⁵³RR¹⁵⁴/QP in der Verbindungsregion von ANK 3 und ANK 4 bewirkte jedoch keine Störung der Interaktion in der Ko-Immunpräzipitation, die ¹⁵³RR¹⁵⁴/QP-Mutante konnte zudem funktionelle Kanäle ausbilden (Abbildung 19 A, siebte Spur). Da für die Interaktion der TRPV6-Untereinheiten die Aminosäurereste ¹³⁶LLARR¹⁴⁰ wichtig sind, wurden zwei weitere Mutanten untersucht. Die Mutante ¹³⁸AR¹³⁹/EA konnte funktionelle Kanäle bilden und zeigte zudem eine mit TRPV6 vergleichbare Stromdichte (-108 pA/pF bei -80 mV, n=2). Die ¹³⁶LL¹³⁷/TR-Mutante hingegen war in der Ko-Immunpräzipitation nicht mehr zur Interaktion mit TRPV6 fähig (Abbildung 19 A, Spur ganz rechts) und konnte auch keine funktionellen Ionenkanäle bilden. Wie oben vermutet, liegt dies vielleicht an einer signifikanten Veränderung der Tertiärstruktur.

8.1.6 GESAMTÜBERSICHT ÜBER GEZIELTE MUTATIONEN IN DER REGION ANK 3/ANK 4

	L (114) ---Ankyrin-Repeat 3--- (146) R	I (160) --Ankyrin-Repeat 4--- (192) Q
TRPV6	PMTSELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARRASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
AR/EA	PMTSELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALL <u>EAR</u> ASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
¹¹² S/R	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARRASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
ΔA.3	PMTRELY-----ASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
ΔA.3+	PMTRELY-----PLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
ΔA.3+4	PMTR-----Q	
N11xA.2	PMTRELYMGETALHIAALYDNL <u>EAATRELY</u> ASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
N11xA.4	PMTRELYGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGATRELYASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
M5	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRATRELYASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
+5	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARR <u>TRELY</u> ASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
M5'	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARRASVSARATGTAFFRRSPCNLI <u>TRELY</u> PLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
+5'	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARRASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEH <u>TRELY</u> PLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
+5p2	PMTRELYEGQTALHIAVVNQNMLVRALLARRASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRA <u>ELYTR</u> Q	
LL/TR	PMTSELYEGQTALHIAVVNQNMLVRAT <u>TR</u> ARRASVSARATGTAFFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	
RR/QP	PMTSELYEGQTALHIAVVNQNMLVRATRARRASVSARATGTA <u>FQP</u> SPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLIEHGADIRAQ	

Tabelle 2: Ausschnitt aus der Aminosäure-Sequenz von TRPV6: Ankyrin Repeat 3 (Position 114-146) und Ankyrin Repeat 4 (Position 160-192). *schwarz, fett*: Aminosäurereste von ANK 3 bzw. ANK 4; *schwarz, dünn*: Aminosäurereste zwischen ANK 3 und ANK 4. *grau, fett, unterstrichen*: Mutierte oder eingeschobene Aminosäurereste. *schwarz, fett, unterstrichen*: Aminosäurereste von ANK 2 oder ANK 4, welche in ΔANK 3 eingesetzt wurden. Deletierte Aminosäurereste sind durch Bindestriche ersetzt. TRPV6 = hTRPV6b; ANK wurde durch „A.“ abgekürzt. In ΔANK 3 wurden die 25 Aminosäurereste 116-140 deletiert, bei ΔANK 3+ fehlen die 50 Aminosäurereste 116-165 und bei ΔANK 3+4 die 79 Aminosäurereste 113-191. Diese drei Konstrukte enthalten zusätzlich die ¹¹²S/R-Mutation, weil sie auf der Basis dieser Mutation kloniert wurden. Bei N11xA.2 wurde in ΔANK 3 ein Fragment eingesetzt, welches 18 Aminosäurereste von ANK 2 umfasst; durch die Klonierungsstrategie wurden zusätzlich die 5 Aminosäurereste „TRELY“ eingefügt, welche die Mlu I-Schnittstelle und drei nachfolgende Aminosäurereste darstellen. N11xA.4 wurde ähnlich kloniert, hier wurden allerdings 25 Aminosäurereste von ANK 4 eingefügt. Im Konstrukt M5 wurden innerhalb von ANK 3 die 5 Aminosäurereste „LLARR“ zu „TRELY“ mutiert. Konstrukt +5 enthält den Einschub der fünf Aminosäurereste „TRELY“ an Position 140. Bei M5' wurden in ANK 4 die 5 Aminosäurereste „YFGEH“ zu „TRELY“ mutiert, in Konstrukt +5' wurde „TRELY“ an Position 165 zusätzlich eingefügt. Konstrukt +5p2 beinhaltet den Einschub von „ELYTR“ an Position 191. ¹³⁸AR¹³⁹/EA und ¹³⁶LL¹³⁷/TR enthalten Punktmutationen innerhalb von ANK 3, bei ¹⁵³RR¹⁵⁴/QP wurden zwei Aminosäurereste in der Verbindungsregion zwischen ANK 3 und ANK 4 mutiert.

8.1.7 OBERFLÄCHEN-BIOTINYLIERUNG VON TRPV6-EGFP-FUSIONSPROTEINEN

Zur Kontrolle der Expression an der Plasmamembran wurden heterolog exprimierte Konstrukte durch Biotinylierung auf extrazellulär lokalisierte Epitope untersucht. Die Biotinylierung wurde, wie im Kapitel Methoden beschrieben, durchgeführt; hierzu wurden TRPV6, Δ ANK 3+4 und +5p2 transient in HEK293-Zellen exprimiert. Für alle Proteine konnte eine Biotinylierung nachgewiesen werden, wobei die Biotinylierung von Δ ANK 3+4 und +5p2 eine mit TRPV6 vergleichbare Intensität zeigten (Abbildung 20). Eine fehlende Expression dieser beiden Proteine in der Plasmamembran kann also nicht die Ursache dafür sein, dass sie keine Ionenkanalaktivität zeigen und nicht mit TRPV6 interagieren (Abbildung 16 und Abbildung 19 A). Ein Kontrolllexperiment mit in HEK293-Zellen exprimiertem EGFP, welches im Zytosol lokalisiert ist, zeigte kein Signal in der biotinylierten Fraktion. Dies zeigt, dass intrazellulär vorliegende Proteine nicht mit Biotin markiert werden (Daten nicht gezeigt).

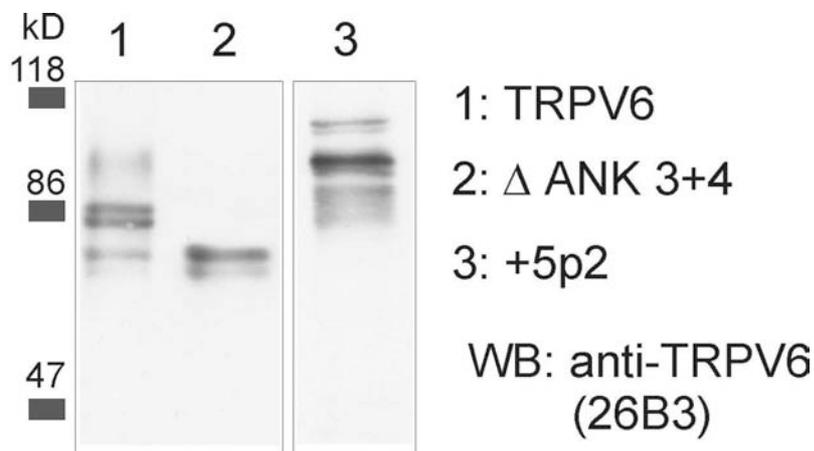


Abbildung 20: Bindung biotinylierter Oberflächenproteine an Avidin-Agarose. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit TRPV6, Δ ANK 3+4 und +5p2 Δ 32-EGFP transfiziert. Die Bindung biotinylierter Oberflächenproteine an Avidin-Agarose und anschließende Detektion mit Antikörper 26B3 zeigt, dass TRPV6 (ca. 83 kDa), Δ ANK 3+4 (ca. 71 kDa) und +5p2-EGFP (ca. 110 kDa) sich als biotinylierte Oberflächenproteine detektieren lassen. WB steht für Western Blot.

8.1.8 DICHTEGRAIENTENZENTRIFUGATION VON TRPV6 UND DER TRPV6-MUTANTE M5

Wie bereits gezeigt wurde, wird bei Konstrukt M5 durch den Austausch 136 LLARR 140 /TRELY in ANK 3 die Interaktion mit dem TRPV6-Protein zerstört, und es können keine funktionellen Ionenkanäle mehr gebildet werden (siehe Abbildung 19). Falls ANK 3 eine putative Tetramerisierungsregion darstellt, sollte ein in dieser Region mutiertes Konstrukt unfähig sein, tetramere Proteinkomplexe auszubilden; dies wurde anhand von Saccharose-Dichtegradienten untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit TRPV6 bzw. M5 transfiziert und das Experiment wie im Kapitel Methoden beschrieben durchgeführt.

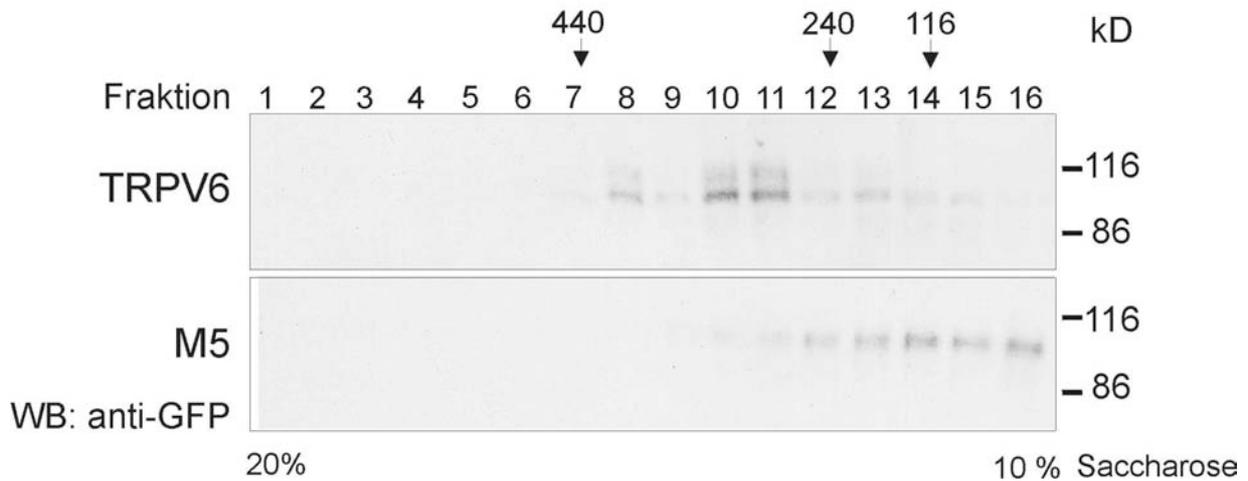


Abbildung 21: TRPV6-Dichtegradientenzentrifugationen. HEK293-Zellen wurden mit TRPV6-EGFP bzw. M5Δ32-EGFP transfiziert, lysiert und im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit anti-GFP (1:1000). TRPV6 bildet Komplexe, die dem Molekulargewicht von Trimeren bzw. Tetrameren entsprechen, M5 wird in den dem Monomer entsprechenden Fraktionen detektiert. Fraktionen mit Markerprotein sind mit einem Pfeil gekennzeichnet (Ferritin 440 kDa, Catalase 240 kDa, β -Galaktosidase 116 kDa). Theoretisches Molekulargewicht für TRPV6-EGFP: Monomer 110,1 kD; Dimer 220,2 kD; Trimer 330,3 kD; Tetramer 440,4 kD.

Nach der Zentrifugation konnte TRPV6 in denjenigen Fraktionen, die dem Molekulargewicht von Trimeren und Tetrameren entsprechen, detektiert werden. Praktisch kein TRPV6-Protein fand sich in den Fraktionen, welche dem Monomer entsprechen. Bei M5 dagegen lag eine Verschiebung der Signale zu den dem Monomer entsprechenden Fraktionen vor; aufgrund der fehlenden Interaktion konnten keine multimeren Komplexe ausgebildet werden.

8.1.9 DOMINANT NEGATIVE EFFEKTE

Wie bereits gezeigt wurde, konnte ein aminoterminales TRPV6-Fragment, das die Ankyrin-Repeats 3 bis 6 umfasste, mit TRPV6 ko-präzipitieren (siehe Abbildung 11). Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Messung dominant-negativer Effekte: Wird in stabilen HEK293-TRPV6-Zellen das TRPV6-Fragment ANK 3-6 exprimiert, so kann eine Reduktion der TRPV6-getragenen Stromdichte detektiert werden. Vermutlich werden in den Zellen Proteinkomplexe aus ANK 3-6 und TRPV6 gebildet, die keine funktionsfähigen Ionenkanäle mehr ausbilden. Umgekehrt kann eine Protein-Protein-Interaktion auch festgestellt werden, indem ein bereits bekannter dominant-negativer Effekt aufgehoben wird: Wird in einem auf TRPV6 dominant-negativ wirkenden Protein, wie beispielsweise der ⁵⁴²D/A-Porenmutante, eine entscheidende Interaktionsdomäne deletiert, kann bei Ko-Expression beider Proteine die Aufhebung des dominant-negativen Effektes beobachtet werden. Dies ist möglich, weil die Porenmutante wegen der fehlenden Interaktionsdomäne nicht mehr mit TRPV6 interagiert und folglich die Assemblierung von TRPV6 zu funktionellen Kanälen nicht mehr stört. Alle dominant-negativen Effekte auf den TRPV6-Kanal wurden anhand von Strommessungen untersucht, welche von B. Niemeyer durchgeführt wurden.

Hierzu wurden verschiedene Konstrukte transient in die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert und anschließend durch Spannungsrampen, welche von -100 mV bis +100 mV reichten, Ströme induziert und gemessen; die Ströme wurden anschließend auf die jeweilige Zellgröße normiert.

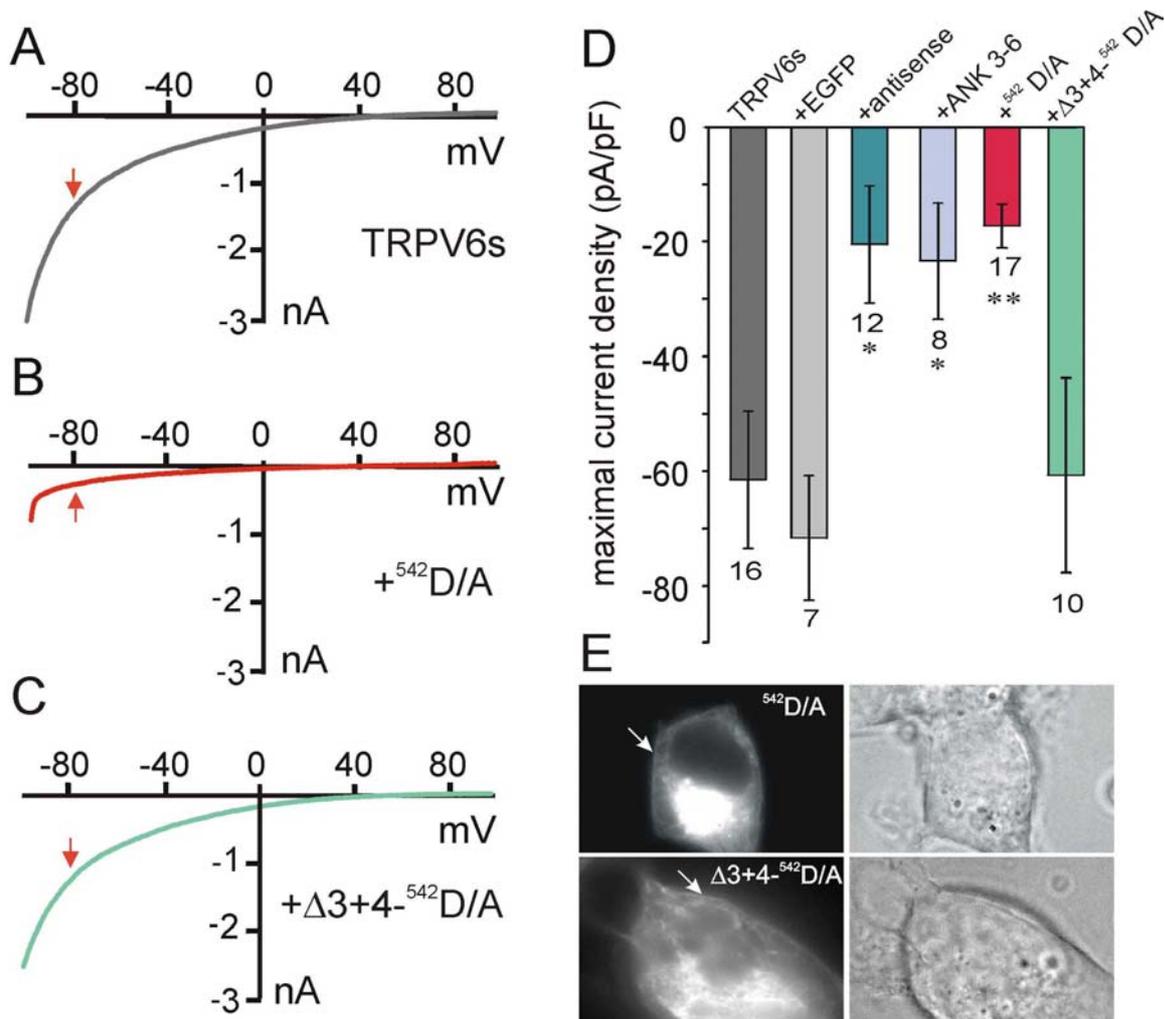


Abbildung 22: Messung dominant-negativer Effekte verschiedener Konstrukte auf den TRPV6-Strom. *A-C*, Repräsentative Strom-Spannungskurven, erzeugt mit Spannungsrampen von -100 bis +100 mV unter Bedingungen, die zum Erzielen maximaler TRPV6-Ströme optimal sind: *A*, stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie; *B*, stabile HEK293-TRPV6-Zellen, transfiziert mit der ⁵⁴²D/A-Mutante; *C*, stabile HEK293-TRPV6-Zellen, transfiziert mit der ΔANK 3+4-⁵⁴²D/A-Mutante. *D*, Statistische Auswertung der Messungen; gezeigt sind die Durchschnittswerte maximaler Stromdichten ± SE (Standardfehler des Mittelwertes). An jedem Balken ist die Anzahl der gemessenen Zellen vermerkt. Mit TRPV6s bezeichnet ist die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie, EGFP steht für mit pCAGGS-IRES-EGFP transfizierte Zellen; antisense bedeutet TRPV6 in Antisense-Orientierung. ANK 3-6 steht für ANK3-6-EGFP; ⁵⁴²D/A für die TRPV6-Porenmutante ⁵⁴²D/A-EGFP. ΔANK 3+4-⁵⁴²D/A steht für ΔANK 3+4-⁵⁴²D/A-EGFP, d.h. die Deletion der Region ANK 3+4 aus der Porenmutante. Signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (im Vergleich zu untransfizierten Zellen), die Auswertung erfolgte anhand eines Student-t-Tests. *E*, Linke Spalte: Nachweis der Lokalisierung an der Plasmamembran von ⁵⁴²D/A-EGFP und ΔANK 3+4-⁵⁴²D/A-EGFP in HEK293-Zellen durch Detektion der Fluoreszenz. In der rechten Spalte sind die den Fluoreszenzabbildungen entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt.

In Strommessungen der stabilen HEK293-TRPV6-Zelllinie konnten einwärts rektifizierende Kalziumströme beobachtet werden, die zwar etwas kleiner waren als in mit TRPV6 transient transfizierten HEK-Zellen, aber hinsichtlich charakteristischer Parameter wie Umkehrpotential, Rektifizierung und Selektivität mit diesen übereinstimmten (Abbildung 22 A). Im Durchschnitt betrug die maximale Stromdichte $-61,5 \pm 12$ pA/pF bei -80 mV Rampenspannung (Abbildung 22 D). Diese TRPV6-spezifischen Ströme konnten durch die transiente Expression eines TRPV6-Antisense-Konstrukts, welches von U. Wissenbach hergestellt worden war, signifikant reduziert werden; hier betrug die maximale Stromdichte $-20,5 \pm 10$ pA/pF. Im Gegensatz dazu konnte durch transiente Transfektion mit einem Plasmid, welches nur für EGFP kodiert, dieser Effekt nicht erzielt werden; die maximale Stromdichte betrug $-71,6 \pm 11$ pA/pF (Abbildung 22 D). Die zusätzliche Expression von ANK 3-6-EGFP reduzierte 48 h nach Transfektion die Stromdichten um ungefähr 60 % auf $+23,4 \pm 10$ pA/pF (Abbildung 22 D). Dies zeigt, dass die Interaktionsdomäne innerhalb von ANK 3-6 einen dominant-negativen Effekt auf den TRPV6-spezifischen Strom hat.

Für TRPV6 von Maus und TRPV5 von Kaninchen wurde bereits gezeigt, dass die Mutation eines Aspartat-Restes im Selektivitätsfilter der Pore einen vollständigen Verlust der Kalziumleitfähigkeit bewirkt (Nilius et al., 2001a; Voets et al., 2003). Nach Einführung der entsprechenden Mutation (⁵⁴²D/A) in humanes TRPV6 ließ sich keine Ionenleitfähigkeit mehr feststellen. Deshalb wurde diese ⁵⁴²D/A-Mutante hinsichtlich dominant-negativer Effekte auf den TRPV6-Strom getestet. Hierbei zeigte sich, dass sie bei transienter Expression in den stabilen TRPV6-Zellen deren maximale Stromdichte auf $-17 \pm 3,8$ pA/pF verringern konnte (Abbildung 22 B und D). Anschließend sollte untersucht werden, ob die Deletion der 79 Aminosäurereste 113 bis 191, welche die Region ANK 3+4 beinhalten, bei ⁵⁴²D/A die Aufhebung des dominant-negativen Effekts zufolge hat. Hierzu wurden die stabile TRPV6-Zellen mit der entsprechenden Mutante ⁵⁴²D/A- Δ ANK 3+4 transient transfiziert; Messungen dieser Zellen ergaben eine Stromdichte von $-60,7 \pm 17$ pA/pF (Abbildung 22 C und D), der dominant-negative Effekt wurde also durch die Deletion aufgehoben. Zur Kontrolle der Lokalisierung von ⁵⁴²D/A und Δ ANK 3+4-⁵⁴²D/A wurden diese Konstrukte in HEK293-Zellen transfiziert und die Fluoreszenz mikroskopisch detektiert, wobei bei beiden Konstrukten Signale an der Plasmamembran sichtbar waren (Abbildung 22 E). Zudem unterscheiden sich diese beiden Konstrukte nur durch den mutierten einen Aminosäurerest von TRPV6 und Δ ANK 3+4, für welche eine Plasmamembran-Lokalisierung durch Biotinylierung bereits gezeigt wurde (Abbildung 20).

8.1.10 TRPV6-INTERAKTIONSTUDIEN IN BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEMEN

Anhand eines Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems wurde die durch Ko-Immunitäzitation identifizierte homotypische TRPV6-Interaktion bestätigt und die Interaktionsdomäne näher spezifiziert. Im Gegensatz zur Ko-Immunitäzitation, bei welcher ein verkürztes TRPV6-Fragment jeweils auf Interaktion mit dem Vollängen-TRPV6-Protein untersucht wurde, besteht hier die Möglichkeit, zwei verkürzte TRPV6-Fragmente auf Interaktion miteinander zu testen und so die Interaktionsregion genauer zu definieren.

HERSTELLUNG DER KONSTRUKTE FÜR DIE BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEME

Alle Fragmente für die Bakterien-Zwei-Hybrid-Systeme wurden gerichtet kloniert, indem die jeweiligen cDNS-Fragmente anhand der Restriktionsschnittstellen EcoR I und BamH I sowohl in das pBTL-Plasmid als auch in das pTRG-Plasmid eingefügt wurden. Eine Ausnahme stellte der TRPV6-Carboxyterminus dar, der eine BamH I-Restriktionsschnittstelle enthält und deshalb in beide Plasmide anhand der Schnittstellen EcoR I und Xho I eingefügt wurde. Um die Fragmente im Fall von pBTL korrekt mit λ cI und im Fall von pTRG korrekt mit der RNS-Polymerase α -Untereinheit zu fusionieren, wurde auf die Einhaltung des Leserahmens geachtet. Zusätzlich wurde an den Carboxyterminus jedes Fragmentes ein Stop-Kodon angefügt. Die verkürzten Fragmente wurden entweder nur in ein Plasmid oder in beide Plasmide inseriert, eine genaue Auflistung der Konstrukte ist in der Liste auf Seite 24 gegeben.

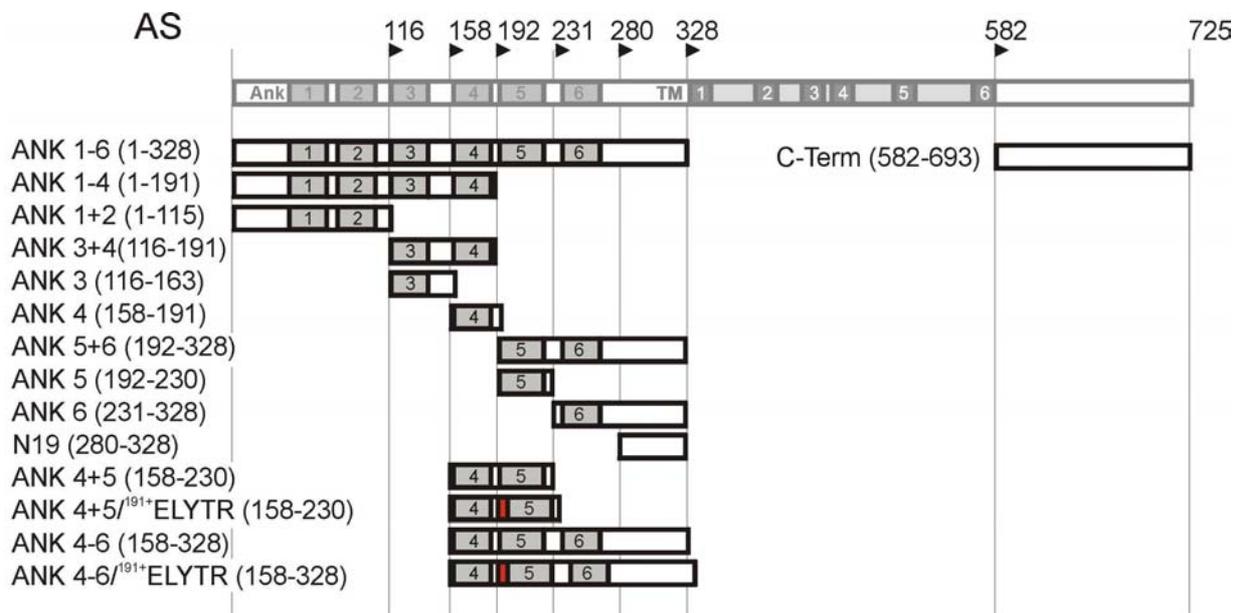


Abbildung 23: Übersicht über die verkürzten TRPV6-Konstrukte zur Untersuchung im Bakterien-Zwei-Hybrid-System. Einschübe von Aminosäureresten (AS) sind als rote Felder gekennzeichnet. Bei ANK 4+5/¹⁹¹⁺ELYTR bzw. ANK 4-6/¹⁹¹⁺ELYTR wurden an Position 191 die fünf Aminosäurereste „ELYTR“ eingeschoben. C-Term steht für Carboxyterminus. In Nummern angegeben ist die Position der Aminosäurereste. Vollängen-TRPV6 ist zur Orientierung gezeigt, wurde aber nicht getestet.

TRPV6-INTERAKTIONSSSTUDIEN IM BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

Alle Experimente im Bacteriomatch[®]-System wurden wie unter Methoden (Seite 49) beschrieben durchgeführt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aller Interaktionsexperimente gezeigt. Die aminoterminalen Region ANK 3+4 war in diesem System zur homotypischen Interaktion fähig, sie konnte also als Interaktionsdomäne bestätigt werden. Ein Fragment, welches nur ANK 3 umfasst, zeigte auch noch eine etwas abgeschwächte Interaktion mit ANK 3+4. Zudem konnte für das Fragment ANK 5+6 eine starke homotypische Interaktion festgestellt werden, auch mit dem Fragment ANK 5 interagierte ANK 5+6. Außerdem wurde eine starke heterotypische Interaktion zwischen Region ANK 3+4 und Region ANK 5+6 detektiert.

pBTL	AS	ANK	pTRG	AS	ANK	Interaktion
hTRPV6 NT	1-329	1-6	hTRPV6 NT	1-328	1-6	-
	1-191	1-4		116-191	3+4	+++
				116-163	3	++
				158-191	4	-
				192-328	5+6	+
	116-191	3+4	116-191	3+4	+++	
			116-163	3	++	
			158-191	4	-	
			192-328	5+6	+++	
			192-230	5	+++	
			231-328	6	-	
			280-328	-	-	
	192-329	5+6	192-328	5+6	+++	
			192-230	5	+++	
			231-328	6	-	
			280-328	-	-	
			116-191	3+4	+++	
			116-163	3	++	
			158-191	4	-	
hTRPV6 CT 582-725			hTRPV6 CT 582-725			-
pBTL			alle TRPV6 pTRG Konstrukte			-
alle TRPV6 pBTL Konstrukte*			pTRG			-
*außer 1-115 Ank 1+2			pTRG			++
pBT-LGF			pTRG-Gal11P			++

Tabelle 3: Eingrenzung von Interaktionsstellen innerhalb des TRPV6-Aminoterminus mit dem Bacteriomatch[®]-System. pBTL und pTRG sind Köder- und Ziel-Plasmide, welche die aufgeführten aminoterminalen (NT) oder carboxyterminalen (CT) TRPV6-Fragmente enthalten. Die Interaktionsstärke, detektiert als Kolonienzahl pro Platte, wurde wie folgt definiert: < 100 Kolonien: -; > 100 Kolonien: +; > 300 Kolonien: ++; > 1000 Kolonien: +++. pBT-LGF2 und pTRG-Gal 11 dienen als Positivkontrolle.

Für jedes rekombinante Plasmid wurde zunächst ausgeschlossen, dass das zu untersuchende Protein alleine eine Transkriptionsaktivierung auslöst; nur ANK 1+2/pBTL konnte alleine die Transkription der

Reportergene auslösen und wurde deshalb nicht weiter verwendet. Die beobachteten positiven Interaktionen waren unabhängig davon, in welches der beiden Plasmide das zu untersuchende Fragment inseriert war. Es wurde keine homotypische Interaktion des Carboxyterminus beobachtet und damit die Ergebnisse der Ko-Immünpräzipitation bestätigt. Die mangelnde Fähigkeit des Vollängen-Aminoterminus zur homotypischen Interaktion könnte auf eine veränderte Faltung der Proteine im Bakterium hindeuten.

TRPV6-INTERAKTIONSSSTUDIEN IM BACTERIOMATCH® II-SYSTEM

Im Bacteriomatch® II-System wurden im Vergleich zum alten Bacteriomatch®-System die Reportergene ausgewechselt; die Bakterien erhalten bei positiver Interaktion die Fähigkeit zum Wachstum auf Histidin-Mangelmedien. Da dieses System stringenter ist als das Bacteriomatch®-System, wurde kein unspezifisches Wachstum von Kolonien beobachtet. Die Kotransformationen wurden, wie unter Methoden (Seite 52) beschrieben, durchgeführt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse aller durchgeführten Experimente.

pBTL	AS	ANK	pTRG	AS	ANK	Interaktion	
hTRPV6 NT	1-115	1+2	hTRPV6 NT	1-191	1-4	-	
				116-191	3+4	+++	
	116-191	3+4	hTRPV6 NT	116-191	3+4	+++	
				158-230	4+5	+++	
				158-230/191+ELYTR	4+5	++	
				192-230	5	+	
	192-329	5+6	hTRPV6 NT	116-163	3	-	
				192-230	5	+++	
				158-230	4+5	+++	
				158-230/191+ELYTR	4+5	-	
hTRPV6 CT 582-725			hTRPV6 NT 1-328			1-6	-
pBTL			alle TRPV6 pTRG Konstrukte			-	
alle TRPV6 pBTL Konstrukte			pTRG			-	
pBT-LGF			pTRG-Gal11P			+++	

Tabelle 4: Bestätigung bekannter Interaktionsstellen im TRPV6-Aminoterminus und Untersuchung der ANK 1+2-Region und des Einschubes von „ELYTR“ an Position 191 im Bacteriomatch® II-System. pBTL und pTRG sind Köder- und Ziel-Plasmide, welche die aufgeführten aminoterminalen (NT) oder carboxyterminalen (CT) TRPV6-Fragmente enthalten. Die Interaktionsstärke, detektiert als Kolonienzahl pro Platte, wurde wie folgt definiert: < 100 Kolonien: -; > 100 Kolonien: +; > 300 Kolonien: ++; > 1000 Kolonien: +++. pBT-LGF2 und pTRG-Gal 11 dienen als Positivkontrolle. hTRPV6 steht für TRPV6 von Mensch.

Die homotypischen Interaktionen der Domänen ANK 3+4 bzw. ANK 5+6 konnten bestätigt werden, ebenso die heterotypische Interaktion zwischen den beiden Regionen. In diesem System wurde für ANK 1+2/pBTL alleine keine Transkription der Reportergene festgestellt; deshalb wurde es auf Interaktion mit ANK 1-4 und ANK 3+4 getestet und eine starke Interaktion mit ANK 3+4 festgestellt. Die Kotransformation des Aminoterminus mit dem Carboxyterminus zeigte keine Interaktion. Bei Untersuchung des Fragments ANK

4+5 konnte eine starke Interaktion mit ANK 3+4 bzw. ANK 5+6 festgestellt werden. Modifizierte man die Sequenz durch Einschub der Aminosäurereste „ELYTR“ an Position 191, analog zu Konstrukt +5p2, so wurde die Interaktion dieses Konstruktes mit ANK 3+4 im Vergleich zu ANK 4+5 abgeschwächt, während die Interaktion mit ANK 5+6 aufgehoben wurde. Da Konstrukt +5p2 zwar mit TRPV6 ko-präzipitieren konnte, aber keinen funktionsfähigen Kanal mehr ausbildete (siehe Abbildung 19), könnte dies darauf hindeuten, dass ANK 5 eine weitere Region ist, die zusammen mit der homotypischen Interaktion von ANK 3 zur Ausbildung funktioneller TRPV6-Kanäle benötigt wird.

Ausgehend von der Information des Herstellers des Bacteriomatch[®] II-Systems, dass das eingesetzte Mangelmedium zu wenig zweiwertige Ionen zur Auffindung ionenabhängiger Interaktionen enthält, kann angenommen werden, dass die homotypische TRPV6-Interaktion nicht die Gegenwart zweiwertiger Ionen benötigt.

8.2 TRPV6 HETEROMULTIMERISIERUNG

Da durch Heteromultimerisierung von TRP-Proteinen theoretisch Ionenkanäle mit veränderten Eigenschaften gebildet werden können, interessierten wir uns dafür, ob verschiedene TRPV-Kanäle direkt miteinander interagieren. In der Literatur gibt es einige Hinweise auf die Modifikation der Eigenschaften von Ionenkanälen durch Heteromultimerisierung. So wurden bei TRPV5/V6-Heteromultimeren definierter Stöchiometrie veränderte elektrophysiologische Eigenschaften der Kanäle beobachtet (Hoenderop et al., 2003). Außerdem wurde in *Caenorhabditis elegans* gezeigt, dass die Lokalisierung der beiden TRPV-homologen Proteine OSM-9 und OCR-2 von ihrer Koexpression abhängig ist (Tobin et al., 2002).

Ich habe durch Ko-Immünpräzipitation untersucht, ob das TRPV6-Protein von Mensch mit TRPV1 von Ratte, TRPV2 von Ratte, TRPV2 von Maus, TRPV3 von Maus und TRPV4 von Maus wechselwirken kann.

8.2.1 KLONIERUNG VERSCHIEDENER TRPV-KONSTRUKTE ZUR KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Die cDNS von TRPV2 von Ratte, TRPV2 von Maus und TRPV3 von Maus wurde von M. Caterina zur Verfügung gestellt. Zusammen mit der cDNS von TRPV1 von Ratte und TRPV4 von Maus wurden die Sequenzen mithilfe der PCR-Methode durch jeweils unterschiedliche Restriktionsschnittstellen in das pEYFP-N1-Plasmid eingefügt. Da dieses Plasmid bereits eine EYFP-Sequenz enthält, entstanden Fusionsproteine mit carboxyterminalem EYFP. TRPV1 wurde zusätzlich auch in ein EGFP/pcDNA3-Plasmid kloniert, so dass ein carboxyterminales EGFP-Fusionsprotein entstand. Die genauen Angaben zu den Klonierungsstrategien sind in der Konstruktliste aufgeführt (siehe Seite 30). Zur Klonierung der TRPV1-Punktmutante ²²⁰LV²²¹/TR wurde eine gezielte Punktmutagenese angewandt. Es wurden zwei Aminosäurereste innerhalb der putativen Ank 3-Region ausgetauscht, welche den Aminosäureresten ¹³⁶LL¹³⁷/TR der TRPV6-Sequenz von Mensch entsprechen.

8.2.2 HETEROTYPISCHE KO-IMMUNPRÄZIPITATION VON TRPV6

Zunächst wurden die TRPV-EYFP oder -EGFP-Fusionsproteine transient in die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert. Aus diesen Zellen wurden Lysate hergestellt, anschließend wurde die Koimmunpräzipitation wie unter Methoden beschrieben durchgeführt. Zur Präzipitation wurde der Antikörper 429 eingesetzt und die Untersuchung, ob TRPV-Fusionsproteine mit TRPV6 ko-präzipitierten, erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper.

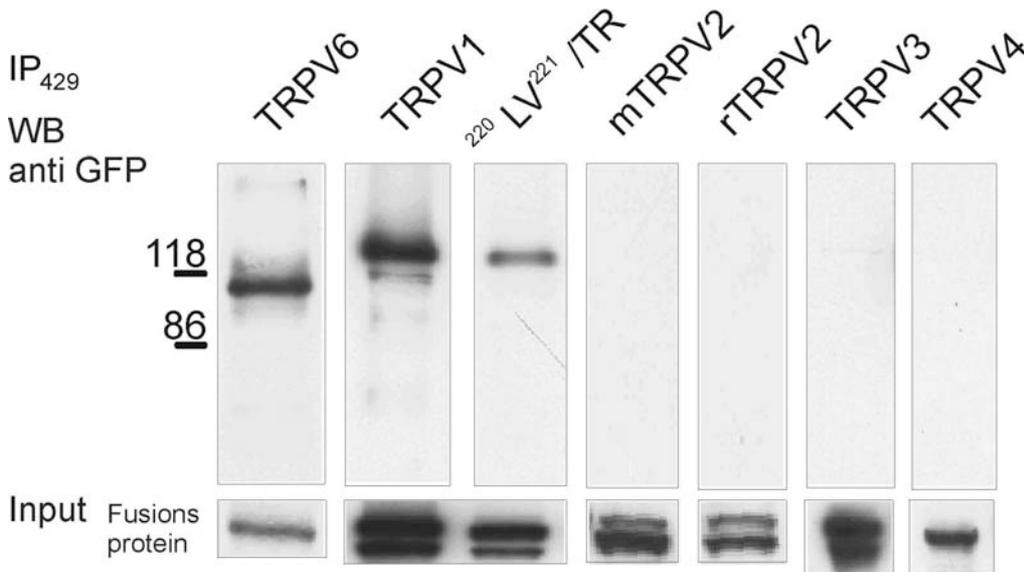


Abbildung 24: Die Fusionsproteine wurden transient in die stabile HEK293-TRPV6-Zelllinie transfiziert. Zum Präzipitieren wurden 2 µg des Antikörpers 429 eingesetzt, zum Detektieren ein anti-GFP-Antikörper (1:1000). Um die jeweils eingesetzte Menge an Fusionsprotein vergleichen zu können, sind Protein-Fällungen der Zelllysate (Input) gezeigt. Theoretische Molekulargewichte: TRPV6 Δ 32-EGFP ~106 kD; TRPV1-EGFP ~121 kD; TRPV2-EYFP von Maus bzw. Ratte ~115 kD; TRPV3-EYFP ~119 kD; TRPV4-EYFP ~127 kD.

Als Positivkontrolle diente die homotypische Interaktion des TRPV6-EGFP-Fusionsproteins mit TRPV6, die schon in Abbildung 9 (siehe Seite 72) erläutert wurde. Bei der Ko-Immünpräzipitation von TRPV1 mit TRPV6 wird das TRPV1-Protein zusammen mit TRPV6 präzipitiert. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers 429 mit TRPV1 kann hierbei ausgeschlossen werden, denn bei Inkubation eines unabhängigen TRPV1-Lysats mit Antikörper 429 wurden keine Proteine erkannt. Um zu untersuchen, ob für diese Interaktion ähnliche Domänen notwendig sind wie für die homotypische TRPV6-Interaktion, wurde in TRPV1 die Mutation ²²⁰L V²²¹/TR eingeführt. Diese Aminosäurereste entsprechen bei TRPV6 ¹³⁶LL¹³⁷, deren Austausch zu „TR“ eine Zerstörung der Interaktion in der Ko-Immünpräzipitation zur Folge hatte (siehe Abbildung 19). Für die ²²⁰LV²²¹/TR-TRPV1-Mutante kann eine abgeschwächte Bindung an TRPV6 detektiert werden. Da die Interaktion allerdings nicht völlig zerstört ist, spielen vermutlich weitere Regionen für die Interaktion zwischen TRPV6 und TRPV1 eine Rolle. Alle weiteren getesteten TRPV-EYFP-Fusionsproteine ko-präzipitierten nicht mit TRPV6. Dieses Ergebnis wurde in jeweils zwei unabhängigen Experimenten vorgefunden. Interessanterweise zeigten heterolog exprimierte TRPV1-²²⁰LV²²¹/TR-Kanäle in Strommessungen keine Ionenkanalaktivität (B.Niemeyer, bisher unveröffentlichte Daten).

8.3 SUCHE NACH TRPV6 INTERAKTIONSPARTNERN IM BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM

Da bisher nur wenige regulatorische Proteine bekannt sind, die mit TRPV6 wechselwirken, sollten solche Proteine identifiziert werden. Diese Identifizierung sollte anhand der Durchsuchung von cDNS-Bibliotheken mit einem Bakterien-Zwei-Hybrid-System ermöglicht werden. Die Wahl fiel auf ein Bakterien-Zwei-Hybrid-System, weil mit diesem System im Vergleich zum Hefe-System eine höhere Transformations-effizienz erreicht werden sollte und die Plasmid-DNS nicht in den Zellkern transportiert werden muss. Beides ist theoretisch von Vorteil bei der Durchsuchung großer Bibliotheken und sollte die Identifizierung selten vorkommender Bindungspartner erleichtern. Wir durchsuchten zwei verschiedene cDNS-Bibliotheken nach Interaktionspartnern für TRPV6.

Im ersten Versuch wurde eine cDNS-Bibliothek aus Plazenta von Mensch hergestellt und im Bacteriomatch[®]-System nach Interaktionspartnern für den TRPV6-Carboxyterminus gesucht. Im zweiten Versuch wurde eine von Stratagene gekaufte cDNS-Bibliothek aus humanem Pankreas mit dem Bacteriomatch[®] II-System nach Interaktionspartnern für den TRPV6-Carboxyterminus durchsucht. Das Bacteriomatch[®] II-System enthält neue Reportergene, welche im Vergleich zum Bacteriomatch[®]-System weniger unspezifisches Kolonienwachstum erlauben.

8.3.1 DURCHSUCHUNG EINER PLAZENTA-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH[®]-SYSTEM

Eine cDNS-Bibliothek aus Plazenta von Mensch wurde mit einem „Bacteriomatch[®] Two-Hybrid System Library Construction Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers hergestellt und in das pTRG-Plasmid eingefügt. Es wurden zwei Versuche zur Konstruktion der Bibliothek unternommen, denn die vom Hersteller angegebenen 5 µg Poly(A)⁺ RNS ergaben im ersten Versuch zu wenig unabhängige in pTRG inserierte cDNS Klone. In einem zweiten Versuch wurde deshalb die Bibliothek mit zwei Ansätzen zu je 12 µg Poly(A)⁺ hergestellt, welche als Ansatz A und Ansatz X bezeichnet wurden. Die cDNS-Fragmente wurden nach ihrer Größe fraktioniert und nach Detektion auf PAGE-Gelen aufgetrennt und vereinigt. Die erste vereinigte Fraktion setzte sich aus den Fraktionen 5A+6X zusammen und enthielt cDNS-Fragmente, welche größer als 1000 bp waren; in der zweiten Fraktion wurden die Fraktionen 7A+8X vereinigt, welche cDNS-Fragmente von etwa 1000 bp enthielten; Fraktion drei wurde gebildet aus den Fraktionen 8A+9X mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von unter 1000 bp. Eine Test-Ligation mit 30 ng Fraktion 7A+8X und 30 ng pTRG XR ergab nach Hitzeschocktransformation eine Transformationseffizienz von $2,2 \times 10^5$ Kolonien pro µg Plasmid und lag damit über dem laut Hersteller angegebenen Sollwert von 1×10^5 . Anschließend wurden drei Ligationen im Großmaßstab mit jeweils etwa 150 ng der drei vereinigten Fraktionen und 150 ng pTRG XR durchgeführt. Nach der Vereinigung, Fällung und Quantifizierung der drei Ansätze wurde diese cDNS nicht amplifiziert, sondern direkt zur Test-Kotransformation eingesetzt. Diese wurde mit 60 ng Plazenta-Bibliothek/pTRG und 50 ng TRPV6-Carboxyterminus/pBTL durchgeführt. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt, daraus ergab sich für die Kotransformation der gesamten Plazenta-Bibliothek eine theoretische Kolonienausbeute von mindestens $4,5 \times 10^4$. Dieser Wert war zu niedrig; optimal wären mindestens $1-2 \times 10^6$ gewesen. Es folgte die Kotransformation der restlichen 1350 ng Plazenta-Bibliothek/pTRG mit 1500 ng TRPV6-Carboxyterminus/pBTL, verteilt auf elf Transformationsansätze.

Diese wurden auf 22 LB-CTCK-Agarplatten (Durchmesser 150 mm) mit 250 µg/ml Carbenicillin ausplattiert. Die Ausbeute betrug nach 24 Stunden 39 große und 92 kleine Kolonien. Nach 48 Stunden wurden bereits 155 große und etwa 800 kleine Kolonien ausgezählt. Von 596 Kolonien wurden Vorkulturen angeimpft und daraus die DNS präpariert. Die DNS wurde mit EcoR I und Xho I geschnitten und nach Auftrennung im Agarose-Gel die Größe der im pTRG-Plasmid enthaltenen cDNS-Fragmente erfasst. Weiterhin wurden alle 596 Kolonien auf Aktivierung des Reportergens β -Galaktosidase getestet, indem sie auf LB-CTCK-Agarplatten mit 250 µg/ml Carbenicillin und X-Gal/IPTG überführt wurden. Insgesamt zeigten 424 Kolonien eine unterschiedlich intensive Blaufärbung. Anschließend wurde die cDNS von 148 Klonen, die starke Blaufärbung zeigten und große inserierte cDNA-Fragmente besaßen, mittels PCR amplifiziert. Bei 117 Klonen wurde cDNS synthetisiert, die sequenziert wurde. Alle Sequenzen wurden mithilfe des Blast X-Programms der NCBI-Datenbank, welches Nukleotidsequenzen in Proteinsequenzen übersetzt und mit einer Datenbank abgleicht, einem Protein zugeordnet.

Am häufigsten wurde Somatotropin mit insgesamt 32 Klonen identifiziert, diese lagen in allen drei Leserahmen vor. Ein Retest im Bacteriomatch[®]-System ergab, dass der Somatotropin-Klon 8-5, der im falschen Leserahmen vorlag, alleine eine Transkriptionsaktivierung der Reportergene bewirkte. Weiterhin wurden acht Klone identifiziert, die im richtigen Leserahmen inseriert waren. Aus diesen wurde jeweils das pTRG-Plasmid, das ein Tetracyclin-Resistenzgen enthält, durch Selektion mithilfe von Tetracyclin isoliert. Danach wurde getestet, ob das Plasmid alleine die Transkriptionsaktivierung der Reportergene auslöste (Negativkontrolle) und ob es mit dem TRPV6-Carboxyterminus interagiert. Die Klone 2-6 (amiloride binding protein), 3-33 (tissue factor pathway inhibitor), 8-9 (brain protein 13), 9-3 (ATPase) und 17-26 (tumor protein) konnten im Bacteriomatch[®]-System ohne einen Interaktionspartner die Transkription der Reportergene aktivieren. Bei einem späteren Retest im Bacteriomatch[®]II aktivierte keiner dieser Klone mehr alleine die Transkription der Reportergene, möglicherweise aufgrund der verbesserten Reporter-kassette. Allerdings zeigte auch kein Klon eine Interaktion mit TRPV6-Carboxyterminus. Klon 9-3 lieferte in zwei unabhängigen Kotransformationen, die als Kontrolle mit nicht-selektivem Medium durchgeführt wurden, keine Kolonien. Die beiden Klone 10 (sec 63) und 18-6 (hypothetical protein BC 015148) schienen im Bacteriomatch[®]-Retest schwach mit dem TRPV6-Carboxyterminus zu interagieren; auf der Negativkontrolle waren nur wenige kleine, weiße Kolonien erkennbar. Beim Retest im Bacteriomatch[®]II-System konnten jedoch weder in der Negativkontrolle noch bei Verwendung von Selektionsmedium Kolonien detektiert werden. Die Interaktion zwischen sec 63 und TRPV6 ließ sich weder durch Ko-Immunpräzipitation noch durch Pulldown-Experimente bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Da möglicherweise die Selektion mit 250 µg/ml Carbenicillin nicht effektiv genug war, wurden 580 Klone aus zuvor angelegten Stammkulturen auf Medium mit 600 µg/ml Carbenicillin ausgestrichen. Es wurden 69 Klone untersucht, die nach 24stündiger Inkubation bei 30 °C starkes Wachstum zeigten. Von diesen wurden die in pTRG inserierten Fragmente amplifiziert; es entstanden 68 PCR-Amplifikate, welche sequenziert wurden. Mithilfe von Blast X wurden die Proteinsequenzen von 48 Klonen identifiziert; 10 Klone davon waren im richtigen Leserahmen in pTRG inseriert. Durch einen Retest im Bacteriomatch[®]II-System wurde für folgende Klone geprüft, ob sie eine Transkriptionsaktivierung der Reportergene ohne Interaktionspartner auslösten oder tatsächlich mit dem TRPV6-Carboxyterminus interagierten: 2-8 (histamine releasing factor

4567669), 6-1 (unknown protein 354315), 12 (similar to MSTP076), 13-1 (hypothetical protein MGC2198), 18-9 (transmembrane protein BRI), 20-2 (osteopontin) und 8-6 (eosinophil basic protein). Allerdings zeigte keiner der Klone eine Interaktion mit TRPV6-Carboxyterminus.

8.3.2 DURCHSUCHUNG EINER PANKREAS-CDNS-BIBLIOTHEK IM BACTERIOMATCH®II-SYSTEM

Eine weitere cDNS-Bibliothek aus Pankreas von Mensch, die bereits in das pTRG-Plasmid inseriert und zur Anwendung im Bacteriomatch®II-System bestimmt war, sollte $1,82 \times 10^6$ unabhängige Klone enthalten und war bereits amplifiziert worden. Zur Isolierung der rekombinanten pTRG-Plasmide mussten zuerst die Bakterien vermehrt werden. Dies geschah in einer halbfesten Agarose-Gel-Matrix, zum optimalen Erhalt der Repräsentanz seltener Klone (siehe Methoden Seite 57). Eine Überprüfung des Titers der Bibliothek ergab $5,9 \times 10^8$ cfu/ml. Aufgrund der drei Leserahmen sollte die Bibliothek mindestens dreifach über der Zahl liegen, mit der theoretisch jede mRNA repräsentiert ist. Diese Zahl lag für die Pankreas-Bibliothek bei $3 \times 1,82 \times 10^6$ bzw. bei $5,46 \times 10^6$ cfu. Diese Zahl wurde erreicht, indem acht Liter Medium mit $6,6 \times 10^6$ cfu beimpft wurden. Im Gegensatz zu vorher durchgeführten Wachstumsversuchen in kleineren Volumina, erwärmte sich der aus acht Liter Medium bestehende Großansatz langsamer und wuchs mit leichter Verzögerung (siehe Abbildung 6, Seite 57). Nach 40 Stunden Inkubation bei 30 °C war eine Kolonienzahl von $1,6 \times 10^{11}$ cfu/8 l erreicht, die Bibliothek war somit um den Faktor $2,4 \times 10^4$ amplifiziert worden. Anschließend wurde die Plasmid-DNS durch eine Qiagen Low-Copy-Maxi-Präparation isoliert, die Ausbeute betrug 770 µg Plasmid-DNS. Theoretisch sollte eine repräsentative cDNS-Bibliothek in 32 ng Plasmid-DNS enthalten sein.

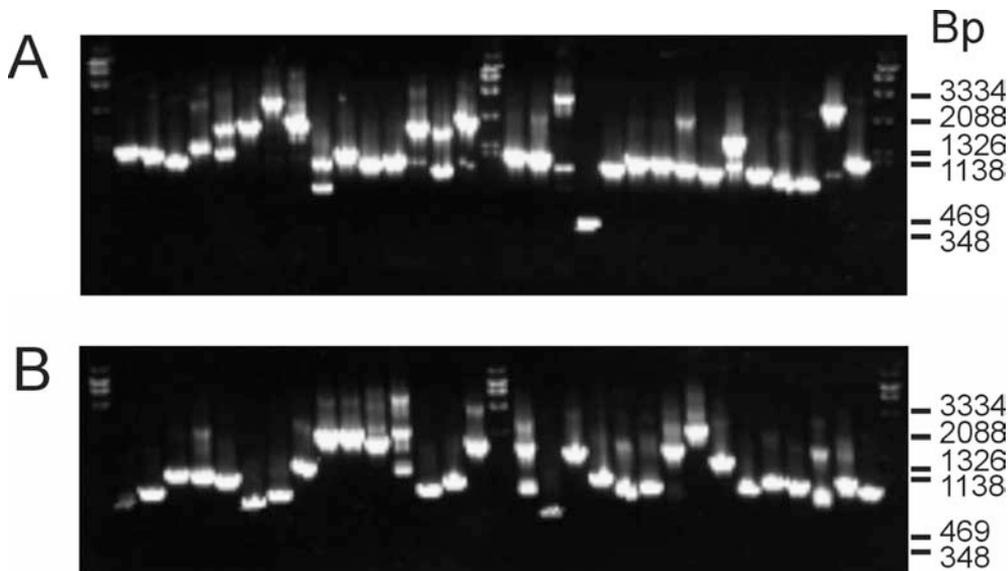


Abbildung 25: Kolonien-PCR von Klonen der cDNS-Bibliothek aus Pankreas. *A*, Aus Klonen der Original-cDNS-Bibliothek wurde mittels PCR die jeweils in pTRG inserierte cDNS amplifiziert. *B*, Aus Klonen der in halbfester Agarose amplifizierten cDNS-Bibliothek wurde mittels PCR die jeweils in pTRG inserierte cDNS amplifiziert. Es wurden je 30 Kolonien zufällig ausgewählt. Als Primer zur PCR-Amplifikation der Fragmente wurden pTRGfor2 und BAN145 (pTRG rev) eingesetzt. DNS-Marker: M9. Bp =Basenpaare.

Vor und nach der Amplifikation in halbfester Agarose wurden Stichproben von cDNS-Klonen genommen und die Größe der inserierten cDNS-Fragmente durch Kolonien-PCR und Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. So wurde sichergestellt, dass sich die Größenverteilung der inserierten Fragmente der Pankreas-Bibliothek durch die Amplifikation nicht verändert hatte. Vor der Amplifikation betrug die Durchschnittsgröße in pTRG inserierter cDNS-Fragmente ca. 1400 Bp, wie aus einer Kolonien-PCR von cDNS-Klonen der Original-Bibliothek ersichtlich war (Abbildung 25 A). Eine Analyse von cDNS-Klonen der Bibliothek nach der Vermehrung in halbfester Agarose zeigte eine ähnliche Größenverteilung der cDNS-Fragmente wie in der Original-Bibliothek; der Anteil der kleinen Fragmente hatte sich nicht vergrößert (siehe Abbildung 25 B). Die Amplifikation von Bakterien unter anaeroben Bedingungen in halbfester Agarose-Gel-Matrix schien also für alle Klone, ob sie nun Plasmide mit kleinen oder großen inserierten cDNS-Fragmenten enthielten, gleiche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Somit ist diese Methode zur Amplifikation von cDNS-Bibliotheken gut geeignet.

Als nächstes wurde die amplifizierte cDNS-Bibliothek aus Pankreas nach Interaktionspartnern des TRPV6-Carboxyterminus durchsucht. Hierzu wurde zunächst anhand einer Test-Kotransformation mit je 50 ng Bibliothek/pTRG und TRPV6-Carboxyterminus/pBTL eine Kotransformationseffizienz von 2×10^5 cfu/50 ng Bibliothek/pTRG ermittelt. Demnach wären 10 Kotransformationen mit insgesamt 2×10^6 cfu notwendig, um alle unabhängigen Klone der Bibliothek zu erfassen. Es wurden also 10 Ansätze mit je 50 ng Bibliothek/pTRG und TRPV6-Carboxyterminus/pBTL kotransformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Eine Auszählung der Transformanten auf einer Kontrollplatte mit nicht-selektivem Medium ergab, dass die o. g. Zahl um den Faktor Zehn ($1,96 \times 10^7/10\text{ml}$) übertroffen worden war. Auf dem Selektionsmedium waren nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C 1140 Kolonien gewachsen. Diese wurden zur Prüfung auf Aktivierung des zweiten Reportergens Streptomycin-Resistenz auf Selektionsmedium überführt, welches die Selektionsmarker 5 mM 3-Aminotriazol und Streptomycin enthält. Anschließend wurden die Kolonien in einem zweiten Selektionsschritt auf ein Medium mit 7 mM 3-Aminotriazol und Streptomycin überführt. Hierbei zeigte ein Drittel aller Kolonien kein Wachstum. Anschließend folgte die Untersuchung der gewachsenen Klone; es wurden zunächst nur 40 Klone in LB-Medium kultiviert und die Plasmid-DNS isoliert. Diese wurde sequenziert und mit Blast X identifiziert. Es stellte sich heraus, dass 30 Klone der Arginin N-methyltransferase HRMT1L2 entsprachen; ein Klon entsprach Elastase B und einer der Serinprotease HtrA2-p4. Alle Sequenzen waren im richtigen Leserahmen inseriert. Acht Sequenzen waren nicht lesbar.

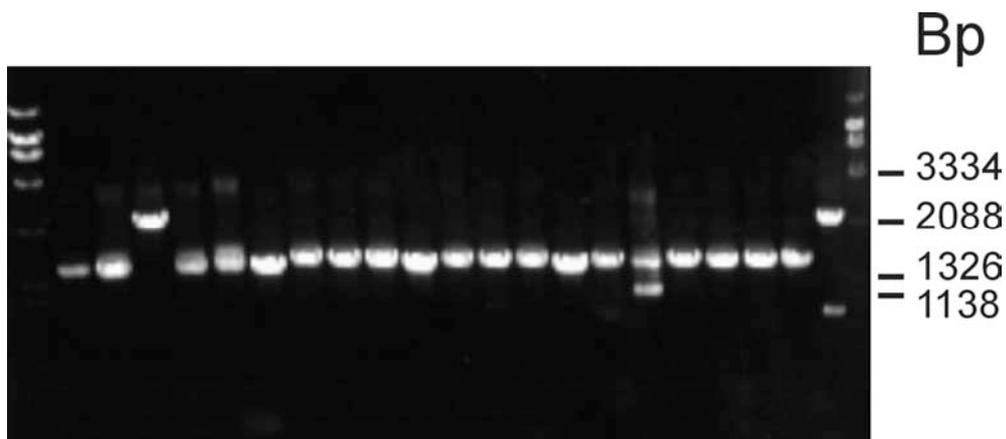


Abbildung 26: Kolonien-PCR von 21 zufällig ausgewählten Kolonien, die nach Kotransformation der Pankreas-cDNS-Bibliothek mit TRPV6-C-Terminus auf dem Selektionsmedium mit 5 mM 3-Aminotriazol gewachsen waren. Als Primer wurden pTRGfor2 und BAN145 (pTRG rev) eingesetzt. DNS-Marker: M9. Bp =Basenpaare.

In einem weiteren Schritt wurden 45 Klone durch Kolonien-PCR auf die Größe der inserierten cDNS überprüft. Hierbei zeigte sich eine auffällige Häufung von Fragmenten mit einer Größe von ca. 1500 Bp (Abbildung 26), was auf die starke Selektion eines bestimmten Klons hindeutete. Diese Größe entsprach der oben beschriebenen häufig vertretenen Arginin N-methyltransferase. Ein Retest der Arginin N-methyltransferase (Klon 2-28) im Bacteriomatch®II-System zeigte, dass dieser Klon alleine eine starke Transkriptionsaktivierung der Reportergene bewirkte. Wegen der starken Präsenz der Arginin N-methyltransferase unter den vorhandenen Klonen, wollten wir diese Klone aussortieren. Dies geschah durch Überführung der Kolonien auf jeweils zwei Duralon-Membranen und Kultivierung. Die Bakterienkolonien jeweils einer Membran wurden lysiert, die Nukleinsäuren durch UV-Licht fixiert und mit einer Arginin N-methyltransferase-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Ergebnis konnten diejenigen Klone, welche die Arginin N-methyltransferase kodierten, identifiziert werden. Es verblieben nur 43 Klone zur weiteren Untersuchung. Sie wurden sequenziert und über Blast X identifiziert. Es fanden sich 14 Serinproteasen, 9 Klone aus der Familie des Chymotrypsins, 6 Elastasen und 5 Carboxypeptidasen sowie ein bakterielles Trypsinogen und eine zur Aldo-Keto-Reduktase-Familie gehörige Proteinsequenz. 7 Klone waren nicht lesbar. Da in jeder der gefundenen Gruppen DNS-Klone sowohl im richtigen als auch falschen Leserahmen vorkamen, waren die jeweils kodierten Proteine für die Identifizierung nicht relevant und wurden nicht weiter getestet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich nach unserer Erfahrung weder das Bacteriomatch® noch das verbesserte Bacteriomatch®II-System eignen, um cDNS-Bibliotheken nach neuen Interaktionspartnern zu durchsuchen (siehe Diskussion).

8.4 TRPM8 HOMOMULTIMERISIERUNG

Zum Abschluss meiner Arbeit habe ich Untersuchungen durchgeführt, um eine mögliche Multimerisierung eines weiteren TRP-Proteins zu untersuchen, von TRPM8. Die cDNS von TRPM8 kodiert für ein aus 1104 Aminosäureresten bestehendes Transmembranprotein mit wahrscheinlich intrazellulär gelegenen Amino- und Carboxytermini. Wahrscheinlich enthält das Protein sechs Transmembrandomänen, wobei allerdings zumindest ein weiterer hydrophober Bereich als Transmembrandomäne fungieren könnte. Weiterhin wird angenommen, dass die Porenregion zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 liegt, wobei es für das mit TRPM8 verwandte TRPM3-Protein bereits Hinweise für die Lokalisierung der Pore in dieser Region gibt (Oberwinkler et al., 2005). Im Gegensatz zu den TRPV- und TRPC-Proteinen enthält der TRPM8-Aminoterminus keine Ankyrin-Repeats. Der strukturell nächste Verwandte des TRPM8-Proteins ist TRPM2. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sich mehrere TRPM8-Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammenlagern.

Um für die Zusammenlagerung von TRPM8 verantwortliche Proteinabschnitte zu identifizieren, wurden zuerst der Aminoterminus und der Carboxyterminus von TRPM8 im Bacteriomatch®II-System untersucht und die erhaltenen Ergebnisse im Anschluss durch Ko-Immünpräzipitation und mithilfe von Saccharose-Dichtegradienten überprüft. Alle Versuche wurden mit TRPM8 von Mensch (Gene Bank Accession Number NM_024080) durchgeführt; diese cDNS war in unserer Arbeitsgruppe von U. Wissenbach kloniert worden.

Bei Untersuchungen im Bacteriomatch®II-System fiel auf, dass die TRPM8-Carboxytermini miteinander wechselwirken. Es wurde deshalb geprüft, ob diese Region Strukturelemente enthält, die für diese Wechselwirkung verantwortlich sein könnten. Eine Analyse der TRPM8-Proteinsequenz mit dem Programm COILS (siehe Seite 33) ergab, dass sich im Carboxyterminus mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Coiled-Coil-Domäne befindet. Bei der Analyse wurden dabei folgende Parameter berücksichtigt: Zur Identifizierung unbekannter Coiled-Coil-Regionen in Proteinen sollten nur Berechnungen für Sequenzabschnitte, die 28 Aminosäurereste umfassen, berücksichtigt werden; weiter sollte die Coil-Wahrscheinlichkeit mindestens 50 % betragen. In einer zweiten Analyse mit 2,5-facher Gewichtung der Aminosäurereste an Positionen a und d der Coiled-Coil-Struktur, die zur Ausbildung einer Interaktionsgrenzfläche wichtig sind, sollte kein abweichendes Ergebnis erzielt werden. Die carboxyterminal gelegene vorhergesagte Coiled-Coil-Domäne in TRPM8 erfüllt diese Kriterien; die Coil-Wahrscheinlichkeit lag bei 100 % und die zweite Analyse wich kaum von der ersten Analyse ab (siehe Abbildung 27 und Tabelle 6). Die übrigen Sequenzabschnitte im Aminoterminus erreichten nur bei analysierten Sequenzabschnitten von 14 Aminosäureresten Länge eine höhere Prozentzahl; dies reicht nicht aus, um Coiled-Coil-Domänen vorherzusagen.

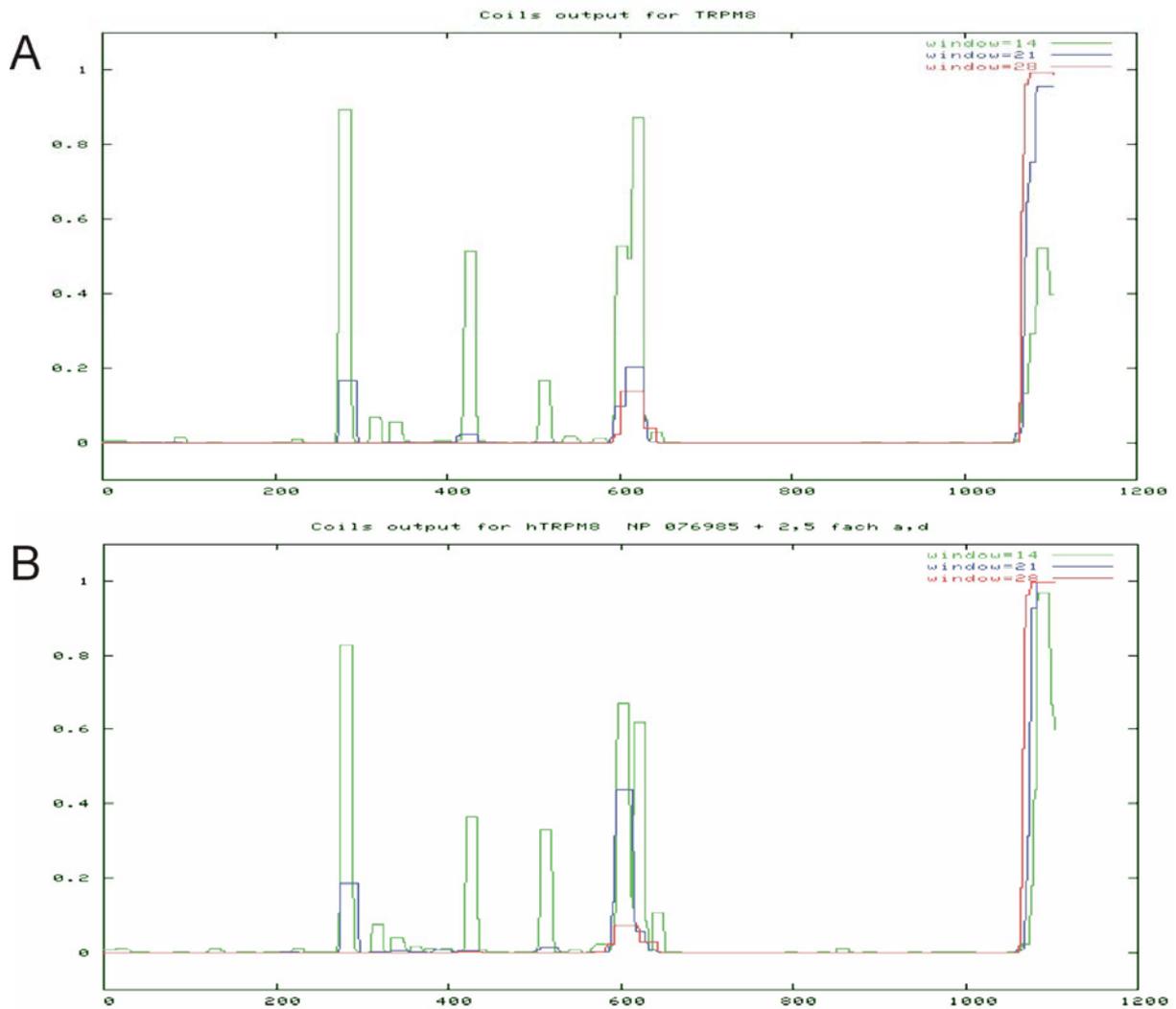


Abbildung 27: Berechnung der Wahrscheinlichkeit von Coiled-Coil-Domänen in TRPM8 von Mensch mit dem Algorithmus COILS. Das Programm gleicht die Proteinsequenz gegen eine Datenbank mit bekannten Coiled-Coil-Sequenzen ab; es werden jeweils drei verschieden lange Sequenzabschnitte („Fenster“ mit je 14, 21 oder 28 Aminosäureresten) bei der Berechnung berücksichtigt. *grün*, Fenster 14; *blau*, Fenster 21; *rot*, Fenster 28. *A*, Berechnung ohne Gewichtung bestimmter Positionen innerhalb der Coiled-Coil-Konsensussequenz; *B*, Berechnung mit 2,5-facher Gewichtung der hydrophoben Positionen a und d im Coiled-Coil. x-Achse: Aminosäurereste von TRPM8 (1-1104), y-Achse: Wahrscheinlichkeit der Coiled-Coil-Bildung, angegeben von 0 (=0 %) bis 1 (=100 %).

8.4.1 UNTERSUCHUNG DER TRPM8-TRPM8-INTERAKTION IM BACTERIOMATCH®II-SYSTEM

Zunächst wurden Untersuchungen im Bacteriomatch®II-System durchgeführt. Hierzu wurden zunächst nur der Aminoterminus bzw. der Carboxyterminus von TRPM8 im Bacteriomatch®II-System auf Wechselwirkung untersucht, wobei die carboxyterminalen Proteinabschnitte stark miteinander interagierten, die aminoterminalen dagegen nicht. Anschließend wurde die Interaktionsstelle im Carboxyterminus mithilfe verkürzter carboxyterminaler Fragmente näher eingegrenzt.

KLONIERUNG REKOMBINANTER TRPM8-KONSTRUKTE FÜR DAS BAKTERIEN-ZWEI-HYBRID-SYSTEM

Die TRPM8-Fragmente wurden in die Plasmide pBTL und/oder pTRG inseriert. Um den Aminoterminus der Fragmente im Fall von pBTL korrekt mit λ cI und im Fall von pTRG korrekt mit der RNS-Polymerase α -Untereinheit zu fusionieren, wurde die Einhaltung des Leserahmens beachtet. Zusätzlich wurde carboxyterminal an jedes Fragment ein Stop-Kodon angefügt.

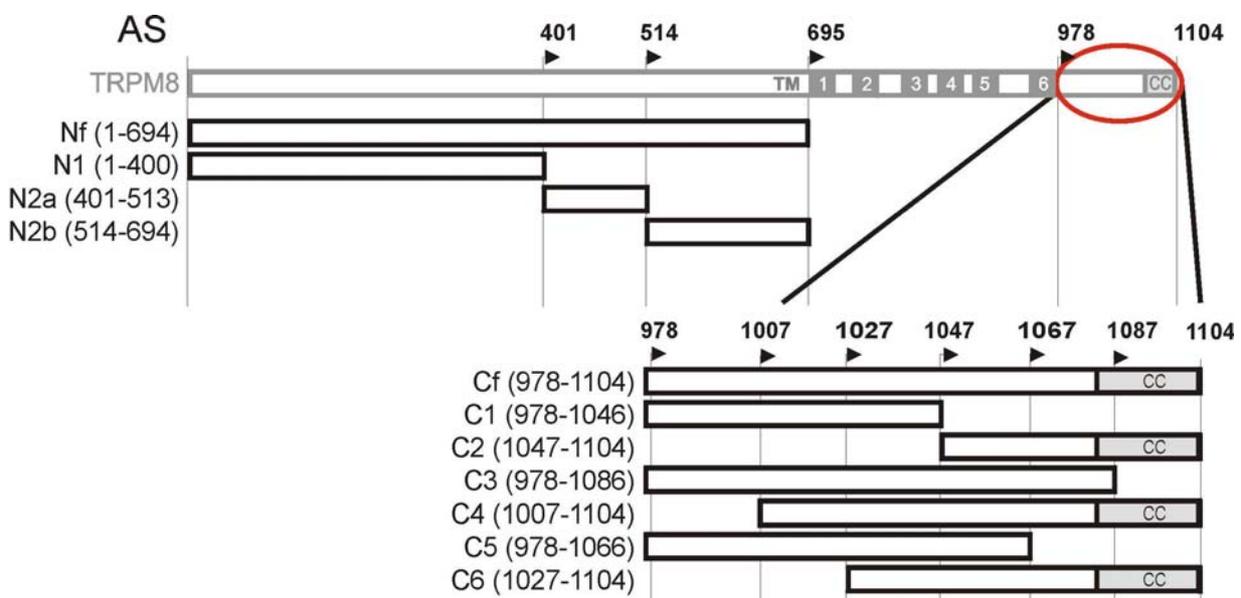


Abbildung 28: Schematische Darstellung der im Bacteriomatch®II getesteten TRPM8-Fragmente. TRPM8 ist nur zur Übersicht gezeigt, es wurde nicht im Bakterien-Zwei-Hybrid-System untersucht. Diejenigen Konstrukte, die in pTRG und/oder pBTL inseriert wurden, sind in der Konstruktliste (Seite 28) aufgeführt. In Nummern angegeben ist die Position der Aminosäurereste (AS). Das hellgraue Feld kennzeichnet die vorhergesagte Coiled-Coil-Region (CC), die dunkelgrauen Felder Transmembrandomänen (TM).

Eine Auflistung aller vorhandenen Konstrukte ist in der Konstruktliste (Seite 28) gegeben. Die beiden Konstrukte N2a/pBTL und N2b/pBTL entstanden aus dem Fragment N2, welches eine interne EcoR I-Erkennungssequenz (Basenpaare 1539-1544) enthielt. Nach der enzymatischen Modifikation mit EcoR I entstanden aus N2 die beiden Fragmente N2a, das an beiden Enden Schnittstellen für EcoR I enthielt, und N2b, welches an den Enden mit Schnittstellen für EcoR I und BamH I versehen war.

TRPM8-INTERAKTIONSSUDIEN IM BACTERIOMATCH®II-SYSTEM

Die Kotransformations-Experimente im Bacteriomatch®II-System wurden wie im Kapitel Methoden beschrieben durchgeführt. Für alle getesteten Konstrukte wurde durch eine Negativkontrolle ausgeschlossen, dass sie alleine eine Transkriptionsaktivierung der Reportergene auslösten. Anschließend wurden die TRPM8-Fragmente auf Interaktionen getestet. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse aller Interaktionsexperimente gezeigt.

pBTL	Name	AS	pTRG	Name	AS	Interaktion
hTRPM8 NT	Nf	1-694	hTRPM8 NT	Nf	1-694	-
				N1	1-400	-
			hTRPM8 CT	Cf	978-1104	-
	N2a	401-513	hTRPM8 NT	Nf	1-694	-
				N1	1-400	-
				N2a	401-513	+
				N2b	514-694	-
			hTRPM8 CT	Cf	978-1104	++
	N2b	514-694	hTRPM8 NT	Nf	1-694	-
				N1	1-400	+
				N2b	514-694	+++
			hTRPM8 CT	Cf	978-1104	++
hTRPM8 CT	Cf	978-1104	hTRPM8 CT	Cf	978-1104	+++
				C1	978-1046	-
				C3	978-1086	-
		C2	1047-1104	Cf	978-1104	+
		C4	1007-1104	Cf	978-1104	+++
				C3	978-1086	-
				C5	978-1066	-
		C6	1027-1104	Cf	978-1104	++
				C3	978-1086	-
				C5	978-1066	-
	Ct ¹⁰⁸⁹ L/P	978-1104	Cf	978-1104	-	
	pBTL		alleTRPM8 pTRG Konstrukte		-	
	alle TRPM8 pBTL Konstrukte		pTRG		-	
	pBT-LGF		pTRG-Gal11P		+++	

Tabelle 5: Eingrenzung von Interaktionsstellen innerhalb des TRPM8-Proteins mit dem Bacteriomatch®II-System. pBTL und pTRG sind Köder- und Ziel-Plasmide, welche die aufgeführten aminoterminalen (NT) oder carboxyterminalen (CT) TRPM8-Fragmente enthalten. Die Interaktionsstärke, detektiert als Kolonienzahl pro Platte, wurde wie folgt definiert: < 100 Kolonien: -; > 100 Kolonien: +; > 300 Kolonien: ++; > 1000 Kolonien: +++. pBT-LGF2 und pTRG-Gal 11 dienen als Positivkontrolle. hTRPM8 steht für TRPM8 von Mensch.

Der TRPM8-Aminoterminus Nf zeigte keine Wechselwirkung; erst bei Untersuchung kürzerer aminoterminaler Abschnitte konnten Interaktionen detektiert werden; u. a. von den beiden Abschnitten, die jeweils die Aminosäurereste 514-694 umfassen (N2b in Tabelle 5). Diese Fragmente N2b interagierten stark

miteinander, zudem auch mit N1, das die Positionen 1-400 umfasst. Es konnten auch Interaktionen des Aminoterminus mit dem Carboxyterminus detektiert werden; beispielweise von N2a bzw. N2b mit dem Cf, welches die Aminosäuren 978-1104 umfasst. Da insbesondere die carboxyterminalen TRPM8-Abschnitte stark untereinander wechselwirkten, sollte die dafür verantwortliche Interaktionsdomäne näher eingegrenzt werden. Hierzu wurde das 127 Aminosäurereste lange Fragment Cf weiter verkürzt: Fragment C4, welches die Aminosäurereste 1007-1104 beinhaltet, interagiert noch stark mit Cf, ebenso Fragment 6, welches die letzten 78 Aminosäurereste des Carboxyterminus enthält. Für Konstrukt C2, bestehend aus den letzten 58 Positionen von TRPM8, konnte dagegen nur noch eine schwache Interaktion mit Cf detektiert werden (siehe Tabelle 5). Daraus lässt sich schließen, dass C6 eine wichtige Domäne für die im Bacteriomatch®II gemessene Interaktion mit Cf enthält.

Um zu testen, ob die carboxyterminale Coiled-Coil-Region (siehe Abbildung 27) die entscheidende Interaktionsregion ist, wurde in den Carboxyterminus die Punktmutation ¹⁰⁸⁹L/P eingefügt, bei welcher die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Coiled-Coil-Domäne durch die Einführung der Mutation stark reduziert ist. Der mutierte carboxyterminale Proteinabschnitt konnte nicht mehr mit dem nicht mutierten Carboxyterminus Cf interagieren (siehe Tabelle 5).

8.4.2 TRPM8 KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Die mittels Bakterien-Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionsdomänen sollten als nächstes aus dem gesamten TRPM8-Protein entfernt oder mutiert werden. Hierzu wurden Deletions- und Mutationskonstrukte hergestellt und mittels Ko-Immunpräzipitation auf Interaktion mit dem unveränderten TRPM8-Protein überprüft; es wurden sowohl ein Konstrukt, bei dem der TRPM8-Carboxyterminus deletiert war, als auch ein TRPM8-Protein, in welches die oben beschriebene Punktmutation ¹⁰⁸⁹L/P eingeführt worden war, auf Interaktion mit dem unveränderten TRPM8-Protein getestet. Weiter wurde untersucht, ob der isolierte TRPM8-Aminoterminus an das intakte TRPM8-Protein bindet.

KLONIERUNG VON TRPM8-FUSIONSPROTEINEN ZUR UNTERSUCHUNG IN DER KO-IMMUNPRÄZIPITATION

Mithilfe der PCR-Methode wurden TRPM8-cDNS-Fragmente hergestellt, an die verschiedene Restriktionschnittstellen gefügt wurden. Zur Inserierung in das Plasmid pEYFP-C1, welches die cDNS des Gelbfluoreszierenden Proteins enthält, wurden die TRPM8-cDNS-Fragmente mit einer Xho I- und einer EcoR V-Schnittstelle versehen. Zusätzlich wurde carboxyterminal ein Stop-Kodon eingefügt. Anschließend wurden die Fragmente in ein mit Xho I und Sma I geschnittenes pEYFP-C1-Plasmid ligiert, so dass die cDNS für EYFP-TRPM8-Fusionsproteine entstand (siehe Abbildung 29).

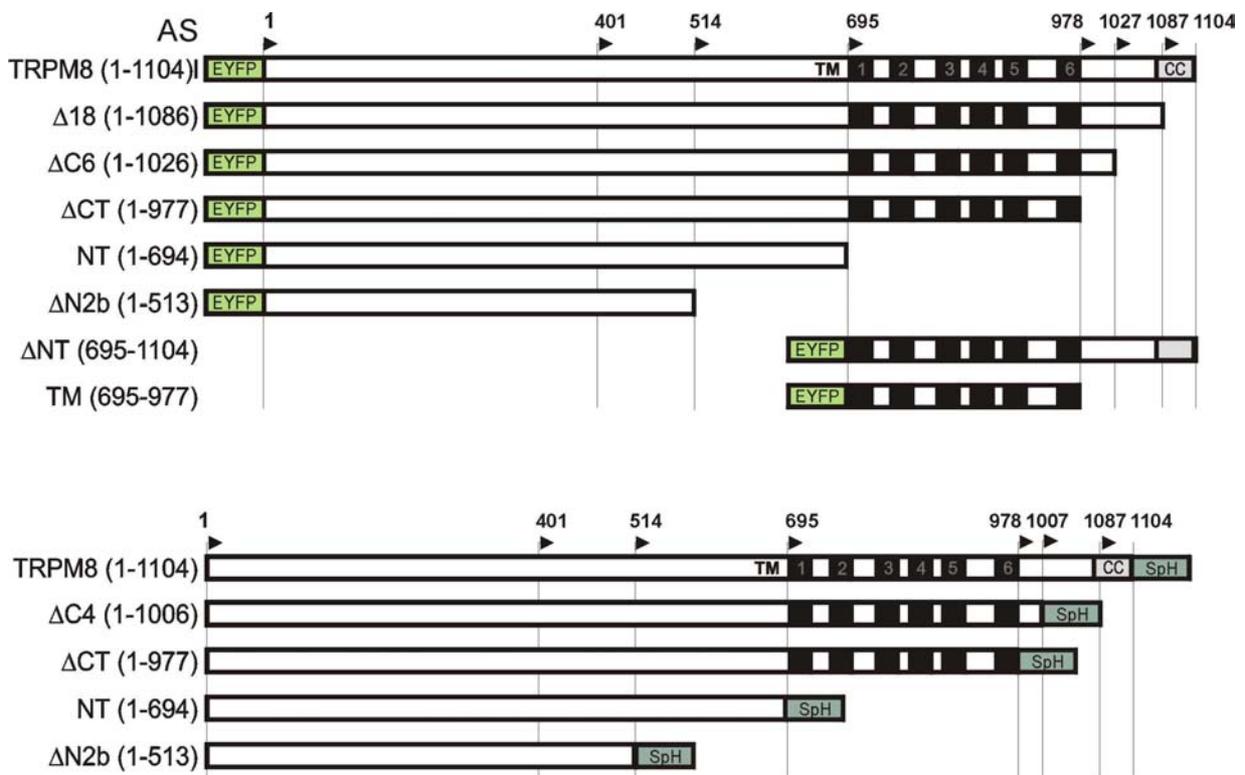


Abbildung 29: Übersicht über die EYFP-TRPM8 und TRPM8-S-pHluorin-Fusionskonstrukte zu Ko-Immunpräzipitation. Die mit CC beschrifteten grauen Felder kennzeichnen die Coiled-Coil-Domäne, die schwarzen Felder putative Transmembrandomänen. Das mit SpH beschriftete Feld steht für die carboxyterminale Fusion des Proteins mit S-pHluorin, EYFP wurde an den Aminoterminus der Konstrukte fusioniert. Die Position der Aminosäurereste (AS) ist in Nummern angegeben. Δ bedeutet Deletion, CT bedeutet Carboxyterminus, NT steht für Aminoterminus.

Die Fragmente zur Inserierung in S-pHluorin/pCAGGS wurden ebenfalls mittels PCR hergestellt. Hierbei wurden jeweils zwei EcoR V-Schnittstellen, eine Kozak-Sequenz und ein Start-ATG angefügt. Anschließend wurden die Fragmente in ein mit EcoR V geschnittenes S-pHluorin/pCAGGS-Plasmid ligiert, so dass die oben gezeigten carboxyterminalen TRPM8-S-pHluorin-Fusionsproteine entstanden (Abbildung 29). S-pHluorin ist eine pH-sensitive Variante des Grün-fluoreszierenden Proteins (Sankaranarayanan et al., 2000). Der Austausch ¹⁰⁸⁹L/P wurde durch gezielte Mutagenese hergestellt. Der Austausch von Leucin gegen Prolin in der terminalen Coiled-Coil-Region führt dem Algorithmus COILS zufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Zerstörung der Coiled-Coil-Struktur.

Die EYFP-Fusionskonstrukte sollten sich zur Untersuchung von TRPM8-TRPM8-Interaktionen eignen, weil das EYFP nicht direkt an die zur Interaktion wichtige carboxyterminale Coiled-Coil-Domäne grenzt. Sie erwiesen sich aber als zur Ko-Immunpräzipitation ungeeignet, weil sie durch den anti-GFP Antikörper im Western Blot nur sehr schlecht erkannt wurden. Es ist unklar, welche Gründe diese mangelhafte Erkennung hat.

KO-IMMUNPRÄZIPITATION DER VERKÜRZTEN BZW. MUTIERTEN KONSTRUKTE MIT TRPM8

Für die Ko-Immunpräzipitations-Experimente wurde die stabile HEK293-TRPM8-Zelllinie (siehe Seite 59) transient mit den TRPM8-S-pHluorin-Fusionskonstrukten transfiziert. Die Experimente wurden wie im Kapitel Methoden beschrieben durchgeführt. Zur Präzipitation wurde ein anti-GFP-Antikörper eingesetzt, die Detektion erfolgte mit dem anti-TRPM8-Antikörper 797, dessen Epitop innerhalb der letzten 24 Aminosäurereste von TRPM8 von Mensch liegt. Weder der anti-GFP Antikörper noch Antikörper 797 erkennen unspezifisch Proteine aus HEK293-Zellen (Daten nicht gezeigt).

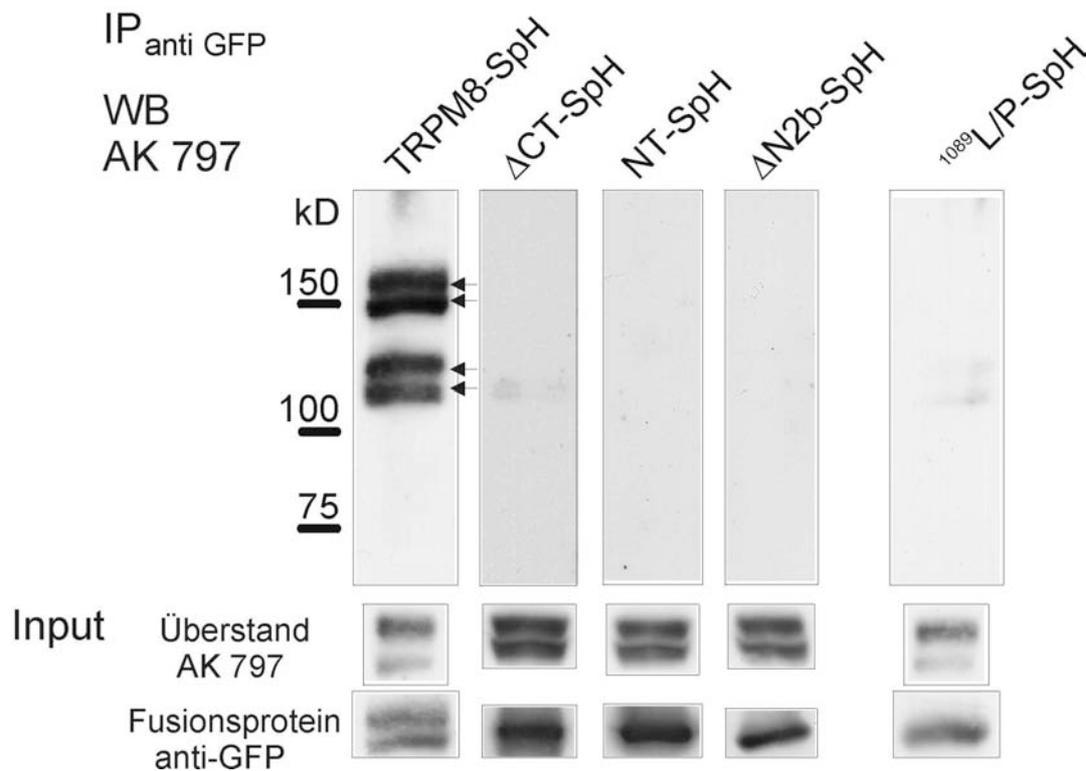


Abbildung 30: TRPM8-TRPM8-Interaktion und Eingrenzung der Interaktionsregion. Die stabile HEK293-TRPM8-Zelllinie wurde mit TRPM8-SpH-Fusionskonstrukten transfiziert. Zum Präzipitieren wurden 6 μ g des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers eingesetzt, zur Detektion der polyklonalen Antikörper 797 (1:200). TRPM8-SpH ko-präzipitiert mit TRPM8, wobei der Antikörper 797 sowohl TRPM8-SpH, dessen Molekulargewicht etwa 154 kDa beträgt, erkennt (oberer Doppelpfeil), als auch das TRPM8-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 128 kDa (unterer Doppelpfeil). Bei den Doppelbanden handelt es sich um die stark glykosylierte und weniger stark oder nicht glykosylierte Form von TRPM8 (siehe Abbildung 32). ¹⁰⁸⁹L/P-SpH wird von Antikörper 797 nicht erkannt. Die Überstände zeigen das im Zelllysate vorhandene TRPM8-Protein aus der stabilen HEK293-TRPM8-Zelllinie; es wird mit Antikörper 797 detektiert. Bei einer erneuten Inkubation des Blots mit anti-GFP-Serum werden die TRPM8-SpH-Fusionsproteine erkannt. IP steht für Immunpräzipitation, WB für Western Blot.

Als erstes wurde das TRPM8-SpH-Fusionsprotein auf Interaktion mit TRPM8 untersucht; hierbei konnte TRPM8-SpH mit TRPM8 ko-immunpräzipitiert werden (Abbildung 30, erste Spur, Doppelpfeile). Wie aus Abbildung 30 ersichtlich ist, erkennt der Antikörper 797 zwei TRPM8-Banden, welche später als glykosylierte und nicht- oder wenig glykosylierte Form von TRPM8 identifiziert wurden (siehe Abbildung

32). Das verkürzte Konstrukt Δ CT-SpH, dem der Carboxyterminus einschließlich der vorhergesagten Coiled-Coil-Region fehlt, interagiert dagegen nicht mehr mit dem TRPM8-Protein (Abbildung 30, zweite Spur). Da weder für NT-SpH, welches den Aminoterminus umfasst, noch für das aminoterminalen Fragment Δ N2b-SpH, das die Positionen 1-513 beinhaltet, eine Retention mit TRPM8 nach Immunpräzipitation detektiert werden konnte, kann angenommen werden, dass der TRPM8-Aminoterminus nicht in der Lage ist mit dem vollständigen TRPM8-Protein zu interagieren (Abbildung 30, dritte und vierte Spur). Die im Bakterien-Zwei-Hybrid-System gefundenen aminoterminalen Interaktionsstellen (siehe Tabelle 5) scheinen also in der Ko-Immunpräzipitation keine Rolle zu spielen.

Anschließend wurde die TRPM8-Mutante 1089 L/P auf Ko-Immunpräzipitation mit TRPM8 untersucht. Die Mutation 1089 L/P führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Zerstörung der Coiled-Coil-Struktur; im Bacteriomatch[®]II-System wurde bereits gezeigt, dass die entsprechende Mutante nicht mehr mit dem Carboxyterminus interagieren konnte. Auch in der Ko-Immunpräzipitation war die Fähigkeit zur Interaktion mit TRPM8 nicht mehr vorhanden (Abbildung 30, fünfte Spur).

8.4.3 DICHTEGradientenzentrifugation von EYFP-TRPM8 und der EYFP- 1089 L/P-Mutante

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass mindestens zwei TRPM8-Proteine über die vorhergesagte Coiled-Coil-Domäne interagieren. Um zu untersuchen, ob TRPM8 als Multimer vorliegt, und ob die carboxyterminale Coiled-Coil-Domäne Einfluss auf eine Multimerisierung von TRPM8 hat, wurden mit exprimiertem TRPM8 und der TRPM8-Mutante 1089 L/P Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Das Experiment wurde mit den Konstrukten EYFP-TRPM8 und EYFP- 1089 L/P wie im Kapitel Methoden beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden mikrosomale Proteine aus zwanzig Kulturschalen mit EYFP-TRPM8 bzw. EYFP-TRPM8- 1089 L/P-exprimierenden tsA201-Zellen präpariert. Zur Solubilisierung von EYFP-TRPM8 wurden 1,7 mg der mikrosomalen Proteinfraction eingesetzt, zur Solubilisierung von EYFP- 1089 L/P 1,9 mg.

Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, konnte eine Anreicherung von EYFP-TRPM8 in den Fraktionen, die der Größe von Trimeren und Tetrameren entsprechen, detektiert werden. Nur sehr wenig Protein findet sich dagegen in den Fraktionen, in denen das Monomer oder Dimere zu erwarten sind. Bei der EYFP- 1089 L/P-Mutante dagegen liegt eine klare Verschiebung der Signale zu denjenigen Fraktionen vor, die dem Monomer entsprechen; es konnten keine multimeren Komplexe mehr ausgebildet werden (Abbildung 31).

Im Gegensatz zu 1089 L/P-SpH, welches von Antikörper 797 nicht erkannt wird (siehe Abbildung 30), lässt sich EYFP- 1089 L/P mit diesem Antikörper gut detektieren, was darauf hindeuten könnte, dass bei 1089 L/P-SpH das 797-Epitop durch S-pHluorin maskiert ist.

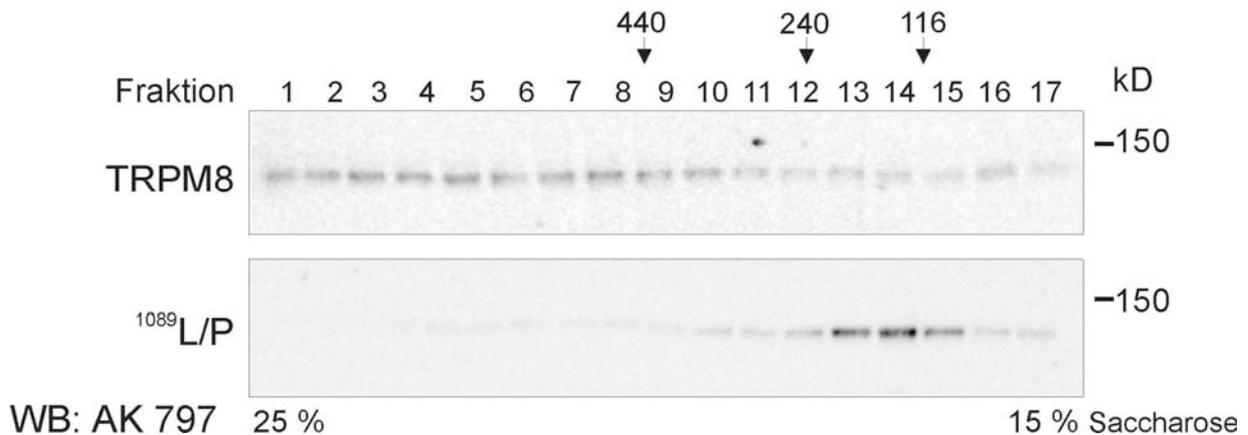


Abbildung 31: Mit mikrosomalen Proteinfractionen aus EYFP-TRPM8 bzw. EYFP-¹⁰⁸⁹L/P exprimierenden tsA201-Zellen wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Das TRPM8-Protein wird in Fraktionen, die der Größe von Trimeren bzw. Tetrameren entsprechen, detektiert. Die TRPM8-Coiled-Coil-Mutante ¹⁰⁸⁹L/P befindet sich dagegen auf Höhe des Monomers. Fraktionen, welche die jeweils höchste Konzentration des jeweiligen Markerproteins enthalten, (Ferritin 440 kDa, Catalase 240 kDa, β -Galaktosidase 116 kDa) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Detektion erfolgte mit AK 797 (1:200), dieser erkennt EYFP-TRPM8-¹⁰⁸⁹L/P, nicht aber TRPM8-¹⁰⁸⁹L/P-SpH. Theoretisches Molekulargewicht für EYFP-TRPM8: Monomer 154,4 kD; Dimer 309 kD; Trimer 463,5 kD; Tetramer 618 kD.

8.4.4 TRPM8 IST EIN GLYKOPROTEIN

Wie oben (Abbildung 30) gezeigt, detektiert der Antikörper 797 sowohl für TRPM8 als auch für TRPM8-SpH eine Doppelbande. Hierbei entsprach lediglich die jeweils untere Bande dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht der Proteine. Da TRPM8 die beiden potentiellen Glykosylierungsstellen ⁸²¹N und ⁹³⁴N enthält, ist es möglich, dass glykosylierte TRPM8-Varianten existieren und diese Varianten für die langsamer laufenden Proteine verantwortlich sind. Um festzustellen, ob es sich bei der oberen Bande um eine glykosylierte Form von TRPM8 handelt, wurde TRPM8 deshalb mit der Amidase N-Glykosidase F oder NgaseF bzw. mit der Endoglykosidase H oder Endo H inkubiert. Hierzu wurden zuerst mikrosomale Proteine aus der stabilen HEK293-TRPM8-Zelllinie, präpariert (Seite 67). Jeweils 50 μ g TRPM8-Mikrosomen wurden mit NgaseF bzw. EndoH inkubiert, wie im Kapitel Methoden beschrieben (Seite 67). Danach wurden die Proteingemische im SDS-Gel aufgetrennt und das TRPM8-Protein im Western Blot mit Antikörper 797 detektiert.

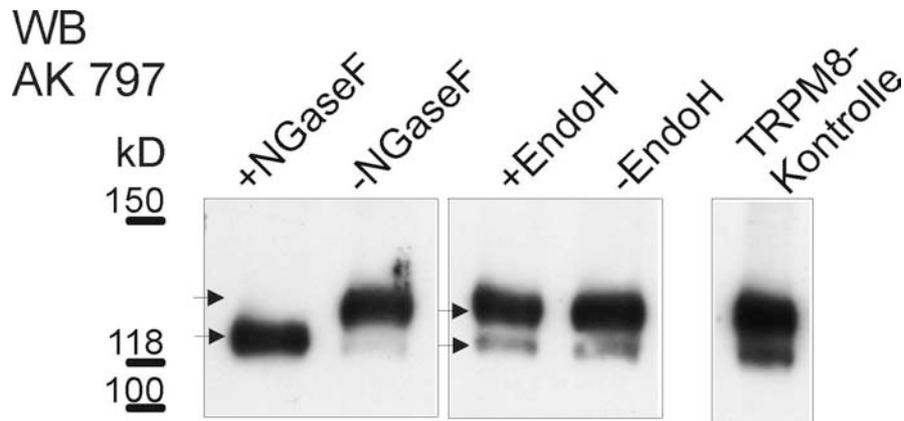


Abbildung 32: Deglykosylierung von TRPM8. Jeweils 50 μg mikrosomale Proteine aus der HEK293-TRPM8-Zelllinie wurden für 2 h bei 37 °C mit (+NGaseF) oder ohne (-NGaseF) N-Glykosidase F bzw. mit (+EndoH) oder ohne (-EndoH) Endoglykosidase H inkubiert. Danach erfolgte die Auftrennung des Proteingemischs im SDS-Gel und die Detektion von TRPM8 im Western Blot mit Antikörper 797 (1:200). Mit NGaseF verschwindet die obere TRPM8-Bande, während das Signal der unteren TRPM8-Bande stärker wird (linker Doppelpfeil). Nach Inkubation mit EndoH fand keine Veränderung statt (rechter Doppelpfeil). Als weitere Kontrolle wurden 12,5 μg der unbehandelten Mikrosomen (TRPM8-Kontrolle) auf das SDS-Gel aufgetragen.

In den mit -NGaseF und -EndoH bezeichneten Kontrollen erschien ebenso wie in der TRPM8-Kontrolle (Abbildung 32) zwei Varianten von TRPM8, wobei die Form mit dem größeren Molekulargewicht dominierte. Nach Inkubation mit NGaseF war nur noch die Form mit dem kleinerem Molekulargewicht vorhanden, welche demnach die deglykosylierte Form von TRPM8 darstellt. Nach Behandlung mit Endoglykosidase H konnte dagegen keine Veränderung detektiert werden (Abbildung 32). Glykosyliertes TRPM8 kann also nicht durch Endoglykosidase H, welche nur Zuckerketten vom High-Mannose-Typ und vom Hybrid-Typ spaltet, deglykosyliert werden. Die N-Glykosidase F dagegen, welche alle N-glykosidischen Bindungen spaltet, kann TRPM8 deglykosylieren.

9 DISKUSSION

Die verschiedenen Mitglieder der Familie der TRP-Ionenkanäle differieren stark in ihren funktionellen Eigenschaften, sind aber aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit miteinander verwandt. Die einzelnen TRP-Kanaluntereinheiten enthalten als gemeinsame Strukturelemente sechs hydrophobe Bereiche, welche in Hydrophobizitäts-Plots nach Kyte und Doolittle (1982) zu erkennen sind und als putative Transmembrandomänen S1 bis S6 bezeichnet werden; zwischen S5 und S6 wird eine Porenregion vorhergesagt und der Amino- bzw. der Carboxyterminus sind intrazellulär lokalisiert. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) weisen eine ähnliche Topologie wie die TRP-Kanäle auf. So wurde für die spannungsabhängigen Shaker-Kanäle die konservierte, aminoternale Domäne T1 identifiziert, welche Homotetramere ausbildet (Shen et al., 1993; Kreusch et al., 1998). Basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit der K_V -Kanäle mit den TRP-Kanalproteinen geht man davon aus, dass sich mehrere TRP-Proteine zu homo- oder heterotetrameren funktionsfähigen Kanälen zusammenlagern. Ein tetramerer Aufbau wurde bereits für TRPV1 (Kedei et al., 2001) und mittlerweile auch für TRPV5 und TRPV6 gezeigt (Hoenderop et al., 2003). Welche Signale allerdings die Proteinassemblierung zum Kanal vermitteln, war bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Proteine TRPV6 und TRPM8 Interaktionsdomänen identifiziert und untersucht. Für TRPV6 wurden zwei Interaktionsdomänen innerhalb des Aminoterminus, welcher sechs Ankyrin-Repeats als Strukturelemente enthält, identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Region um das dritte der sechs Ankyrin-Repeats eine entscheidende Rolle für den Kanalzusammenbau spielt. Bei TRPM8 konnte eine carboxyterminale Coiled-Coil-Region als Interaktionsstelle identifiziert werden. Die Interaktionsstellen wurden mit Hilfe bakterieller und eukaryotischer Überexpressionssysteme gefunden und in diesen Systemen genauer charakterisiert.

Außerdem wurde die Fähigkeit von TRPV6 zur Interaktion mit verschiedenen Mitgliedern der TRPV-Unterfamilie getestet. Hierbei konnten für TRPV2, TRPV3 und TRPV4 keine Interaktionen mit TRPV6 festgestellt werden, wohingegen TRPV1 und TRPV6 zu interagieren scheinen. Eine Interaktion mit TRPV5, welches eine zu TRPV6 sehr ähnliche Primärstruktur aufweist, wurde nicht untersucht.

9.1 TRPV6 KANN ÜBER AMINOTERMINALE ANKYRIN-REPEATS

HOMOMULTIMERE BILDEN

Bislang wurde die genaue dreidimensionale Struktur des TRPV6-Aminoterminus noch nicht aufgeklärt; da allerdings der TRPV6-Aminoterminus als Strukturelemente zahlreiche Ankyrin-Repeats enthält, deren allgemeine Struktur mittlerweile bekannt ist, können die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter dem Blickwinkel des allgemeinen Ankyrin-Repeat-Modells betrachtet und diskutiert werden.

9.1.1 ANKYRIN-REPEATS

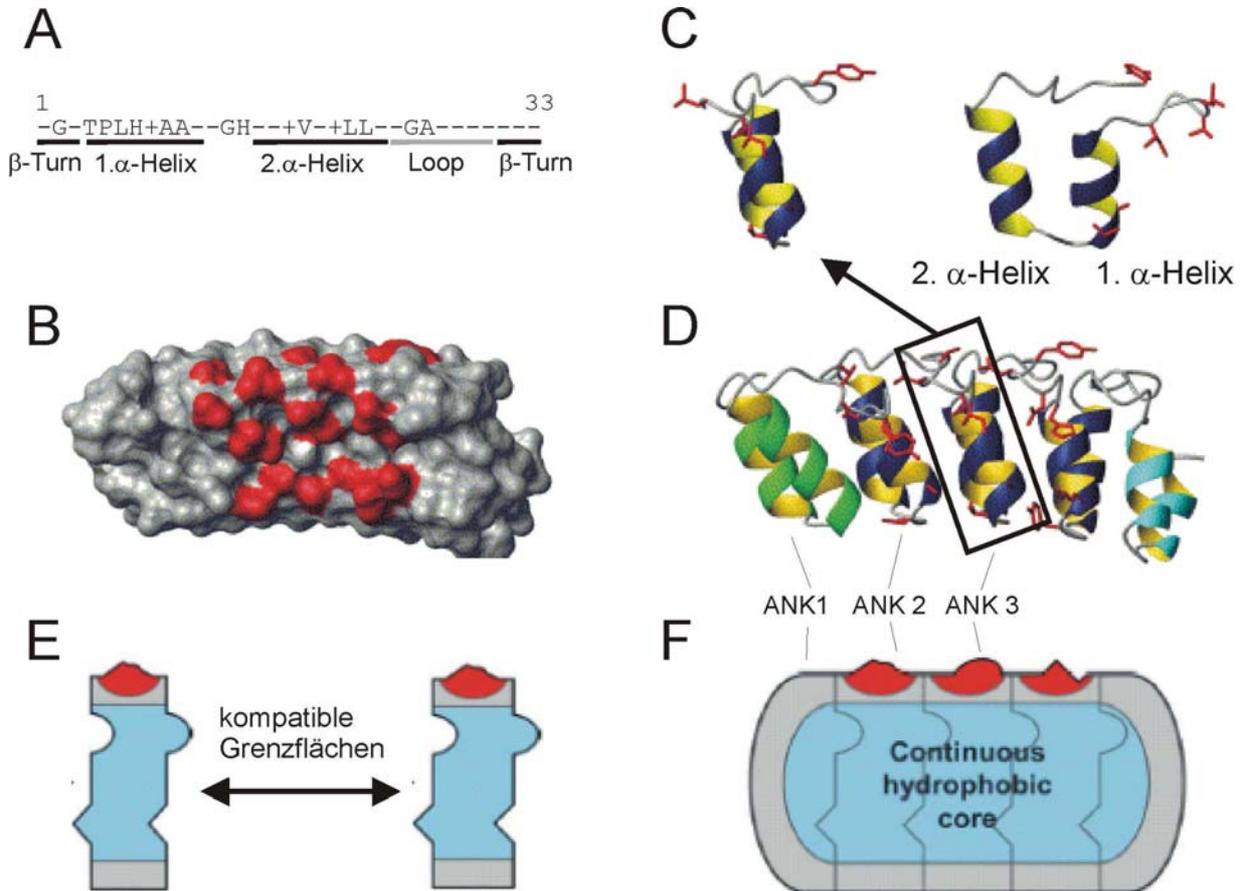


Abbildung 33: *A*, ANK-Repeat-Konsensus-Sequenz nach Michaely et al. 2002; + zeigt einen unpolaren Aminosäurerest an. *B*, Oberflächenmodell eines ANK-Repeat-Proteins; grau, konservierte Oberfläche; rot, variable Oberfläche. *C*, Einzeldarstellung des dritten ANK-Repeats aus *D* als Bändermodell. Links, Vorderansicht, rechts Seitenansicht zur Verdeutlichung des senkrecht zu den α -Helizes orientierten β -Hairpins und des L-förmigen Querschnitts. *D*, Bändermodell eines ANK-Repeat-Proteins. *E*, Schematische Darstellung einzelner Repeat-Module, die miteinander kompatibel sind. *F*, Schematische Darstellung eines Repeat-Proteins, welches sich aus mehreren Modulen zusammensetzt; blau: hydrophober Kern; grau: konservierte Oberflächen; rot: variable Oberflächen (modifiziert nach Forrer et al., 2003).

Ankyrin-Repeats („ANK-Repeats“) wurden ursprünglich als wiederholt vorkommende Motive im LIN-12-Protein von *Caenorhabditis elegans*, in Notch von *Drosophila* und den Hefe-Zellzyklusregulatoren Swi6p und Cdc10p beschrieben (Breedon and Nasmyth, 1987). Der Name Ankyrin-Repeats stammt vom Zytoskelett-Protein Ankyrin, in dem 24 dieser Motive vorkommen (Lux et al., 1990). ANK-Repeats sind weit verbreitet, sie finden sich in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten und vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, entweder im Zellkern, Zytoplasma oder an Zellmembranen (Bork, 1993). Ankyrin selbst kann beispielsweise mit der Na^+K^+ -ATPase (Koob et al., 1988; Jordan et al., 1995), dem $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher (Li et al., 1993) oder dem spannungsabhängigen Natriumkanal (Srinivasan et al., 1988; Bennett and Baines, 2001) interagieren. Obwohl ANK-Repeats in ihrer Primärstruktur stark variieren, bilden sie eine sehr konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur aus (Sedgwick and Smerdon, 1999). Durch die vergleichende

Analyse von etwa 4400 ANK-Sequenzen wurde eine ANK-Konsensus-Sequenz ermittelt, auf deren Grundlage künstliche ANK-Repeats hergestellt und untersucht werden konnten (Mosavi et al., 2002). Ein einzelnes ANK-Repeat besteht aus 33 Aminosäureresten und enthält zwei α -Helizes, die antiparallel orientiert sind. Nach der zweiten Helix folgen ein Loop und ein β -Turn, der in den β -Turn des nächsten ANK-Repeats übergeht (Sedgwick and Smerdon, 1999) (Abbildung 33 A und C). Da die Loop- β -Turn-Struktur senkrecht zu den Helizes orientiert ist, entsteht ein typischer L-förmiger Querschnitt. Stark konservierte Motive innerhalb der ANK-Repeats sind für die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur wichtig. Die erste α -Helix beinhaltet hierbei ein konserviertes TPLH-Motiv, die zweite enthält u.a. zwei konservierte Leucin-Reste, die eine Rolle für die Stabilisierung der L-förmigen Struktur des ANK-Repeats spielen könnten (Yuan et al., 2004). In ANK-Repeat-Proteinen folgen meist mehrere ANK-Repeat-Motive direkt aufeinander, welche schraubenförmig zu einer Superhelix aufwickelt sind. Dabei sind benachbarte ANK-Repeats durch hydrophobe Interaktionen ihrer α -Helizes modulartig aufeinandergepackt und im Inneren des ANK-Repeat-Proteins bildet sich ein hydrophober Kern (Abbildung 33 D, E und F). Für eine korrekte Faltung der ANK-Tertiärstruktur sind vermutlich mindestens zwei ANK-Repeats notwendig (Zhang and Peng, 2000; Mosavi and Peng, 2003); ein ANK-Repeat alleine bleibt ungefaltet (Mosavi et al., 2002; Michaely and Bennett, 1993).

Bisher wurden viele heterotypische Interaktionen von ANK-Repeat-Proteinen untersucht, so z.B. von Ankyrin mit CD44 (Zhu and Bourguignon, 2000) oder GABP β mit GABP α (Batchelor et al., 1998). Aus Strukturen von ANK-Proteinen, die zusammen mit ihren Bindungspartnern ko-kristallisiert wurden, ist ersichtlich, dass die Interaktionsregionen häufig an der konkaven Oberfläche der ANK-Repeats, gebildet aus dem β -Hairpin und der ersten α -Helix, lokalisiert sind (Mosavi et al., 2004). Inwieweit ANK-Repeats eine Rolle für die Multimerisierung von Proteinen spielen, ist bisher wenig untersucht. Für das Chloroplasten-Protein SRP43 wurde gezeigt, dass die dritten und vierten ANK-Repeat-Abschnitte an der Dimerisierung des Proteins beteiligt sind (Jonas-Straube et al., 2001) und für das Protein Notch wurde eine homotypische Interaktion der Notch-ANK-Repeats beschrieben (Matsuno et al., 1997). Auch die Kristallstruktur von Drosophila- und humanen Notch ANK-Repeats wurde untersucht (Zweifel et al., 2003; Ehebauer et al., 2005); hierbei liegen die ANK-Repeat-Proteine überwiegend in ihrer monomeren Form vor, was auf eher schwache Affinitäten untereinander hindeutet.

9.1.2 HOMOTYPISCHE TRPV6-INTERAKTION

IDENTIFIZIERUNG VON TRPV6-MULTIMERISIERUNGSDOMÄNEN

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Multimerisierungsdomänen von TRPV6 zu identifizieren. Hierzu wurde zunächst durch Ko-Immunpräzipitations-Experimente gezeigt, dass das an EGFP fusionierte TRPV6-Protein mit TRPV6 interagieren kann (Abbildung 9). Im nächsten Schritt wurde die mögliche Interaktionsstelle schrittweise eingegrenzt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Ankyrin-Repeats 3+4 als auch die Repeats 1+2 mit TRPV6 ko-immunpräzipitiert werden, ANK 1+2 allerdings etwas schwächer als ANK 3+4 (Abbildung 11 und Abbildung 13). Das TRPV6-Protein befindet sich in der Plasmamembran; um eine Lokalisation der kurzen ANK 3+4- und ANK 1+2-Fragmente in der Plasmamembran zu erreichen, waren sie

mit einem Membranprotein fusioniert worden, welches alleine nicht mit TRPV6 interagiert. Bei diesem Membranprotein handelte es sich um die γ -Untereinheit des Ca_v -Kanals von Maus.

Parallel zu den Ko-Immünpräzipitations-Experimenten wurden Interaktionsstudien im Bakterien-Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Da hier jeweils zwei verkürzte Fragmente auf Interaktion miteinander getestet werden, konnten Interaktionsstellen genauer eingegrenzt werden. Die aminoterminalen Proteinsequenz, welche ANK 3+4 enthält, zeigte in diesem System eine homotypische Interaktion. Als weitere homotypische Interaktionsstelle wurde ANK 5+6 identifiziert (Tabelle 3). Sowohl ANK 3+4 als auch ANK 5+6 konnten im Bacteriomatch[®]-System als homotypische Interaktionsregionen bestätigt werden. Region ANK 3+4 war im Bacteriomatch[®]-System auch zu heterotypischen Interaktionen mit ANK 1+2 und ANK 5+6 fähig (Tabelle 4). Im Bacteriomatch[®]-System wurde auch versucht, die Interaktionsregion auf einen einzelnen ANK-Repeat einzugrenzen, wobei ANK 3 bzw. ANK 5 noch homotypische Interaktionen zeigten. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass ein einzelnes ANK-Repeat sich nicht mehr korrekt falten kann, weshalb nicht klar ist, wie aussagekräftig Versuche mit nur einem einzelnen ANK-Repeat sind (Mosavi et al., 2002). Als Expressionssystem für ANK-Repeat-Proteine scheint *E. coli* gut geeignet zu sein, denn aus *E. coli*-Flüssigkulturen isolierte ANK-Repeat-Proteine waren stabil und zeigten die für Ankyrin-Domänen typische Faltung (Binz et al., 2004).

Es konnten also die zwei homotypischen Interaktionsdomänen ANK 3+4 und ANK 5+6 im TRPV6-Aminoterminus identifiziert werden. Als nächstes sollte festgestellt werden, welche davon für die TRPV6-TRPV6-Interaktion entscheidend ist.

ANK 3 IST ENTSCHEIDEND FÜR DEN ZUSAMMENBAU DES TRPV6-KANALS

Zunächst ging ich der Frage nach, ob ANK 3+4 vorrangig wichtig für die homotypische TRPV6-Interaktion ist. Hierzu wurde zunächst die Region ANK 3+4 aus dem Volllängen-TRPV6 entfernt und in einem weiteren Konstrukt die Region ANK 3. Anschließend untersuchte ich, inwieweit beide Proteinabschnitte mit dem vollständigen TRPV6-Protein ko-immunpräzipitiert werden. Für beide Deletionen konnte keine Interaktion detektiert werden. Auch das Auffüllen von ANK 3 mit ANK 2 oder ANK 4 konnte die Interaktion nicht wieder herstellen (Abbildung 16). Die Zerstörung der Interaktion kann zwei Ursachen haben: entweder ist die spezifische Aminosäuresequenz von ANK 3 für die Interaktion essentiell oder die Tertiärstruktur des Aminoterminus wurde so verändert, dass eine andere, bisher unentdeckte Interaktionsstelle zerstört wurde. Gegen eine Veränderung der Tertiärstruktur spricht, dass in Sequenzanalysen mit dem Algorithmus Psipred (McGuffin et al., 2000) weder die Deletion von ANK 3 oder ANK 3+4, noch die mit ANK 2 oder ANK 4 aufgefüllten ANK 3-Deletionen eine Veränderung der Sekundärstruktur zur Folge hatten. Die Region um ANK 3 scheint im Vergleich zu den anderen Interaktionsregionen also eine übergeordnete Rolle für den Zusammenbau des TRPV6-Kanals zu spielen.

Um die Struktur von TRPV6 möglichst wenig zu verändern, wurden als nächstes kurze Einschübe oder Punktmutationen in der Region ANK 3 untersucht (Abbildung 19). Wurden z.B. ¹³⁶LLARR¹⁴⁰ in der zweiten α -Helix von ANK 3 zu ¹³⁶TRELY¹⁴⁰ mutiert (Konstrukt M5) fand keine Ko-immunpräzipitation mit dem TRPV6-Protein mehr statt und es war auch kein TRPV6-getragener Strom mehr messbar. Dies wurde auch

nach Punktmutation von $^{136}\text{LL}^{137}$ zu „TR“ beobachtet, was insgesamt dafür spricht, dass ANK 3 für die homotypische Interaktion wichtig ist. Da es sich aber bei $^{136}\text{LL}^{137}$ um stark konservierte Aminosäurereste handelt, deren hydrophobe Reste nach dem Modell von Yuan möglicherweise wichtig zur Stabilisierung der L-förmigen Tertiärstruktur der ANK-Repeats sind (Yuan et al., 2004), ist trotz der nur geringfügigen Veränderung eine Zerstörung der ANK-Struktur bei bei M5 und $^{136}\text{LL}^{137}/\text{TR}$ theoretisch nicht auszuschließen. Der Austausch der nachfolgenden, unkonservierten, in der Helixstruktur nach außen weisenden Aminosäurereste $^{138}\text{AR}^{139}/\text{EA}$ verhinderte dagegen nicht die Ausbildung funktionsfähiger TRPV6-Kanäle, diese Aminosäurereste scheinen also für die homotypische Interaktion keine Rolle zu spielen.

Wurden allerdings direkt nach $^{136}\text{LLARR}^{140}$ die Aminosäurereste „TRELY“ zusätzlich eingeschoben (Konstrukt +5), so war die Ko-immunpräzipitation noch stark abgeschwächt und es konnte kein TRPV6-Strom gemessen werden. Eine Zerstörung der ANK-Tertiärstruktur ist hier eher unwahrscheinlich, denn trotz hoher Konservierung der ANK-Struktur sind Einschübe von Aminosäureresten auch in natürlichen ANK-Repeats zu finden, oft in der Verbindungsschleife zum β -Hairpin des nächsten ANK-Repeats, wo auch „TRELY“ eingefügt wurde (Mosavi et al., 2004). Für die Störung der Interaktion durch den Einschub von „TRELY“ gibt es mehrere mögliche Erklärungen: es ist denkbar, dass spezifische Aminosäurereste von ANK 3 maskiert waren, die für die Interaktion essentiell sind. Es ist aber auch möglich, dass spezielle Aminosäurereste im Bereich zwischen ANK 3 und ANK 4 eine wichtige Interaktionsregion bilden, die durch den „TRELY“-Einschub verändert wurde. Letztlich könnte es auch sein, dass die fünf zusätzlichen Aminosäurereste die richtige Ausrichtung weiterer unbekannter Interaktionsstellen so verändern, dass die Interaktion gestört ist.

Weitere Argumente für die übergeordnete Rolle von ANK 3 liefert die Beobachtung dominant-negativer Effekte in Strommessungen (Abbildung 22): bei Koexpression mit TRPV6 konnte die für Kalziumionen impermeable TRPV6-Porenmutante $^{542}\text{D/A}$ auf den TRPV6-Strom dominant-negativ wirken, d.h. der TRPV6-Strom wurde unterdrückt, weil durch Interaktion der $^{542}\text{D/A}$ -Porenmutante mit dem TRPV6-Protein Mischkanäle gebildet wurden, die nicht mehr für Kalzium permeabel waren. Wurde ANK 3+4 aus der Porenmutante entfernt, ging bei Koexpression mit TRPV6 deren dominant-negativer Effekt verloren, die Porenmutante schien nicht mehr mit TRPV6 zu interagieren. Für die Deletion von ANK 3+4 ergab sich, wie bereits oben erwähnt, in Sequenzanalysen mit dem Algorithmus Psipred keine Veränderung der Sekundärstruktur. Auch das verkürzte aminoterminaler TRPV6-Fragment ANK 3-6-EGFP konnte bei Koexpression mit TRPV6 einen dominant-negativen Effekt auf den TRPV6-Strom ausüben (Abbildung 22). ANK 3-6-EGFP scheint also fähig, mit TRPV6 zu interagieren und so die Bildung funktionsfähiger Kanäle zu stören. Bei der Untersuchung von Design-ANK-Repeat-Proteinen wurde festgestellt, dass sich Proteine mit drei oder vier ANK-Repeats vollständig falteten (Mosavi et al., 2002); für ANK 3-6 kann also eine korrekte Ankyrin-Repeat-Tertiärstruktur angenommen werden. Ähnliche Beobachtungen dominant-negativer Effekte verkürzter aminoterminaler TRPV6-Konstrukte wurden auch in einer Studie mit TRPV6 von Ratte beobachtet. Die TRPV6-Fragmente N_{1-334} , N_{1-198} und N_{1-154} von Ratte konnten einen dominant-negativen Effekt auf den rTRPV6-Strom ausüben, wobei das kürzeste noch interagierende Konstrukt mit einer Länge von 154 Aminosäureresten die ersten drei ANK-Repeats umfasste (Kahr et al., 2004). Auch enthalten die

Fragmente N₁₋₁₅₄ und ANK 3-6 (Aminosäurereste 116-328) als gemeinsame Schnittmenge die Region ANK 3, was wiederum auf die wichtige Rolle von ANK 3 als Interaktionsdomäne hindeutet.

Um zu untersuchen, ob TRPV6 ein tetramerer Kanal ist und ob die Region ANK 3 Einfluss auf die Multimerisierung von TRPV6 hat, wurden mit TRPV6 und der TRPV6-Mutante M5 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt (Abbildung 21). Hierbei konnte TRPV6 in Fraktionen detektiert werden, in denen Proteine mit der Größe des TRPV6-Trimers und -Tetramers zu erwarten sind. TRPV6 scheint also tatsächlich als multimerer Kanal vorzuliegen. Auch Hoenderop et al. konnten durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation TRPV5- und TRPV6-Komplexe mit dem Molekulargewicht von Trimeren und Tetrameren nachweisen (Hoenderop et al., 2003). Die TRPV6-Mutante M5 wurde dagegen in den dem Monomer entsprechenden Fraktionen detektiert, was ein Hinweis darauf ist, dass wegen der fehlenden Interaktion keine multimeren Komplexe mehr ausgebildet werden können (Abbildung 21). Im Gegensatz zur T1-Tetramerisierungsdomäne der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, nach deren Deletion aus „Shaker“-Kanälen, Kv1.3 und Kv1.4 trotzdem Kanäle gebildet wurden, scheint ANK 3 zur Multimerisierung absolut notwendig zu sein (Kobertz and Miller, 1999) (Tu et al., 1996).

ANK 5 IST WICHTIG FÜR DIE AUSBILDUNG FUNKTIONELLER TRPV6-KANÄLE

Weiter wurde untersucht, welche Rolle ANK 5+6 für die homotypische TRPV6-Interaktion spielt: Fügt man die fünf Aminosäurereste „ELYTR“ zwischen ANK 4 und ANK 5 ein (Konstrukt +5p2), konnte dieses Proteinfragment mit TRPV6 ko-immunpräzipitiert werden (Abbildung 19). Allerdings konnte bei heterologer Expression von „+5p2“ trotz nachgewiesener Lokalisation in der Plasmamembran (Abbildung 20) kein TRPV6-Strom mehr gemessen werden. Im Bacteriomatch[®]II-System zerstörte der Einschub von „ELYTR“ nach Aminosäurerest 191 die zuvor beobachtete starke homotypische Interaktion in der Region ANK 5 (Tabelle 4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Region um ANK 5 an der Bildung eines stabilen, funktionellen TRPV6-Kanals beteiligt ist.

Für die homotypische Interaktion des TRPV6-Aminoterminus dagegen scheint ANK 5 alleine nicht ausreichend zu sein, da bei TRPV6-Konstrukten mit Mutationen oder Deletionen in der Region ANK 3, bei welchen ANK 5 intakt ist (z.B. M5 oder Deletion von ANK 3), keine Interaktionen mehr mit dem intakten TRPV6-Protein detektiert wurden (Abbildung 16). Auch dass bei TRPV6 von Ratte das aminoternale Fragment N₁₋₁₅₄ (ANK 1-3) einen dominant-negativen Effekt auf den TRPV6-Strom ausüben kann, zeigt, dass eine Interaktion ohne ANK 5 möglich ist (Kahr et al., 2004).

INTERAKTIONEN IN DER REGION ANK 1+2 UND CARBOXYTERMINUS

Auch die aminoternale TRPV6-Region, die den Bereich von Ankyrin-Repeat 1 und 2 umfasst, wurde auf Interaktion mit TRPV6 getestet. In Ko-Immünpräzipitations-Experimenten konnte das verkürzte TRPV6-Konstrukt ANK 1+2, fusioniert mit der γ -Untereinheit des Ca_v-Kanals, mit TRPV6 interagieren (Abbildung 13). Da das verkürzte Konstrukt ANK 3-6 aber noch mit TRPV6 ko-immunpräzipitierte (Abbildung 11) und auch einen dominant-negativen Effekt auf TRPV6 ausübte (Abbildung 22), kann ANK 1+2 keine übergeordnete Rolle für die aminoternale Interaktion spielen. Allerdings konnte B. Niemeyer nach Entfernung der beiden Ankyrin-Repeats aus dem TRPV6-Protein mit diesen Deletionsmutanten keinen

Strom mehr messen (B. Niemeyer, bisher nicht veröffentlichte Daten). Dies bedeutet, dass die Ankyrin-Repeats 1 und 2 wichtig für die Bildung funktioneller TRPV6-Kanäle sind. Für das mit TRPV6 eng verwandte Kanalprotein TRPV5 wurde in einer Studie von Chang ebenfalls eine homotypische aminoterminaler Interaktion detektiert, allerdings wird als entscheidende Interaktionsregion ANK 1 angegeben. Mit einem verkürzten Konstrukt, das die Aminosäurereste 1-77 umfasste, wurde noch ein Interaktionssignal detektiert, mit einem Fragment, welches die Aminosäurereste 1-63 enthielt, allerdings nicht mehr (Chang et al., 2004). Da beide Konstrukte nur den ersten ANK-Repeat von TRPV5 enthalten, bleiben sie theoretisch ungefalted (Mosavi et al., 2002).

Von Chang wurde auch eine schwache homotypische Interaktionen carboxyterminaler Fragmente des TRPV5-Proteins von Kaninchen beobachtet (Chang et al., 2004). In der beschriebenen carboxyterminalen Interaktionsregion sind die Aminosäuresequenzen des TRPV5-Proteins von Kaninchen und des TRPV6-Proteins von Mensch zwar identisch, von uns konnten jedoch für TRPV6 von Mensch weder mit Ko-Immünpräzipitation noch im Bakterien-Zwei-Hybrid-System homotypische Interaktionen des TRPV6-Carboxyterminus festgestellt werden.

LOKALISIERUNG AN DER PLASMAMEMBRAN

Die Lokalisierung der modifizierten TRPV6-Konstrukte in der Zelle wurde mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie von B. Niemeyer kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass die modifizierten Vollängen-TRPV6-Konstrukte sich nicht in ihrem subzellulären Verteilungsmuster von dem des normalen TRPV6-Proteins unterscheiden.

Auch die Ergebnisse der Biotinylierung der TRPV6-Konstrukte +5p2 und Δ ANK 3+4 sprechen dafür, dass diese Proteine wie TRPV6 in der Plasmamembran lokalisiert sind. Anscheinend verhindert auch eine größere Deletion wie beispielsweise die Entfernung von ANK 3+4 nicht den Transport zur Plasmamembran (Abbildung 20). Die untersuchten Konstrukte enthalten jedoch alle noch das carboxyterminale VATTV-Motiv, welches eine Bindungsstelle für den S100A10-Annexin 2-Komplex darstellt (van de Graaf et al., 2003). S100A10 fungiert als Chaperon, das die Oberflächenexpression von TRPV5 und TRPV6 begünstigt. Eine Multimerisierung der Untereinheiten scheint also keine Voraussetzung für die Lokalisierung in der Plasmamembran zu sein.

REISSVERSCHLUSS-MODELL

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergab sich, dass für den Zusammenbau der TRPV6-Untereinheiten zum funktionsfähigen Kanal zwei Regionen wichtig sind: ANK 3 scheint die für die Interaktion vorrangige erste Kontaktregion zu sein, während ANK 5 eine nachgeordnete, stabilisierende Funktion zu haben scheint, die wichtig für die Ausbildung eines funktionellen Kanals ist.

Innerhalb von ANK 1+2 liegt auch eine Interaktionsregion, welche für die aminoterminaler TRPV6-Interaktion nicht essentiell ist, aber möglicherweise für die Ausbildung funktioneller Kanäle. Es ist auch möglich, dass Transmembranregionen an der Ausbildung funktioneller TRPV6-Kanäle beteiligt sind, d.h. theoretisch könnten weitere Proteindomänen für eine Dimerisierung von Dimeren nötig sein. Als Modellvorstellung für den Kanalzusammenbau vermuten wir aufgrund der gezeigten Daten eine

Zusammenlagerung der Domänen nach dem Reißverschluss-Prinzip, wobei nur eine korrekte Zusammenlagerung über ANK 3 weiterlaufend über ANK 5, zu funktionsfähigen TRPV6-Kanälen führt (Abbildung 34).

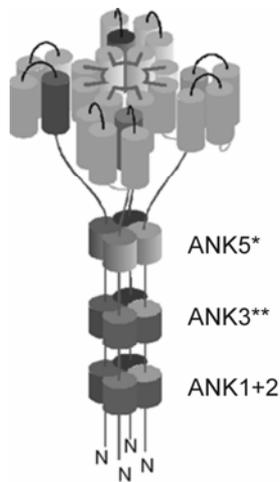


Abbildung 34: Reißverschlussmodell des Zusammenbaus von TRPV6-Untereinheiten zum funktionsfähigen Kanal. **:ANK 3 ist als vorrangige Ankerdomäne für die TRPV6-Tetramerisierung essentiell. * ANK 5 fungiert als nachgeordnete potentielle stabilisierende Region. ANK 1+2 enthält eine Interaktionsdomäne, die für den Kanalzusammenbau nicht essentiell zu sein scheint. (modifiziert nach Niemeyer, Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2005).

Es wurde gezeigt, dass eine TRPV6-TRPV6-Interaktion über Sequenzabschnitte im TRPV6-Aminoterminus ermöglicht wird. Da für den TRPV6 Aminoterminus bislang keine Kristallstruktur-Analyse durchgeführt wurde, ist es momentan nicht möglich, exakte und fundierte Aussagen über die dreidimensionale Struktur dieses Proteinabschnittes zu machen. Die Kristallisierung des TRPV6-Aminoterminus und Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur wären hier hilfreich. Bis dies geschehen ist, liefert die Berücksichtigung der allgemeinen Ankyrin-Repeat-Struktur bei einer Deutung und Gewichtung der Versuchsergebnisse gute Anhaltspunkte, aber keine endgültigen Aussagen.

Mittlerweile gibt es auch für zwei weitere TRPV-Mitglieder Hinweise, dass aminoternale Ankyrin-Repeats für deren Multimerisierung wichtig sind. Für TRPV5 wurde durch Ko-Immunpräzipitationen und Pulldown-Versuche festgestellt, dass eine Interaktionsdomäne im Bereich des ersten ANK-Repeats für die Tetramerisierung von TRPV5 eine Rolle spielt, dass aber sowohl Aminoterminus als auch Carboxyterminus an der Multimerisierung des Kanals beteiligt sind (Chang et al., 2004). Für TRPV4 wurden verschiedene aminoternale Spleißvarianten auf Interaktion mit dem normal vorkommenden TRPV4-Vollängenprotein untersucht, dabei zeigten die Spleißvarianten, bei denen Ankyrin-Repeats deletiert waren, keine Interaktion mehr mit TRPV4 (Arniges et al., 2006).

9.2 TRPV6-HETEROMULTIMERISIERUNG MIT ANDEREN TRPV-PROTEINEN

In weiteren Schritten habe ich getestet, inwieweit das TRPV6-Protein von Mensch mit dem TRPV1-Protein von Ratte, TRPV2 von Maus, TRPV2 von Ratte, TRPV3 von Maus und TRPV4 von Maus interagiert. Die Sequenzen der einzelnen Proteine unterscheiden sich nicht wesentlich zwischen den Spezies, weshalb ich auf die verfügbaren Proteine von Maus bzw. Ratte zurückgegriffen habe. Nur TRPV1 konnte mit TRPV6 ko-immunpräzipitiert werden, nicht aber die anderen TRPV-Mitglieder, die ebenfalls Ankyrin-Repeats aufweisen (Abbildung 24). Daraus ist zu erkennen, dass es nicht zwangsläufig zu Interaktionen von Ankyrin-Sequenzabschnitten kommt bzw. dass Interaktionen zwischen Ankyrin-Repeats nicht unspezifisch entstehen. Ob die Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV6 physiologisch eine Rolle spielt ist bisher unklar, denn eine in-vivo-Kolokalisierung konnte bisher nur für die Transkripte beider Proteine in Mastzellen gezeigt werden - nachgewiesen mit RT-PCR (Stokes et al., 2004). Die Interaktion zwischen TRPV6 und TRPV1 konnte in einer anderen Studie über Heteromultimerisierungen der TRPV-Gruppe nicht detektiert werden (Hellwig et al., 2005). Um festzustellen, ob auch diese TRPV1-TRPV6-Interaktion über aminoterminalen ANK-Repeats vermittelt wird, wurde die TRPV1-Punktmutante ²²⁰LV²²¹/TR auf Interaktion mit TRPV6 getestet. In dieser sind, entsprechend zur TRPV6-¹³⁶LL¹³⁷/TR-Mutanten, welche nicht mehr mit TRPV6 interagiert, zwei konservierte Aminosäurereste von ANK 3 verändert. Die TRPV1-²²⁰LV²²¹/TR-Punktmutante interagiert noch mit TRPV6, wenn auch abgeschwächt (Abbildung 24). Wahrscheinlich ist also die Region ANK 3 bei TRPV1 nicht für die Interaktion mit TRPV6 nötig. Dies würde zu den bisherigen Untersuchungen über die TRPV1-Homomultimerisierung passen, denn der TRPV1-Kanal liegt zwar als Tetramer vor (Kedei et al., 2001), jedoch scheinen für die Tetramerisierung die aminoterminalen ANK-Repeats keine Rolle zu spielen: vielmehr wurde eine TRPV1-Interaktionsregion im Carboxyterminus, welcher eine putative Coiled-Coil-Region enthält, beschrieben (Garcia-Sanz et al., 2004). Diese Interaktionsregion wurde zwar bestätigt, allerdings wurde in Versuchen mit chimären TRPV1-TRPV4-Proteinen, bei denen Amino- und Carboxytermini ausgetauscht wurden, eine weitere und stärkere Interaktionsdomäne innerhalb der Transmembranregionen identifiziert (Hellwig et al., 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen kaum Ergebnisse zu Heteromultimerisierungen in der TRPV-Gruppe vor, inzwischen gibt es einige. So wurde beispielsweise eine Interaktion zwischen TRPV5 und TRPV6 nachgewiesen (Hoenderop et al., 2003), eine gemeinsame Expression der mRNS beider Proteine wurde in der Niere der Maus beobachtet (den Dekker et al., 2003), allerdings unterscheiden sich die Expressionsmuster beträchtlich. Diese Interaktion zwischen TRPV5 und TRPV6 wurde in einer anderen Studie, in der Interaktionen von rTRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 und TRPV6 untersucht wurden, bestätigt. In dieser Studie wurde auch festgestellt, dass alle TRPV-Untereinheiten Homomultimere bilden konnten; gleichzeitig wurde eine heterotypische Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 detektiert, wobei diese möglicherweise nicht physiologisch ist, da bisher keine gemeinsame in-vivo-Expression beider Proteine bekannt ist (Hellwig et al., 2005). Obwohl TRPV1 und TRPV3 ko-immunpräzipitiert wurden, (Smith et al., 2002) konnte eine Wechselwirkung von Hellwig et al. nicht bestätigt werden. Bisher konnten heteromultimere TRPV-Kanäle in Primärzellen auch noch nicht nachgewiesen werden.

9.3 DURCHSUCHUNG VON cDNS-BIBLIOTHEKEN NACH NEUEN

BINDUNGSPARTNERN VON TRPV6

Zu Beginn dieser Arbeit war Calmodulin das einzige Protein, dessen Interaktion mit TRPV6 bereits untersucht war (Niemeyer et al., 2001). Obwohl Ionenkanalproteine oft mit weiteren Proteinen assoziiert sind, wie beispielsweise beim spannungsabhängigen Kalziumkanal die α -Untereinheit mit der β - oder γ -Untereinheit (Flockerzi et al., 1986), wurden für TRPV6 bisher keine weiteren Kanaluntereinheiten identifiziert. Wir hatten uns zum weiteren Ziel meiner Arbeit die Identifizierung neuer, mit TRPV6 interagierender Proteine gesetzt. Diese Identifizierung sollte anhand der Durchsuchung von cDNS-Bibliotheken mit einem Bakterien-Zwei-Hybrid-System ermöglicht werden. Die Wahl fiel auf ein Bakterien-Zwei-Hybrid-System, weil mit diesem System im Vergleich zum Hefe-System eine höhere Transformations-effizienz erreicht werden sollte und die Plasmid-DNS nicht in den Zellkern transportiert werden muss. Beides ist theoretisch von Vorteil und sollte die Identifizierung selten vorkommender Bindungspartner erleichtern. Zudem wachsen die Bakterien schneller und die Isolierung von DNS aus Bakterien ist einfacher als aus Hefen (siehe Abbildung 5, Seite 46).

Im ersten Versuch wurde mit dem Bacteriomatch[®]-System von Stratagene nach Interaktionspartnern für den TRPV6-Carboxyterminus gesucht (siehe Seite 97). Hierzu wurde eine cDNS-Bibliothek aus Plazenta von Mensch hergestellt, wobei die Plazenta-cDNS-Klone in das pTRG-Plasmid inseriert wurden. Menschliche Plazenta wurde ausgewählt, da TRPV6 dort stark exprimiert ist (Wissenbach et al., 2001; Peng et al., 2001). Nach der Hitzeschock-Kotransformation der Plazenta-Bibliothek/pTRG mit dem TRPV6-Carboxyterminus/pBTL in die Bacteriomatch[®]-Reporterbakterien wurden diese auf einem Selektionsmedium mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin ausplattiert, um auf die Aktivierung des ersten Reportergens ampR (Carbenicillin-resistenz) durch Protein-Protein-Interaktionen zu testen. Diese Konzentration war vermutlich zu niedrig gewählt, denn sie erlaubte das Wachstum von über 1000 Kolonien, von denen ca. 600 Kolonien näher untersucht wurden. Die meisten Klone lagen im falschen Leserahmen vor, d.h. die Selektion war nicht effektiv. Deshalb wurden 580 Bakterien-Klone aus den angelegten Stammkulturen erneut auf Selektionsmedium mit 600 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin getestet. Insgesamt konnten 17 cDNS-Klone mit DNS im richtigen Leserahmen identifiziert werden. Sie wurden erneut auf Interaktion mit dem TRPV6-Carboxyterminus untersucht. Allerdings konnte die Interaktion nicht reproduziert werden, möglicherweise waren die ursprünglich detektierten Interaktionen unspezifisch oder zu schwach ausgeprägt. Eventuell könnte auch die Zahl der getesteten Klone zu niedrig gewesen sein, da laut Hersteller 1-2 x 10⁶ Kolonien durchsucht werden müssten. Nach den Berechnungen der Test-Kotransformation wurden nur maximal 4,5 x 10⁴ Kolonien getestet.

Folgende Verbesserungen könnten in Zukunft die Chancen zur Auffindung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Bacteriomatch[®]-System erhöhen: zum Einen könnte die Transformationseffizienz durch Elektroporation verbessert werden. Weiterhin sollten die Reporterbakterien nach der Kotransformation auf Selektionsmedium mit 600 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin und X-Gal/IPTG ausplattiert werden, um unspezifisches Wachstum zu unterdrücken.

Weil in der ersten Versuchsserie keine neuen Interaktionspartner für TRPV6 gefunden worden waren und mittlerweile das verbesserte Bacteriomatch®II-System erhältlich war, wurde ein zweiter Versuch zur Identifizierung neuer TRPV6-Interaktionspartner mit dem neuen System gestartet (siehe Seite 99). Dieses System enthält neue Reportergene, welche im Vergleich zum älteren System weniger unspezifisches Kolonienwachstum erlauben. Diesmal wurde eine von Stratagene gekaufte cDNS-Bibliothek aus humanem Pankreas nach Interaktionspartnern für den TRPV6-Carboxyterminus durchsucht. Es wurde eine Pankreas-Bibliothek gewählt, da eine TRPV6-Expression im Pankreas nachgewiesen ist (Wissenbach et al., 2001; Peng et al., 2001). Die Bibliothek wurde einmal in halbfester Agarose amplifiziert. Bei der Kotransformation mit dem TRPV6-Carboxyterminus wurden $1,96 \times 10^7$ Pankreas-cDNS-Klone getestet. 1140 positive Kolonien wurden auf Aktivierung des zweiten Reportergens „Streptomycin-Resistenz“ überprüft. Bei der Sequenzierung der DNS von 40 gewachsenen Kolonien zeigte sich, dass die DNS von 30 Klonen das Enzym Arginin N-Methyltransferase (HRMT1L2) kodierte. Diese Klone zeigten in der Negativkontrolle mit leeren pBTL-Plasmid ein starkes Kolonienwachstum, was bedeutet, dass die Arginin N-methyl-transferase alleine eine starke Transkriptionsaktivierung der Reportergene bewirken konnte. Das vermehrte Auftreten dieses Klones war nicht auf die Amplifikation in halbfestem Agar zurückzuführen, denn Stichproben von cDNS-Klonen vor und nach der Amplifikation zeigten keine Veränderung in der Größenverteilung der in pTRG inserierten cDNS-Klone (Abbildung 25). Erst nach der Kotransformation war die Arginin N-methyl-transferase stark vertreten. Weitere DNS, die identifiziert wurden, kodierte für 14 Serinproteasen, 9 Proteine aus der Familie des Chymotrypsins, 6 Elastasen, 5 Carboxypeptidasen sowie ein bakterielles Trypsinogen und eine zur Aldo-Keto-Reduktase-Familie gehörige Proteinsequenz. Leider gab es in jeder Gruppe DNS-Klone im richtigen und falschen Leserahmen, d.h. das jeweils kodierte Protein war für die Identifizierung nicht relevant.

Die von Stratagene erworbene Bacteriomatch®II-Pankreas-Bibliothek erwies sich als nicht geeignet für das Bacteriomatch®II-System, weil eine darin enthaltene Arginin N-Methyltransferase alleine die Transkription der Reportergene so stark aktivierte, dass mögliche in der Bibliothek enthaltene TRPV6-Interaktionspartner nicht mehr identifiziert werden konnten. Insgesamt scheint sich das bakterielle Zwei-Hybrid-System trotz der genannten Vorteile gegenüber den Hefe-Systemen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner nicht zu eignen, lediglich zur gezielten Untersuchung der Interaktion zweier definierter Proteinfragmente.

Mittlerweile wurden einige weitere mit TRPV6 oder TRPV5 interagierende Proteine identifiziert: Im Carboxyterminus von TRPV6 von Maus wurde die Aminosäuresequenz „VATTV“, welche bei TRPV6 von Mensch den Aminosäureresten 598-602 entspricht, als Bindungsstelle für S100A10 identifiziert (van de Graaf et al., 2003) (Abbildung 35). Das S100A10-Protein liegt größtenteils im heterotetrameren Komplex mit Annexin 2 vor; die Bindung dieses Komplexes scheint wichtig für den Transport von TRPV6-Kanälen zur Plasmamembran zu sein. Es wurde auch die Interaktion der Thyrosinphosphatase PTP1B mit TRPV6 von Ratte untersucht, wobei die Thyrosin-Phosphorylierung möglicherweise an der Regulation des TRPV6-Kanals beteiligt ist (Sternfeld et al., 2005). Für den mit TRPV6 eng verwandten Kanal TRPV5 wurde über cDNS-Microarrays das Interaktionsprotein 80K-H, welches über zwei EF-Hände Kalzium binden kann, identifiziert (Gkika et al., 2004). Seine Interaktionsstelle liegt in der Aminosäuresequenz 598-608 von mTRPV5, also zwei Aminosäurereste hinter dem „VATTV“-Motiv, an das S100A10-Annexin 2 bindet

(Abbildung 35). Anhand eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde die Interaktion von TRPV5 und TRPV6 von Maus mit Rab11a, einem Mitglied der Familie der kleinen GTPasen, identifiziert (van de Graaf et al., 2006a). Interaktionsstelle ist das in TRPV5 und TRPV6 identische, hochkonservierte Motiv „MLERK“ welches unmittelbar hinter dem bereits erwähnten „VATTV“-Motiv beginnt und somit mit der TRPV5-Bindungsstelle für 80K-H überlappt (Abbildung 35). Rab11a könnte eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport von TRPV5/6 spielen.

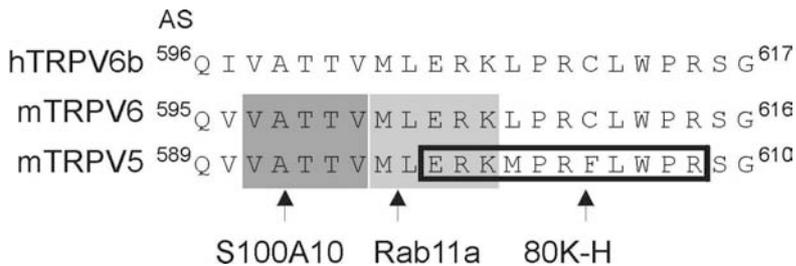


Abbildung 35: Übersicht über die Bindungsstellen der Proteine S100A10, Rab11a und 80K-H in TRPV6 von Maus bzw. TRPV5 von Maus. Die entsprechende Aminosäuresequenz von TRPV6 von Mensch ist zur Übersicht ebenfalls dargestellt. Die Interaktionsstellen von S100A10, Rab11a und 80K-H liegen direkt hintereinander bzw. überlappen. hTRPV6b bedeutet TRPV6, Variante b von Mensch; mTRPV6 steht für TRPV6 von Maus; mTRPV5 bedeutet TRPV5 von Maus. Die jeweilige Position der Aminosäurereste (AS) ist in Nummern angegeben.

Ein weiteres mit TRPV5 interagierendes Protein ist die β -Glukuronidase Klotho, welche die Glykosylierung von TRPV5 reduziert. Klotho kann in TRPV5- und TRPV6-exprimierenden Zellen den Kalziumeinstrom vergrößern. Es gibt Hinweise, dass von Klotho vermittelte Deglykosylierung die Retention von TRPV5 oder TRPV6 in der Plasmamembran bewirkt (Chang et al., 2005). Kürzlich wurde eine Interaktion der TRPV5- und TRPV6-Carboxytermini mit BSPRY, einem Protein mit bisher unbekannter physiologischer Funktion, identifiziert (van de Graaf et al., 2006b).

9.4 FÜR DIE TRPM8-MULTIMERISIERUNG IST EINE COILED-COIL-DOMÄNE

WICHTIG

9.4.1 TRPM8 HOMOMULTIMERISIERUNG

Mit dem Bacteriomatch[®]II-System wurden weiterhin verschiedene homo- und heterotypische TRPM8-Interaktionen untersucht. Insgesamt wurden für drei TRPM8-Fragmente homotypische Interaktionen detektiert. Der Carboxyterminus, welcher die Aminosäurereste 978 bis 1104 umfasst, und der hintere Teil des Aminoterminus, der die Aminosäurereste 514 bis 694 beinhaltet, zeigten jeweils eine sehr starke homotypische Interaktion. Der Mittelteil des Aminoterminus mit den Aminosäureresten 401 bis 513 interagiert dagegen nur schwach homotypisch (Tabelle 5). Weiterhin wurden drei heterotypische Interaktionen festgestellt: Der Proteinabschnitt von Position 978 bis 1104 im Carboxyterminus interagiert sowohl mit dem Proteinabschnitt von Position 401 bis 513 im Aminoterminus als auch mit einem aminoterminalen Fragment, welches die Positionen 514 bis 694 umfasste. Der vordere Teil des Aminoterminus, der die Aminosäurereste 1 bis 400 umfasst, interagiert schwach mit dem Proteinabschnitt

von 514 bis 694 des Aminoterminus. Sehr starke homotypische Interaktionen zeigten demnach nur jeweils der Carboxyterminus und der hintere Teil des Aminoterminus. Es ist möglich, dass einige dieser Interaktionen an der Ausbildung der Tertiärstruktur des TRPM8-Proteins beteiligt sind oder an der Kanalmultimerisierung (Tabelle 5).

Um festzustellen, welche der detektierten Interaktionen für die Multimerisierung der TRPM8-Untereinheiten zum funktionellen Kanal die entscheidende Rolle spielt, wurden Ko-Immünpräzipitations-Experimente in HEK293-Zellen durchgeführt (Abbildung 30). Hier konnte gezeigt werden, dass der Carboxyterminus von TRPM8 eine entscheidende Rolle für die Homomultimerisierung spielt. Um zu untersuchen, ob -wie vorhergesagt- die carboxyterminale Coiled-Coil-Region für die Interaktion wichtig ist, wurde die Mutation ¹⁰⁸⁹L/P, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit die Coiled-Coil-Domäne zerstört, in TRPM8 eingeführt. Diese Mutante zeigte im Bacteriomatch[®] II-System keine Interaktion mehr mit dem TRPM8-Carboxyterminus und konnte nicht mehr mit dem TRPM8-Protein ko-immunpräzipitiert werden (Tabelle 5 und Abbildung 30). In Saccharose-Dichtegradienten konnte TRPM8 verstärkt in solchen Fraktionen detektiert werden, in denen Proteine mit der Größe des TRPM8-Trimers und -Tetramers zu erwarten waren. Dagegen wurde die TRPM8-Mutante ¹⁰⁸⁹L/P, bei der die Coiled-Coil-Region zerstört ist, nur noch in Fraktionen detektiert, in denen das monomere Protein vorhanden sein sollte. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die carboxyterminale Coiled-Coil-Domäne eine entscheidende Rolle für die TRPM8-TRPM8-Wechselwirkung spielt (Abbildung 31).

9.4.2 COILED-COIL-DOMÄNEN

Coiled-Coil-Domänen sind ubiquitär vorkommende Proteinmotive, über die Proteine wechselwirken, und die sehr einfach aufgebaut sind: Sie bestehen aus einer α -Helix, welche durch ein wiederholtes Muster von sieben Aminosäureresten („Heptade“) gekennzeichnet ist. Zwei bis fünf solcher α -Helizes können -parallel oder antiparallel zu einem Bündel angeordnet- ein linksgedrehtes „Supercoil“ bilden. Die Aminosäurereste der einzelnen Heptade werden mit den Buchstaben a bis g bezeichnet. An Position a und d befinden sich hydrophobe Aminosäurereste, diese bilden die Interaktionsfläche zwischen den Helizes, den „hydrophoben Kern“ (Abbildung 36 A). Die restlichen Aminosäurereste sind polar oder geladen, sie können an intra- oder interhelikalen Interaktionen beteiligt sein und so zur Spezifität und Stabilität des Supercoils beitragen, wobei die Interaktionen der Reste e und g für die Spezifität besonders wichtig sind (Abbildung 36 A und B). Es kommen Homo- oder Heterodimere, Trimere, Tetramere oder Pentamere vor.

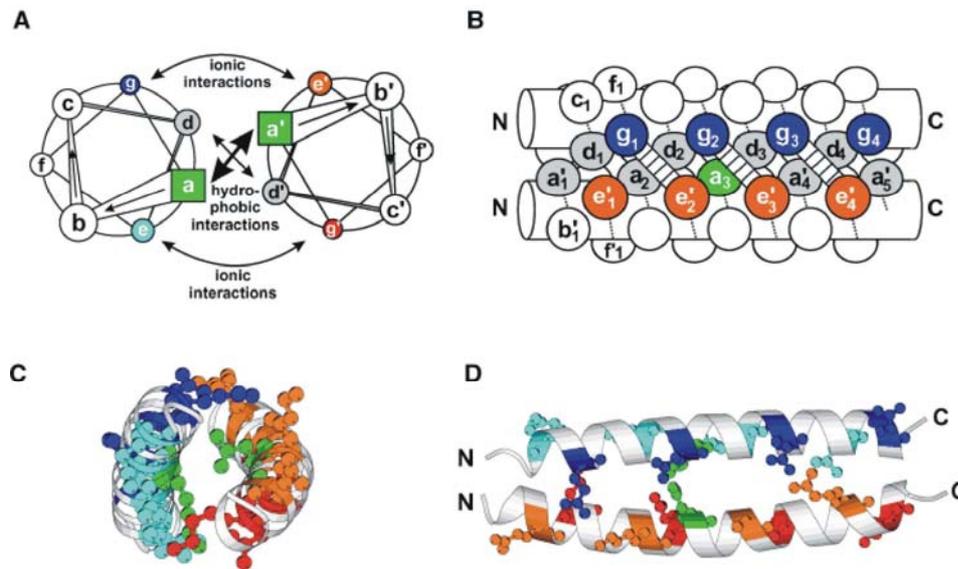


Abbildung 36: *A, B* schematische Darstellung eines parallelen dimeren Coiled-Coil. *A*, schematischer Querschnitt durch das Coiled-Coil-Dimer. Die hydrophoben Aminosäurereste der Positionen *a* und *g* bilden eine Interaktionsfläche aus, die hydrophilen Reste *e* und *g* können ebenfalls interagieren. *B*, Die Zylinder stellen das Helixgerüst dar, die Kreise die Seitenketten der Aminosäurereste. *C, D* Bändermodell des Coiled-Coil-Dimers; in *C* ist ein Querschnitt dargestellt, in *D* eine Seitenansicht (Mason und Arndt, ChemBioChem 2004).

Das erste Protein, in welchem eine Coiled-Coil-Struktur entdeckt wurde, war α -Keratin (Burkhard et al., 2001; Arndt et al., 2002). Neben dem Heptaden kommen auch andere Motive vor, so wurde bei der Analyse eines Fragmentes des Proteins Tetrabrachion aus *Staphylothermus marinus* festgestellt, dass sich Wiederholungen aus elf Aminosäureresten („Undekaden“) zu einem tetrameren rechtsgedrehten Supercoil zusammenlagern (Stetefeld et al., 2000). Die Tetramerisierungsdomäne von VASP (*human vasodilator-stimulated phosphoprotein*) wurde als rechtsgedrehtes Supercoil aus Wiederholungen von fünfzehn Aminosäureresten identifiziert (Kuhnel et al., 2004).

9.4.3 COILED-COIL-DOMÄNEN IN PROTEINEN DER TRPM-UNTERFAMILIE

Eine Analyse der Proteinsequenzen aller Mitglieder der TRPM-Unterfamilie mit dem Algorithmus COILS (Lupas et al., 1991), welcher über Ähnlichkeitsbewertungen der Sequenzen mit denen bekannter Coiled-Coil-Strukturen die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Coiled-Coils berechnet, zeigte folgende Ergebnisse: Bei allen TRPM-Kanälen konnte mit COILS eine putative Coiled-Coil-Domäne im Carboxyterminus gefunden werden, nur bei TRPM5 liegt sie im Aminoterminus. Mithilfe des Programms konnte eine Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Coiled-Coil-Struktur vorausgesagt werden. Sie ist in Tabelle 6 für die einzelnen TRPM-Proteine aufgeführt. Eine Gemeinsamkeit der carboxyterminalen putativen Coiled-Coil-Domänen ist, dass sie alle ca. 80 Aminosäurereste hinter der TRP-Domäne, einer insbesondere in TRPC- und TRPM-Proteinen hochkonservierten Region (Montell, 2005), lokalisiert sind; bei TRPM8 beträgt die Distanz dagegen nur ca. 40 Aminosäurereste. In den *Ether à go-go*- oder EAG-Kaliumkanälen wurde eine carboxyterminale Coiled-Coil-Domäne untersucht, die für die Ausbildung stabiler Tetramere essentiell ist; in diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, ob Coiled-Coil-Regionen in TRP-Kanälen

vielleicht eine Rolle als Multimerisierungsdomänen spielen könnten (Jenke et al., 2003). Nach Deletion des TRPM4-Carboxyterminus, welcher auch die putative Coiled-Coil-Region umfasst, konnte diese Variante nicht mehr mit TRPM4 ko-immunpräzipitiert werden; es wurde nicht untersucht, ob die Coiled-Coil-Domäne normalerweise für die Interaktion eine Rolle spielt (Launay et al., 2002). Da die carboxyterminale Coiled-Coil-Domäne in TRPM8 meinen Ergebnissen zufolge für die Zusammenlagerung von TRPM8-Proteinen essentiell ist, wäre es interessant, festzustellen, inwieweit dies auch für andere TRPM-Proteine gilt.

Kanalprotein	Coil-Wahrscheinlichkeit		Lokalisierung	Aminosäurereste Position
	Einfache Gewichtung aller Heptadenreste	2,5-fache Gewichtung der Positionen a und d		
hTRPM1	90-91 %	81-98 %	C-Terminus	1125-1167
hTRPM2	65 %	93 %	C-Terminus	1173-1200
hTRPM3	79-82 %	78-100 %	C-Terminus	1078-1135
hTRPM4	79-87 %	88 %	C-Terminus	1134-1193
hTRPM5	92 %	88 %	N-Terminus	553-580
hTRPM6	46 %	97 %	C-Terminus	1186-1213
hTRPM7	0 %	82 %	C-Terminus	1210-1237
hTRPM8	92-99 %	94-100 %	C-Terminus	1070-1104

Tabelle 6: Vorhersage von Coiled-Coil-Domänen in verschiedenen TRPM-Proteinen, erstellt mit dem Programm COILS nach der Lupas-Methode. Bei der Errechnung der Coil-Wahrscheinlichkeit werden zwei Werte ermittelt: Der erste Wert mit einfacher Gewichtung aller Aminosäurereste der Heptade, der zweite Wert mit 2,5-facher Gewichtung der hydrophoben Aminosäurereste an Position a und d und einfacher Gewichtung der restlichen Aminosäurereste b,c,e,f und g. Der Wert mit 2,5-facher Gewichtung von a und d sollte nicht mehr als 20-30 % unter dem Wert ohne Gewichtung liegen, ansonsten ist das Vorliegen einer Coiled-Coil-Struktur unwahrscheinlich (www.ch.embnet.org/software/coils/COILS_doc.html). C-Terminus steht für Carboxyterminus, N-Terminus steht für Aminoterminus.

10 LITERATURVERZEICHNIS

10.1 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

- Erler I., Al-Ansary D. M., Wissenbach U., Wagner T. F., Flockerzi V., Niemeyer B. A. (2006) Trafficking and Assembly of the Cold-sensitive TRPM8 Channel. *J Biol Chem*, 38396-404.
- Erler I., Hirnet D., Wissenbach U., Flockerzi V. and Niemeyer B. A. (2004) Ca²⁺-selective Transient Receptor Potential V Channel Architecture and Function Require a Specific Ankyrin Repeat. *J Biol Chem*, 34456-63.
- Erler I., Hirnet D., Wissenbach U., Niemeyer B. A. (2004) Assembly of TRPV6 Calcium Channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369 (1), R60 (239).
- Erler I., Hirnet D., Niemeyer B. A. (2003) Assembly of TRPV6: Identification of functional domains. *Proceedings of 8th International Dahlem Symposium on „Cellular Signal Recognition and Transduction“, June 18-21*

10.2 ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- Abe J., Hosokawa H., Okazawa M., Kandachi M., Sawada Y., Yamanaka K., Matsumura K. and Kobayashi S. (2005) TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res* **136**, 91-8.
- Altschul S. F. and Lipman D. J. (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5509-13.
- Amiri H., Schultz G. and Schaefer M. (2003) FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* **33**, 463-70.
- Arndt K. M., Pelletier J. N., Muller K. M., Pluckthun A. and Alber T. (2002) Comparison of in vivo selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure* **10**, 1235-48.
- Arniges M., Fernandez-Fernandez J. M., Albrecht N., Schäfer M. and Valverde M. A. (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of Ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem* **281**, 1580-86.
- Balzer M., Lintschinger B. and Groschner K. (1999) Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* **42**, 543-9.
- Batchelor A. H., Piper D. E., de la Brousse F. C., McKnight S. L. and Wolberger C. (1998) The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* **279**, 1037-41.
- Bennett V. and Baines A. J. (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* **81**, 1353-92.
- Bidaux G., Roudbaraki M., Merle C., Crepin A., Delcourt P., Slomianny C., Thebault S., Bonnal J. L., Benahmed M., Cabon F., Mauroy B. and Prevarskaya N. (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**, 367-82.

- Binz H. K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M. T., Briand C., Forrer P., Grutter M. G. and Pluckthun A. (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* **22**, 575-82.
- Bork P. (1993) Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* **17**, 363-74.
- Breeden L. and Nasmyth K. (1987) Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* **329**, 651-4.
- Burkhard P., Stetefeld J. and Strelkov S. V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-8.
- Caterina M. J., Rosen T. A., Tominaga M., Brake A. J. and Julius D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436-41.
- Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D. and Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-24.
- Chang Q., Gyftogianni E., van de Graaf S. F., Hoefs S., Weidema F. A., Bindels R. J. and Hoenderop J. G. (2004) Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J Biol Chem* **279**, 54304-11.
- Chang Q., Hoefs S., van der Kemp A. W., Topala C. N., Bindels R. J. and Hoenderop J. G. (2005) The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310**, 490-3.
- Chuang H. H., Neuhausser W. M. and Julius D. (2004) The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* **43**, 859-69.
- Chubanov V., Waldegger S., Mederos y Schnitzler M., Vitzthum H., Sassen M. C., Seyberth H. W., Konrad M. and Gudermann T. (2004) Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2894-9.
- Chung M. K., Lee H., Mizuno A., Suzuki M. and Caterina M. J. (2004) TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* **279**, 21569-75.
- Corey D. P., Garcia-Anoveros J., Holt J. R., Kwan K. Y., Lin S. Y., Vollrath M. A., Amalfitano A., Cheung E. L., Derfler B. H., Duggan A., Geleoc G. S., Gray P. A., Hoffman M. P., Rehm H. L., Tamasauskas D. and Zhang D. S. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*.
- Cosens D. J. and Manning A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-7.
- den Dekker E., Hoenderop J. G., Nilius B. and Bindels R. J. (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**, 497-507.
- Dietrich A., Mederos Y. S. M., Gollasch M., Gross V., Storch U., Dubrovskaja G., Obst M., Yildirim E., Salanova B., Kalwa H., Essin K., Pinkenburg O., Luft F. C., Gudermann T. and Birnbaumer L. (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* **25**, 6980-9.
- Dove S. L. and Hochschild A. (1998) Conversion of the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes Dev* **12**, 745-54.
- Dove S. L., Joung J. K. and Hochschild A. (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**, 627-30.
- Duncan L. M., Deeds J., Cronin F. E., Donovan M., Sober A. J., Kauffman M. and McCarthy J. J. (2001) Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* **19**, 568-76.

- Duncan L. M., Deeds J., Hunter J., Shao J., Holmgren L. M., Woolf E. A., Tepper R. I. and Shyjan A. W. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**, 1515-20.
- Ehebauer M. T., Chirgadze D. Y., Hayward P., Martinez Arias A. and Blundell T. L. (2005) High-resolution crystal structure of the human Notch 1 ankyrin domain. *Biochem J* **392**, 13-20.
- Engelke M., Friedrich O., Budde P., Schafer C., Niemann U., Zitt C., Jungling E., Rocks O., Luckhoff A. and Frey J. (2002) Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* **523**, 193-9.
- Erler I., Hirnet D., Wissenbach U., Flockerzi V. and Niemeyer B. A. (2004) Ca²⁺-selective Transient Receptor Potential V Channel Architecture and Function Require a Specific Ankyrin Repeat. *J Biol Chem*, 34456-63.
- Fixemer T., Wissenbach U., Flockerzi V. and Bonkhoff H. (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**, 7858-61.
- Flockerzi V., Oeken H. J., Hofmann F., Pelzer D., Cavalie A. and Trautwein W. (1986) Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* **323**, 66-8.
- Forrer P., Stumpp M.T., Binz K., Plückthun A. (2003) A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. *FEBS letters* **539**, 2-6
- Freichel M., Suh S. H., Pfeifer A., Schweig U., Trost C., Weissgerber P., Biel M., Philipp S., Freise D., Droogmans G., Hofmann F., Flockerzi V. and Nilius B. (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* **3**, 121-7.
- Garcia-Sanz N., Fernandez-Carvajal A., Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Fajardo-Sanchez E., Fernandez-Ballester G. and Ferrer-Montiel A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* **24**, 5307-14.
- Gkika D., Mahieu F., Nilius B., Hoenderop J. G. and Bindels R. J. (2004) 80K-H as a new Ca²⁺ sensor regulating the activity of the epithelial Ca²⁺ channel transient receptor potential cation channel V5 (TRPV5). *J Biol Chem* **279**, 26351-7.
- Goel M., Sinkins W. G. and Schilling W. P. (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**, 48303-10.
- Greka A., Navarro B., Oancea E., Duggan A. and Clapham D. E. (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* **6**, 837-45.
- Guler A. D., Lee H., Iida T., Shimizu I., Tominaga M. and Caterina M. (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408-14.
- Hellwig N., Albrecht N., Harteneck C., Schultz G. and Schaefer M. (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* **118**, 917-28.
- Hirnet D., Olausson J., Fecher-Trost C., Bodding M., Nastainczyk W., Wissenbach U., Flockerzi V. and Freichel M. (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **33**, 509-18.
- Hoenderop J. G., Nilius B. and Bindels R. J. (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* **85**, 373-422.
- Hoenderop J. G., Vennekens R., Muller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R. J. and Nilius B. (2001) Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* **537**, 747-61.

- Hoenderop J. G., Voets T., Hoefs S., Weidema F., Prenen J., Nilius B. and Bindels R. J. (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J* **22**, 776-85.
- Hofmann T., Chubanov V., Gudermann T. and Montell C. (2003) TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* **13**, 1153-8.
- Hofmann T., Schaefer M., Schultz G. and Gudermann T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7461-6.
- Jenke M., Sanchez A., Monje F., Stuhmer W., Weseloh R. M. and Pardo L. A. (2003) C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *Embo J* **22**, 395-403.
- Jonas-Straube E., Hutin C., Hoffman N. E. and Schunemann D. (2001) Functional analysis of the protein-interacting domains of chloroplast SRP43. *J Biol Chem* **276**, 24654-60.
- Jordan C., Puschel B., Koob R. and Drenckhahn D. (1995) Identification of a binding motif for ankyrin on the alpha-subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* **270**, 29971-5.
- Joung J. K., Ramm E. I. and Pabo C. O. (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7382-7.
- Kahr H., Schindl R., Fritsch R., Heinze B., Hofbauer M., Hack M. E., Mortelmaier M. A., Groschner K., Peng J. B., Takanaga H., Hediger M. A. and Romanin C. (2004) CaT1 knock-down strategies fail to affect CRAC channels in mucosal-type mast cells. *J Physiol* **557**, 121-32.
- Kaiser, S. (2004) Identification and characterization of the ion channel TRPM8 in prostate cancer. Berlin, Humboldt-Universität, Dissertation. (online: www.edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTML)
- Kedei N., Szabo T., Lile J. D., Treanor J. J., Olah Z., Iadarola M. J. and Blumberg P. M. (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**, 28613-9.
- Kim S. J., Kim Y. S., Yuan J. P., Petralia R. S., Worley P. F. and Linden D. J. (2003) Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* **426**, 285-91.
- Kobertz W. R. and Miller C. (1999) K⁺ channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure. *Nat Struct Biol* **6**, 1122-5.
- Koob R., Zimmermann M., Schoner W. and Drenckhahn D. (1988) Colocalization and coprecipitation of ankyrin and Na⁺,K⁺-ATPase in kidney epithelial cells. *Eur J Cell Biol* **45**, 230-7.
- Kreusch A., Pfaffinger P. J., Stevens C. F. and Choe S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* **392**, 945-8.
- Kriegler M. (1990) Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual. *Verlag Stockton Press, New York*
- Kuhnel K., Jarchau T., Wolf E., Schlichting I., Walter U., Wittinghofer A. and Strelkov S. V. (2004) The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17027-32.
- Kyte J. and Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157** (1), 105-32
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lambers T. T., Weidema A. F., Nilius B., Hoenderop J. G. and Bindels R. J. (2004) Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca(2+)-sensor calmodulin. *J Biol Chem* **279**, 28855-61.
- Launay P., Fleig A., Perraud A. L., Scharenberg A. M., Penner R. and Kinet J. P. (2002) TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* **109**, 397-407.

- Li H. S., Xu X. Z. and Montell C. (1999) Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* **24**, 261-73.
- Li Z. P., Burke E. P., Frank J. S., Bennett V. and Philipson K. D. (1993) The cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger binds to the cytoskeletal protein ankyrin. *J Biol Chem* **268**, 11489-91.
- Liedtke W., Choe Y., Marti-Renom M. A., Bell A. M., Denis C. S., Sali A., Hudspeth A. J., Friedman J. M. and Heller S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525-35.
- Liman E. R., Corey D. P. and Dulac C. (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5791-6.
- Lockwich T. P., Liu X., Singh B. B., Jadlowiec J., Weiland S. and Ambudkar I. S. (2000) Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem* **275**, 11934-42.
- Lupas A., Van Dyke M. and Stock J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-4.
- Lux S. E., John K. M. and Bennett V. (1990) Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* **344**, 36-42.
- Matsuno K., Go M. J., Sun X., Eastman D. S. and Artavanis-Tsakonas S. (1997) Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* **124**, 4265-73.
- McGuffin L. J., Bryson K. and Jones D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-5.
- Michaely P. and Bennett V. (1993) The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J Biol Chem* **268**, 22703-9.
- Michaely P., Tomchick D. R., Machius M. and Anderson R. G. (2002) Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *Embo J* **21**, 6387-96.
- Mohler P. J., Gramolini A. O. and Bennett V. (2002) Ankyrins. *J Cell Sci* **115**, 1565-6.
- Montell C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Montell C. and Rubin G. M. (1989) Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-23.
- Mosavi L. K., Cammett T. J., Desrosiers D. C. and Peng Z. Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* **13**, 1435-48.
- Mosavi L. K., Minor D. L., Jr. and Peng Z. Y. (2002) Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16029-34.
- Mosavi L. K. and Peng Z. Y. (2003) Structure-based substitutions for increased solubility of a designed protein. *Protein Eng* **16**, 739-45.
- Muller D., Hoenderop J. G., Meij I. C., van den Heuvel L. P., Knoers N. V., den Hollander A. I., Eggert P., Garcia-Nieto V., Claverie-Martin F. and Bindels R. J. (2000) Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1). *Genomics* **67**, 48-53.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

- Nadler M. J., Hermosura M. C., Inabe K., Perraud A. L., Zhu Q., Stokes A. J., Kurosaki T., Kinet J. P., Penner R., Scharenberg A. M. and Fleig A. (2001) LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**, 590-5.
- Nagamine K., Kudoh J., Minoshima S., Kawasaki K., Asakawa S., Ito F. and Shimizu N. (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* **54**, 124-31.
- Niemeyer B. A., Bergs C., Wissenbach U., Flockerzi V. and Trost C. (2001) Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3600-5.
- Nijenhuis T., Vallon V., van der Kemp A. W., Loffing J., Hoenderop J. G. and Bindels R. J. (2005) Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest* **115**, 1651-8.
- Nilius B., Prenen J., Hoenderop J. G., Vennekens R., Hoefs S., Weidema A. F., Droogmans G. and Bindels R. J. (2002) Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J Biol Chem* **277**, 30852-8.
- Nilius B., Prenen J., Droogmans G., Voets R., Vennekens R., Freichel M., Wissenbach U., Flockerzi V. (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **278**, 30813-20
- Nilius B., Prenen J., Vennekens R., Hoenderop J. G., Bindels R. J. and Droogmans G. (2001a) Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca²⁺. *Cell Calcium* **29**, 417-28.
- Nilius B., Prenen J., Vennekens R., Hoenderop J. G., Bindels R. J. and Droogmans G. (2001b) Pharmacological modulation of monovalent cation currents through the epithelial Ca(2+) channel ECaC1. *Br J Pharmacol* **134**, 453-62.
- Nilius B. and Voets T. (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* **451**, 1-10.
- Nilius B., Vriens J., Prenen J., Droogmans G. and Voets T. (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C195-205.
- Oberwinkler J., Lis A., Giehl K. M., Flockerzi V. and Philipp S. E. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* **280**, 22540-8.
- Pedersen S. F., Owsianik G. and Nilius B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-52.
- Peier A. M., Moqrich A., Hergarden A. C., Reeve A. J., Andersson D. A., Story G. M., Earley T. J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S. and Patapoutian A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-15.
- Peng J. B., Brown E. M. and Hediger M. A. (2001) Structural conservation of the genes encoding cat1, cat2, and related cation channels. *Genomics* **76**, 99-109.
- Peng J. B., Brown E. M. and Hediger M. A. (2003) Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol* **551**, 729-40.
- Peng J. B., Chen X. Z., Berger U. V., Vassilev P. M., Brown E. M. and Hediger M. A. (2000a) A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem* **275**, 28186-94.
- Peng J. B., Chen X. Z., Berger U. V., Vassilev P. M., Tsukaguchi H., Brown E. M. and Hediger M. A. (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* **274**, 22739-46.

- Peng J. B., Chen X. Z., Berger U. V., Weremowicz S., Morton C. C., Vassilev P. M., Brown E. M. and Hediger M. A. (2000b) Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 326-32.
- Perez C. A., Huang L., Rong M., Kozak J. A., Preuss A. K., Zhang H., Max M. and Margolskee R. F. (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**, 1169-76.
- Perraud A. L., Fleig A., Dunn C. A., Bagley L. A., Launay P., Schmitz C., Stokes A. J., Zhu Q., Bessman M. J., Penner R., Kinet J. P. and Scharenberg A. M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595-9.
- Philipp S., Strauss B., Hirnet D., Wissenbach U., Mery L., Flockerzi V. and Hoth M. (2003) TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem* **278**, 26629-38.
- Rohacs T., Lopes C. M., Michailidis I. and Logothetis D. E. (2005) PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* **8**, 626-34.
- Runnels L. W., Yue L. and Clapham D. E. (2001) TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043-7.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sankaranarayanan S., De Angelis D., Rothman J. E. and Ryan T. A. (2000) The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J* **79**, 2199-208.
- Schlingmann K. P., Weber S., Peters M., Niemann Nejsum L., Vitzthum H., Klingel K., Kratz M., Haddad E., Ristoff E., Dinour D., Syrrou M., Nielsen S., Sassen M., Waldegger S., Seyberth H. W. and Konrad M. (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* **31**, 166-70.
- Schwarz EC., Wissenbach U., Niemeyer BA., Strauß B., Philipp SE., Flockerzi V., Hoth M. (2006) TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation *Cell Calcium*, 163-73.
- Sedgwick S. G. and Smerdon S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* **24**, 311-6.
- Shen N. V., Chen X., Boyer M. M. and Pfaffinger P. J. (1993) Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron* **11**, 67-76.
- Sidi S., Friedrich R. W. and Nicolson T. (2003) NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* **301**, 96-9.
- Smith G. D., Gunthorpe M. J., Kelsell R. E., Hayes P. D., Reilly P., Facer P., Wright J. E., Jerman J. C., Walhin J. P., Ooi L., Egerton J., Charles K. J., Smart D., Randall A. D., Anand P. and Davis J. B. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186-90.
- Srinivasan Y., Elmer L., Davis J., Bennett V. and Angelides K. (1988) Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* **333**, 177-80.
- Sternfeld L., Krause E., Schmid A., Anderie I., Latas A., Al-Shaldi H., Kohl A., Evers K., Hofer H. W. and Schulz I. (2005) Tyrosine phosphatase PTP1B interacts with TRPV6 in vivo and plays a role in TRPV6-mediated calcium influx in HEK293 cells. *Cell Signal* **17**, 951-60.
- Stefefeld J., Jenny M., Schulthess T., Landwehr R., Engel J. and Kammerer R. A. (2000) Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol* **7**, 772-6.
- Stokes A. J., Shimoda L. M., Koblan-Huberson M., Adra C. N. and Turner H. (2004) A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J Exp Med* **200**, 137-47.

- Story G. M., Peier A. M., Reeve A. J., Eid S. R., Mosbacher J., Hricik T. R., Earley T. J., Hergarden A. C., Andersson D. A., Hwang S. W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S. and Patapoutian A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-29.
- Strubing C., Krapivinsky G., Krapivinsky L. and Clapham D. E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-55.
- Strubing C., Krapivinsky G., Krapivinsky L. and Clapham D. E. (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* **278**, 39014-9.
- Tiruppathi C., Freichel M., Vogel S. M., Paria B. C., Mehta D., Flockerzi V. and Malik A. B. (2002) Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* **91**, 70-6.
- Tobin D., Madsen D., Kahn-Kirby A., Peckol E., Moulder G., Barstead R., Maricq A. and Bargmann C. (2002) Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* **35**, 307-18.
- Tsavalier L., Shapero M. H., Morkowski S. and Laus R. (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* **61**, 3760-9.
- Tu L., Santarelli V., Sheng Z., Skach W., Pain D. and Deutsch C. (1996) Voltage-gated K⁺ channels contain multiple intersubunit association sites. *J Biol Chem* **271**, 18904-11.
- van de Graaf S. F., Chang Q., Mensenkamp A. R., Hoenderop J. G. and Bindels R. J. (2006a) Direct Interaction with Rab11a Targets the Epithelial Ca²⁺ Channels TRPV5 and TRPV6 to the Plasma Membrane. *Mol Cell Biol* **26**, 303-12.
- van de Graaf S. F., Hoenderop J. G., Gkika D., Lamers D., Prenen J., Rescher U., Gerke V., Staub O., Nilius B. and Bindels R. J. (2003) Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *Embo J* **22**, 1478-87.
- van de Graaf S. F., van der Kemp A. W., van den Berg D., van Oorschot M., Hoenderop J. G. and Bindels R. J. (2006b) Identification of BSPRY as a Novel Auxiliary Protein Inhibiting TRPV5 Activity. *J Am Soc Nephrol* **17**, 26-30.
- Vennekens R., Hoenderop J. G., Prenen J., Stuijver M., Willems P. H., Droogmans G., Nilius B. and Bindels R. J. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* **275**, 3963-9.
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V. and Nilius B. (2004a) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-54.
- Voets T., Janssens A., Prenen J., Droogmans G. and Nilius B. (2003) Mg(2+)-dependent Gating and Strong Inward Rectification of the Cation Channel TRPV6. *J Gen Physiol* **121**, 245-60.
- Voets T., Nilius B., Hoefs S., van der Kemp A. W., Droogmans G., Bindels R. J. and Hoenderop J. G. (2004b) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* **279**, 19-25.
- Wissenbach U., Bodding M., Freichel M., Flockerzi V. (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* **485**, 127-34
- Wissenbach U., Niemeyer B. A., Fixemer T., Schneidewind A., Trost C., Cavalie A., Reus K., Meese E., Bonkhoff H. and Flockerzi V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* **276**, 19461-8.

- Wissenbach U., Niemeyer B. A. and Flockerzi V. (2004) TRP channels as potential drug targets. *Biol Cell* **96**, 47-54.
- Xu X. Z., Chien F., Butler A., Salkoff L. and Montell C. (2000) TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* **26**, 647-57.
- Xu X. Z., Li H. S., Guggino W. B. and Montell C. (1997) Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* **89**, 1155-64.
- Xu X. Z., Moebius F., Gill D. L. and Montell C. (2001) Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10692-7.
- Yamaguchi H., Matsushita M., Nairn A. C. and Kuriyan J. (2001) Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell* **7**, 1047-57.
- Yellen G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35-42.
- Yuan C., Li J., Mahajan A., Poi M. J., Byeon I. J. and Tsai M. D. (2004) Solution structure of the human oncogenic protein gankyrin containing seven ankyrin repeats and analysis of its structure--function relationship. *Biochemistry* **43**, 12152-61.
- Yue L., Peng J. B., Hediger M. A. and Clapham D. E. (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**, 705-9.
- Zhang B. and Peng Z. (2000) A minimum folding unit in the ankyrin repeat protein p16(INK4). *J Mol Biol* **299**, 1121-32.
- Zhang L. and Barritt G. J. (2004) Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**, 8365-73.
- Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C. S. and Ryba N. J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293-301.
- Zhu D. and Bourguignon L. Y. (2000) Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. *J Cell Physiol* **183**, 182-95.
- Zweifel M. E., Leahy D. J., Hughson F. M. and Barrick D. (2003) Structure and stability of the ankyrin domain of the Drosophila Notch receptor. *Protein Sci* **12**, 2622-32.

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann für die Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer für den Vorsitz in der Prüfungskommission.

Bei Dr. Barbara Niemeyer bedanke ich mich für die Vermittlung ihrer weitreichenden molekularbiologischen und proteinbiochemischen Erfahrung, für Beratung und Hilfe bei der Bewältigung wissenschaftlicher Fragestellungen, für interessante Diskussionen und ermutigende Worte.

Dr. Ulrich Wissenbach danke ich für seine Hilfe bei Klonierungen und die zahlreichen anregenden Diskussionen über TRPs und weit darüber hinaus.

Für die schöne Zeit im Labor und die gute Teamarbeit bedanke ich mich bei Sabrina Ploog, Janine Pöss, Steffi Johne, Jasmin Gries, Melanie Portz, Karin Wolske, Heidi Löhr und Ute Soltek. Danke auch an Martin Simon-Thomas für die Hilfe bei technischen Problemen.

Dr. Anni Lis und Dr. Jenny Olausson danke ich für die Unterstützung im Laboralltag und ihre Freundschaft.

Danke an Christine Jung, Marcel Meissner und Thomas Aberle für viele Ratschläge und Unterstützung in Sachen Proteinbiochemie und den Spaß, den wir bei der Arbeit hatten.

Den Drs. Brigitte Held, Johannes Oberwinkler und Matthias Bödding danke ich für die Erklärung elektrophysiologischer Prinzipien.

Weiterhin möchte ich allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für die gute Zusammenarbeit danken, und dafür, dass sie während meiner Doktorarbeit ein Stück Lebensweg mit mir geteilt haben.

Ich danke auch meinem ganzen Freundeskreis, besonders Esther Maldener und Yvette Mäder, für viele aufbauende und ermunternde Gespräche.

Zudem danke ich meinen Familien Eckert (besonders Franz fürs Korrekturlesen), Erler, Hofmann und Schneider (vor allem Erika Schneider) für die Unterstützung und die vielen schönen gemeinsamen Momente.

Danke, Tom.