

**Untersuchung von TRPM3-Kationenkanälen mit Hilfe von
Knock-down- und Knock-out-Methoden**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

**Stefanie Mannebach
Saarbrücken
2008**

Tag des Kolloquiums: 15.04.08

Dekan: Prof. Uli Müller

Berichterstatter: Prof. Jörn Walter
Prof. Veit Flockerzi

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich 2.4 der Universität des Saarlandes, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. S. Philipp angefertigt. Bei ihm möchte ich mich vor allem für die vielfältige Unterstützung bedanken. Er hat mich sachkundig und richtungsweisend begleitet und mir auch in schwierigen Phasen der Arbeit immer motivierend zur Seite gestanden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Veit Flockerzi für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Jörn Walter bedanke ich mich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Marc Freichel, Frau Dr. Petra Weißgerber, Frau Stefanie Buchholz und Herrn Frank Zimmermann für die großartige Unterstützung bei der Herstellung der TRPM3-Knock-out Maus.

Ein herzlicher Dank geht auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, die immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meinen Eltern und meinem Freund Kay danken, die mich immer unterstützt haben. Obwohl ich in den letzten dreieinhalb Jahren sehr wenig Zeit für sie hatte, haben sie immer hinter mir gestanden.

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten und Größen

bp	Basenpaare
Ci	Curie
cm	Zentimeter
dpm	decays per minute (Zerfälle pro Minute)
ds	doppelsträngig
d	Tag
g	Gramm
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
mA	Milliampere
mM	Millimolar
M	Molar
nt	Nukleotid
Nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
T _m	mittlere Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent (ml/100ml)
% (w/v)	Gewichtsprozent (g/100ml)

Chemische und biochemische Verbindungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Desoxythimidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosylpyranosid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PregS	Pregnenolonsulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit Tween 10
TEMED	N, N, N, N-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat

Sonstige Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
DNase	Desoxyribonuklease
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCS	multiple Klonierungsstelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
RNase	Ribonuklease
TRP	Transient receptor potential (Transientes Rezeptorpotential)

Symbole für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin

N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Die TRP-Kanalfamilie	3
2.2	Struktur von TRP-Kanalkomplexen	4
2.3	Diversität von TRP-Proteinen	6
2.4	TRPM3 und TRPM1: Proteine bislang unbekannter biologischer Funktion.....	8
2.5	RNA-Interferenz als Methode zur Untersuchung von TRP-Proteinen	12
2.6	Gezielte Inaktivierung von Genen der TRP-Kanalproteine	14
2.7	Zielsetzung der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Chemikalien	19
3.2	Vektoren	19
3.3	Oligodesoxyribonukleotide.....	22
3.4	Antikörper	26
3.5	Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	26
3.5.1	Kultivierung von Zelllinien	26
3.5.2	Präparation und Kultivierung primärer Epithelzellen aus Plexus choroideus der Maus.....	28
3.5.3	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	29
3.6	Molekularbiologische Methoden	29
3.6.1	Kultivierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
3.6.1.1	Bakterienstämme und Medien	29
3.6.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	30
3.6.1.3	Transformation kompetenter E.coli	30
3.6.1.4	Anlage von Bakteriendauerkulturen.....	31
3.6.2	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	31
3.6.2.1	Gewinnung genomischer DNA.....	31
3.6.2.2	Analytische Schnellpräparation von Plasmid-DNA	32
3.6.2.3	Plasmidpräparation durch Anionenaustausch-Chromatografie	32
3.6.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA	33
3.6.2.5	Gewinnung von PolyA ⁺ -RNA	34
3.6.3	Analyse von Nukleinsäuren	34
3.6.3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	34
3.6.3.2	Präzipitation von Nukleinsäuren	35
3.6.3.3	Phenolextraktion von Nukleinsäuren	35
3.6.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.6.3.5	Auftrennung von Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel	36
3.6.3.6	Gelelektrophorese von Ribonukleinsäuren	36
3.6.3.7	Elektroelution	37

3.6.3.8	DNA-Sequenzierung	37
3.6.4	Amplifikation von Nucleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion	37
3.6.4.1	Reverse Transkriptase (RT)-PCR	38
3.6.4.2	Ein-Schritt-RT-PCR	39
3.6.4.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung genomischer DNA	39
3.6.4.4	Genotypisierung von Mäusen mit Hilfe der PCR	40
3.6.5	Enzymatische Modifikationen von Nucleinsäuren	41
3.6.5.1	Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	41
3.6.5.2	Phosphorylierung und Glätten von Nucleotidüberhängen von PCR-Fragmenten	41
3.6.5.3	Hybridisierung komplementärer Oligodesoxyribonukleotide	41
3.6.5.4	5'-Dephosphorylierung von DNA	41
3.6.5.5	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.6.6	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	42
3.6.7	Southernblot	43
3.6.8	Northernblot	44
3.7	Proteinchemische Methoden	45
3.7.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryontischen Zellen	45
3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
3.7.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.7.4	Westernblot	47
3.7.5	Immunocytochemische Färbung eukaryontischer Zellen	48
3.8	Methoden zur Herstellung einer transgenen Maus	48
3.8.1	Kultivierung von ES-Zellen	48
3.8.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten (Feeder-Zellen)	49
3.8.3	Inkulturnahme kryokonservierter ES-Zellen	50
3.8.4	Passage von ES-Zellen	50
3.8.5	Kryokonservierung von ES-Zellen	51
3.8.6	Elektroporation von ES-Zellen	51
3.8.7	Selektion rekombinanter ES-Zellen	51
3.8.8	Injektion rekombinanter ES-Zellen in Blastozysten	52
3.8.9	Verwendete Mauslinien	53
3.9	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mit Hilfe des ratiometrischen Calciumindikatorfarbstoffes FURA-2-AM	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Identifizierung von TRPM3 in verschiedenen Zellen und Geweben	56
4.1.1	Northernblot	56
4.1.2	Untersuchung von TRPM3- und TRPM1-Transkripten in GH3- und Ins-1-Zellen mittels RT-PCR	58
4.1.3	Klonierung der TRPM3-cDNA aus GH3 und Ins1-Zellen sowie Rattenhirn	59
4.1.4	Untersuchung von TRPM3-Proteinen in GH3- und Ins-1-Zellen	63
4.2	Ca ²⁺ -Signale in TRPM3-exprimierenden Zellen	64
4.2.1	Untersuchung des Steroid-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms durch rekombinante TRPM-Kanäle	64
4.2.2	Untersuchung von primären Epithelzellen des Plexus choroideus	65

4.2.3	Untersuchung der Ca ²⁺ -Signale in Z310- und NPE-Zellen	67
4.2.4	Untersuchung von Ca ²⁺ -Signalen in GH3- und Ins-1-Zellen.....	68
4.3	Untersuchung von Ca ²⁺ -Signalen nach Knock-down von TRPM3.....	69
4.3.1	Strategie zur Hemmung der TRPM3-Expression	70
4.3.2	Hemmung von rekombinanten TRPM3-Kanälen durch RNA-Interferenz	70
4.3.3	Hemmung der TRPM3-Expression in primären Epithelzellen aus Plexus choroideus durch RNA-Interferenz	74
4.3.4	Knock-down von TRPM3-Kanälen in GH3-Zellen durch RNA-Interferenz	75
4.3.5	Knock-down von TRPM3-Kanälen in Ins-1-Zellen durch RNA-Interferenz.....	77
4.4	Modulation zelleigener Steroid-abhängiger Ca ²⁺ -Signale in endokrinen Zellen .	78
4.4.1	Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms in GH3-Zellen durch Einschleusung von TRPM3 α 1	79
4.4.2	Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms in Ins-1-Zellen durch Einschleusung von TRPM3 α 1	81
4.4.3	Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms in GH3-Zellen durch Einschleusung von TRPM1	82
4.4.4	Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms in Ins-1-Zellen durch Einschleusung von TRPM1	84
4.5	Inaktivierung des TRPM3-Gens in der Maus.....	85
4.5.1	Konzept zur Inaktivierung des TRPM3-Gens in der Maus.....	85
4.5.1.1	Wahl des zu deletierenden Bereiches im TRPM3-Gen	86
4.5.1.2	Aufbau des Targetingkonstruktes und Strategie zur Herstellung unterschiedlicher Genotypen	86
4.5.1.3	Strategien zur Genotypisierung	90
4.5.2	Klonierung des Targetingkonstruktes	93
4.5.3	Einschleusung des Targetingkonstruktes ins TRPM3-Gen von ES-Zellen.....	95
4.5.4	Herstellung von Mäusen mit L3F2-Allel durch Blastozysteninjektion von ES- Zellen	98
4.5.5	Herstellung von Mäusen mit L1-, L2- oder L3F1-Allel durch Verpaarung von L3F2-Tieren	101
4.5.5.1	L1-Mäuse.....	101
4.5.5.2	L2-Mäuse.....	103
4.5.5.3	L3F1-Mäuse.....	104
5	Diskussion	106
5.1	TRPM3-Spleissereignisse sind hochkonserviert in Ratte, Maus und Mensch..	106
5.2	Spleissen verändert die Funktion von TRPM3-Kanälen	108
5.3	Die heterooligomere TRPM-Proteinassoziation erlaubt die Regulation des Kanals.....	111
5.4	Effizienz des TRPM3-Gentargeting	112
6	Literaturverzeichnis	115

1 Zusammenfassung

Einen wesentlichen Anteil an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration haben Kationenkanäle aus der Familie der TRP-Proteine. Vermutlich 4 TRP-Proteine bilden homo- und heterooligomere Kanalkomplexe. TRPM3 ist das zuletzt identifizierte Mitglied der TRPM-Subfamilie mit größter Homologie zu TRPM1. Das TRPM3-Gen codiert eine Vielzahl von Spleissvarianten, welche Unterschiede hinsichtlich ihrer Permeabilität für divalente Kationen und ihrer Aktivierbarkeit durch das Steroid Pregnenolonsulfat aufweisen.

Ich habe gezeigt, dass TRPM3 vor allem im Plexus choroideus, in β -Zellen und in der Hypophyse exprimiert wird. Aus Ins-1- und GH3-Zellen sowie aus dem Hirn der Ratte habe ich neben bekannten TRPM3-Varianten 9 bislang unbekannte kloniert.

FURA-2 Messungen zeigten, dass Pregnenolonsulfat in Ins-1- und GH3-Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom auslöst. Eine Hemmung von TRPM3 mit Hilfe von RNA-Interferenz ebenso wie eine Überexpression von TRPM1 und TRPM3 α 1 führte in diesen Zellen zu einer deutlichen Abnahme des Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstroms, was stark darauf hindeutet, dass TRPM3-Kanäle für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sind.

Um die biologische Funktion von TRPM3 zu untersuchen, habe ich eine TRPM3-defiziente Mauslinie hergestellt. Dabei wurde Exon 24 deletiert, da es die ionenleitende Pore des Kanals codiert. Die angewandte Strategie erlaubt zudem eine zeit- oder gewebespezifische Inaktivierung des TRPM3-Gens sowie die Identifizierung TRPM3-exprimierender Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz.

Summary

Cation channels of the TRP family play a substantial role in the regulation of the cytosolic Ca^{2+} homeostasis. Presumably, TRP channel subunits assemble into homo- or heterotetrameric channel complexes. TRPM3 is the most recent identified member of the TRPM subfamily and shows highest homology to TRPM1. The TRPM3 gene encodes a variety of splice variants. These variants differ in their permeability for divalent cations and their activation by the steroid pregnenolonesulfate.

In this work I showed that TRPM3 is strongly expressed in the choroid plexus, in pancreatic β -cells and in the pituitary gland. I cloned several variants of TRPM3 from Ins-1 cells, GH3 cells and rat brain. Nine new splice variants were identified.

Pregnenolonesulfate induces Ca^{2+} entry in GH3 and Ins-1 cells as measured with the calciumindicator dye FURA-2. Inhibition of TRPM3 using a RNA interference approach and overexpression of TRPM1 and TRPM3 α 1 led to a significant reduction of the steroid induced Ca^{2+} influx in these cells. These data strongly suggest that TRPM3 channels are responsible for the steroid induced Ca^{2+} entry in endocrine cells.

To analyze the biological functions of TRPM3 channels, I generated a TRPM3 deficient mouse line. Thereby exon 24 was deleted since it encodes the ion conducting pore of the channel. Furthermore, the applied strategy allows a time- or tissue-specific inactivation of the TRPM3 gene and in addition the identification of TRPM3 expressing cells by their green fluorescence.

2 Einleitung

2.1 Die TRP-Kanalfamilie

Durch Stimulation G-Protein gekoppelter Photorezeptoren im Komplexauge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und nachfolgender Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) gespalten und Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (InsP₃) gebildet. InsP₃ bindet an InsP₃-Rezeptor-Ionenkanäle im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und initiiert die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Dies führt zu einem ersten aber nur transienten Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Cytosol. Diesem folgt die Öffnung von Kationenkanälen in der Cytoplasmamembran, die daher auch als speicherabhängige Kationenkanäle bezeichnet werden. Extrazelluläres Ca²⁺ fließt entlang seines Konzentrationsgradienten in die Zelle und führt zu einer andauernden Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration.

Durch Funktionsuntüchtigkeit des „Transient Receptor Potential“ (TRP)-Kanalproteins ist bei der TRP-Mutante die biphasische Veränderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration gestört (Montell and Rubin, 1989). TRP-Fliegen zeigen einen nur transienten Anstieg des Membranpotentials, während die langandauernde Erhöhung des cytosolischen Calciums fehlt. Nach kurzzeitiger Wahrnehmung eines Lichtreizes sind diese Fliegen blind. Das bei dieser Fliege mutierte Gen wurde nach dem „transient receptor potential“-Phänotyp als „trp“ bezeichnet. Die funktionellen Zusammenhänge im Fliegenauge sind mittlerweile gut untersucht. Der TRP-Kationenkanal bildet zusammen mit verwandten TRP-Proteinen TRPL und TRP γ und regulatorischen und strukturgebenden Proteinen wie INAD, Proteinkinase C, Phospholipase C β , Rhodopsin und Calmodulin einen funktionellen Komplex, der die Signaltransduktion im Auge von *Drosophila* vermittelt (Montell, 2005).

Seit der Entdeckung des TRP-Ionenkanals aus *Drosophila* sind 28 homologe Proteine in Säugern identifiziert worden. Sie werden in sieben Familien eingeteilt (Abb. 1). Mit bis zu 40% Aminosäuresequenzidentität sind dem *Drosophila* TRP-Protein die sieben Mitglieder der TRPC (classical, canonical)-Familie am nächsten verwandt. Der Namensgeber der sechs Mitglieder der TRPV-Familie ist der Vanilloid-Rezeptor TRPV1. Dieser Kanal wird durch Vanilloide wie z.B. Capsaicin aktiviert. Die Proteine der TRPM-Familie werden nach dem ursprünglich als Melastatin bezeichneten TRPM1 benannt. Neben diesen drei Subfamilien werden die entfernter verwandten TRPP-Proteine (Polycystine, TRPP2, TRPP3, TRPP5), die TRPML-Proteine (Mucolipine, TRPML1, TRPML2, TRPML3) sowie TRPA und TRPN (NOMP) zur großen Familie der TRP-Proteine gerechnet (Montell, 2005; Clapham, 2003).

TRPN-Proteine wurden bislang jedoch ausschließlich in Zebrafisch, *Caenorhabditis elegans* und *Ciona intestinalis* identifiziert.

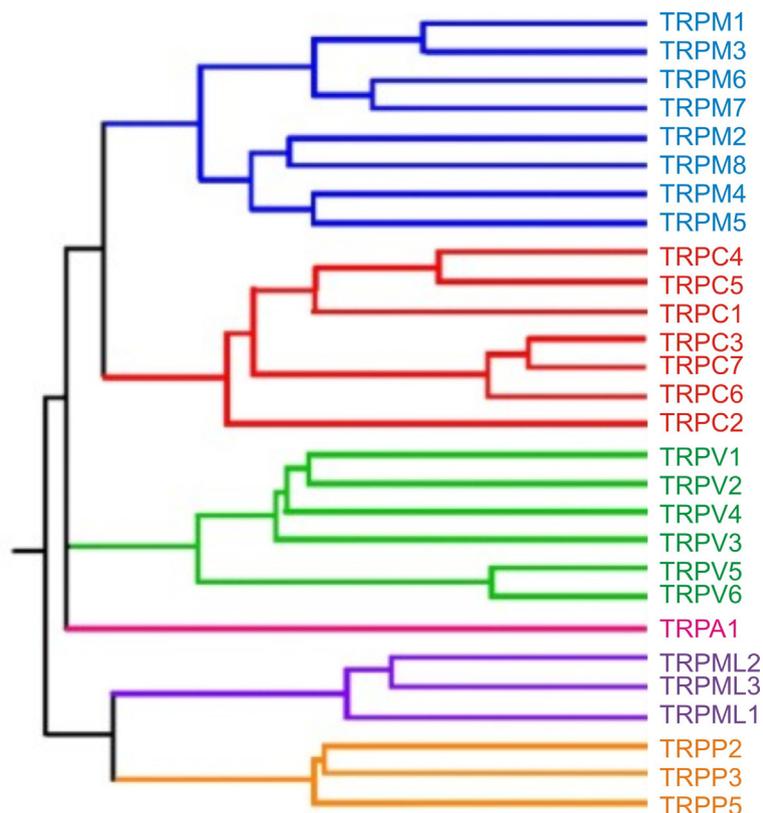


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanalproteine aus Säugern (modifiziert nach Gudermann und Flockerzi, 2005)

2.2 Struktur von TRP-Kanalkomplexen

Die Analyse der von der cDNA abgeleiteten TRP-Aminosäuresequenz ermöglicht eine Voraussage der Sekundärstruktur von TRP-Proteinen (Abb. 2). Nach dem gegenwärtigen Modell weisen alle TRP-Proteine sechs amphiphile, α -helikale Sequenzabschnitte auf, die als Transmembrandomänen die Cytoplasmamembran durchqueren. Amino- und Carboxytermini liegen im Cytosol der Zelle, was für rekombinante TRPC3-Proteine auch experimentell bestätigt werden konnte (Vannier et al., 1999). Ähnlich wie bei spannungsabhängigen Kalium- oder Calciumkanälen wird die ionenleitende Pore des Kanals vermutlich von Aminosäuren gebildet, die zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne des Proteins liegen (Abb. 2). Durch gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren von TRPV5 und TRPV6 in dieser Domäne sowie durch Analyse unterschiedlicher TRPM3-Spleissvarianten, die sich nur in diesem Bereich unterscheiden, konnten solche Sequenzabschnitte identifiziert werden, welche die Selektivität der Kanäle wesentlich beeinflussen und daher die ionenleitende Pore des Kanals bilden (Voets et al., 2004; Oberwinkler et al., 2005). Ein gemeinsames strukturelles Merkmal von TRPC- und TRPM-Proteinen ist die 25 Aminosäuren umfassende TRP-Domäne (Abb. 2). Die Bedeutung

dieser Domäne ist bislang unklar, jedoch legen jüngere Untersuchungen eine generelle Bedeutung der TRP-Domäne als Interaktionsstelle mit dem Phospholipid PIP₂ nahe (Rohacs et al., 2005).

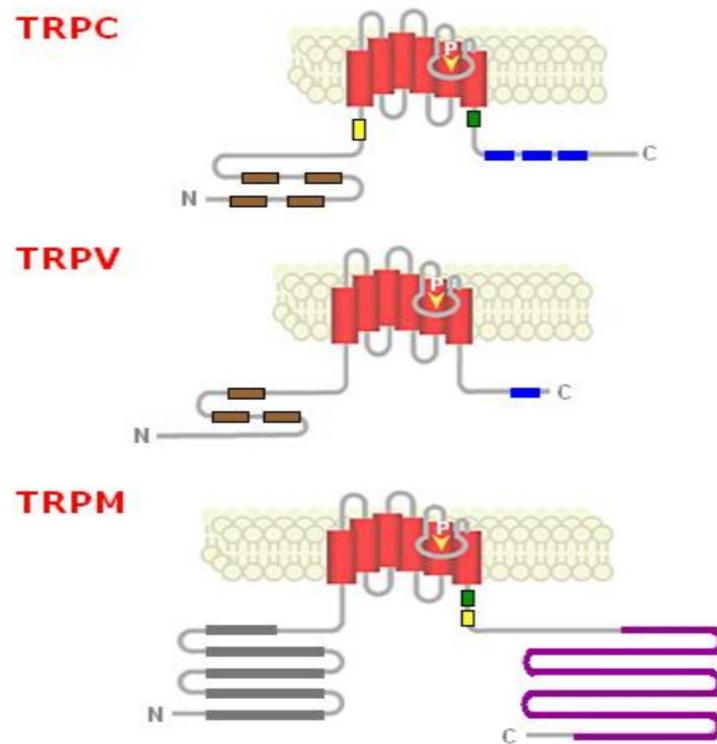


Abb. 2: Topologie von Proteinen der TRPC-, TRPV- und TRPM-Subfamilie

Hervorgehoben dargestellt sind: Ankyrin-Repeats (braun), Coiled-Coil-Region (gelb), TRP-Domäne (grün), Calmodulin-Bindungsstellen (blau), enzymatische Domäne (violett), TRPM-homologe Regionen (grau), die ionenleitende Pore (P).

Die Aminotermini von TRPC- und TRPV-Kanälen enthalten mehrere „Ankyrin-Repeats“. Diese Sequenzmotive aus 33 Aminosäuren fungieren als Erkennungsstellen intermolekularer Protein-Protein-Wechselwirkungen (Mohler et al., 2002). Für TRPV6-Proteine konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen wesentlich für die homomere Assemblierung von TRPV6-Kanaluntereinheiten sind (Erlor et al., 2004). Solche Ankyrin-Repeats fehlen in TRPM-Kanälen. Für Mitglieder dieser Subfamilie, insbesondere für TRPM8, konnte hingegen gezeigt werden, dass unmittelbar carboxyterminal der TRP-Domäne eine „Coiled-Coil-Region“ für die Interaktion der Proteine verantwortlich ist (Erlor et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Eine besondere Domäne, die anderen Mitgliedern der TRPM-Subfamilie fehlt, weisen die Kanäle TRPM2, TRPM6 und TRPM7 auf: Sie besitzen in ihrem Carboxyterminus einen Bereich mit enzymatischer Aktivität und diese Kanäle werden deshalb auch als „Chanzymes“ bezeichnet (Cahalan, 2001). Während die Enzymdomäne von TRPM2 als Nukleosid-Diphosphat-Pyrophosphatase (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001) fungiert, zeigen die

Carboxytermini von TRPM6 und TRPM7 α -Kinase-Aktivität (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001).

Immunpräzipitationsexperimente, Immunlokalisationsanalysen und Bindungsstudien zeigten, dass im Komplexauge der Fliege TRP-Moleküle Teile eines supramolekularen Signalkomplexes sind (Montell, 1999). Ähnliche Untersuchungen an TRP-Proteinen aus Säugern weisen darauf hin, dass auch diese Proteine oligomere (tetramere) Kanalstrukturen bilden, welche mit weiteren akzessorischen Untereinheiten einen Kanalkomplex bilden (Abb. 3; Jahnel et al., 2001; Kedei et al., 2001; Strubing et al., 2001; Hofmann et al., 2002; Goel et al., 2002; Schaefer et al., 2002; Hoenderop et al., 2003b; Hellwig et al., 2005; Chubanov et al., 2004).

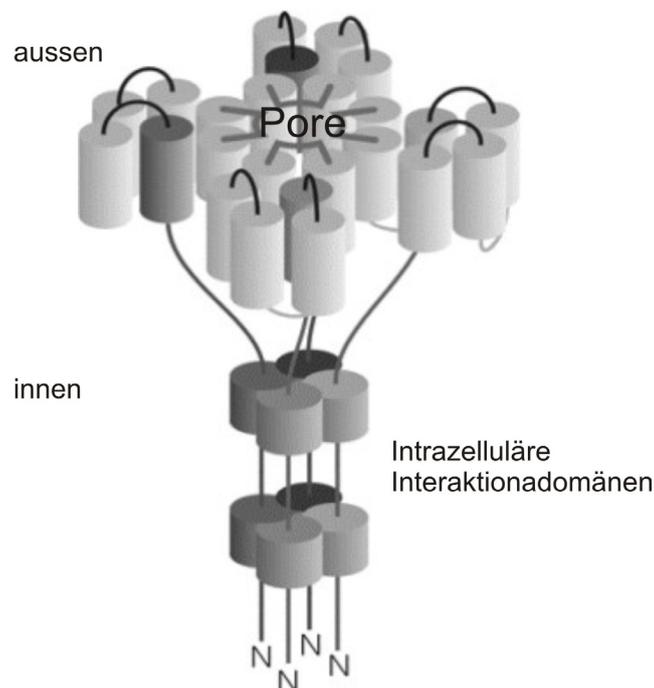


Abb. 3: Modell eines tetrameren TRP-Kanalkomplexes (modifiziert nach Erler et al., 2004)

In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigen dysfunktionelle Mutanten von TRPV6 (Erler et al., 2004), TRPC3 (Groschner et al., 1998) sowie TRPM1 (Xu et al., 2001b) dominant-negative Effekte auf die vom Wildtyp-Protein vermittelten Calciumsignale.

2.3 Diversität von TRP-Proteinen

Anders als bei vielen Ionenkanälen werden TRP-Kanäle nicht aufgrund ihrer Liganden, ihrer biophysikalischen Eigenschaften oder ihrer biologischen Funktion klassifiziert, sondern ausschließlich aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz. Dabei beträgt die Homologie einzelner Mitglieder unterschiedlicher Subfamilien weniger als 20%. Entsprechend heterogen sind die Eigenschaften von TRP-Proteinen aus Säugern (Tab. 1; Montell, 2005).

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

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

Bislang sind nur wenige spezifische Agonisten oder Antagonisten von TRP-Proteinen bekannt. Die besten Liganden sind gegenwärtig für TRPV1 und TRPM8 verfügbar (Flockerzi, 2007). Beide Kanäle sind Prototypen der sogenannten „Thermo-TRP“-Kanäle, die durch Hitze- bzw. Kältestimuli aktiviert werden und die vermutlich an der Schmerzwahrnehmung beteiligt sind (Tab. 1).

Die Selektivität einzelner TRP-Kanäle für bestimmte Kationen variiert beträchtlich (Tab. 1). So bilden TRPV5- und TRPV6-Proteine Ca^{2+} -selektive Kanäle in den Epithelien von Niere und Darm (Voets and Nilius, 2003). Demgegenüber lassen TRPM4- und TRPM5-Kanäle ausschließlich monovalente Kationen in das Zellinnere, werden aber durch intrazelluläres Calcium aktiviert (Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2003; Prawitt et al., 2003). Nach Stimulation von rezeptorgesteuerten, calciumpermeablen Kanälen führt so vermutlich die Aktivität von TRPM4 zur Membrandepolarisation und zur Aktivierung potentialabhängiger Folgeprozesse (Launay et al., 2002; Launay et al., 2004), die z.B. in Mastzellen zur Degranulation und Freisetzung von Histamin führen (Vennekens et al., 2007).

Das Fehlen spezifischer Liganden erschwerte die Aufklärung biologischer Funktionen von TRP-Proteinen bislang beträchtlich. Alternative Vorgehensweisen, insbesondere die Blockade der Genexpression durch RNA-Interferenz (vgl. 2.5), vor allem aber das gezielte Ausschalten von TRP-Genen im Genom der Maus (Knock-out), ermöglichten jedoch in einigen Fällen die Analyse der physiologischen oder pathophysiologischen Bedeutung von TRP-Kanälen (Tab. 2, S. 16). So konnte z.B. die Bedeutung von TRPC4-Proteinen bei der endothelabhängigen Vasorelaxation (Freichel et al., 2001; Tirupathi et al., 2002) und der Einfluss von TRPC6-Proteinen auf die Kontraktilität des Gefäßmuskels (Dietrich et al., 2005) durch Untersuchungen an Knock-out Tieren beschrieben werden.

Schließlich trug auch die Identifizierung von Mutationen in TRP-Genen und deren Kopplung an Erbkrankheiten zum Verständnis der biologischen Funktionen von TRP-Proteinen bei (Tab. 1, 2). So werden z.B. Veränderungen im TRPM6-Gen für eine autosomal-rezessive Form familiärer Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie verantwortlich gemacht (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002) und die autosomal-dominante, polyzystische Nierenerkrankung ist in vielen Patienten auf einen Defekt im TRPP2-Gen zurückzuführen (Montell, 2005; Hsu et al., 2007).

2.4 TRPM3 und TRPM1: Proteine bislang unbekannter biologischer Funktion

Erste Hinweise für eine TRPM3-Expression ergaben Analysen von „expressed sequence tag“ (EST)-Datenbanken (Wistow et al., 2002). Dabei wurden cDNA-Klone identifiziert, die aus pigmentiertem und nichtpigmentiertem Epithel der Retina stammen. RT-PCR-Experimente weisen auf die Gegenwart von TRPM3-Transkripten im Endothel menschlicher

Pulmonararterien (Fantozzi et al., 2003), in Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y (Bollimuntha et al., 2005) sowie in primären kultivierten Trigeminalneuronen (Nealen et al., 2003) hin. Weiterhin zeigen solche Untersuchungen die Expression von TRPM3-mRNA in der Leber, im Pankreas, in den Eierstöcken, im Rückenmark, im Hoden und im Gehirn (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003). Northern-Analysen unterstützen weitestgehend diese Ergebnisse (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Sie zeigen eine dominante Expression von TRPM3 im ZNS. Eine genauere Analyse der TRPM3-Expression durch *in situ*-Hybridisierungs-Experimente ergab schließlich, dass TRPM3 insbesondere im Plexus choroideus exprimiert wird (Oberwinkler et al., 2005). Schließlich scheint es speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der TRPM3-Expression zu geben: Während TRPM3-Transkripte in der menschlichen Niere nachgewiesen werden konnten (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003), wird TRPM3 in der Niere der Maus vermutlich nicht exprimiert (Grimm et al., 2005; Oberwinkler et al., 2005).

Die TRPM3-Gene von Maus, Ratte und Mensch sind hoch konserviert. Das menschliche Gen ist auf Chromosom 9q.21.11 lokalisiert und enthält das längste Intron auf diesem Chromosom (Humphray et al., 2004). In der Maus liegt das TRPM3-Gen auf Chromosom 19b und umspannt mehr als 850 kb (Abb. 4 A; Oberwinkler and Philipp, 2007). Es besteht aus 28 Exons. Das TRPM3-Gen codiert eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten, die durch alternatives Spleissen ihrer Transkripte entstehen (Abb. 4 B, C). In der Maus wurden 5 unterschiedliche Varianten identifiziert (mTRPM3 α 1- α 5), die zwischen 1699 und 1721 Aminosäuren lang sind (Oberwinkler et al., 2005). In diesen Varianten werden die ersten von Exon 1 codierten 61 Aminosäuren mit den von Exon 3 codierten Aminosäuren durch alternatives Spleissen fusioniert. Diesen Varianten fehlt die Sequenzinformation von Exon 2. Dieses Exon codiert jedoch den Aminoterminus weiterer TRPM3-Spleissvarianten, die aus Plexus choroideus der Maus kloniert und als mTRPM3 β 1-9 bezeichnet werden (Lis, 2005). Eine ähnliche Variante aus Mensch hTRPM3₁₃₂₅ trägt einen zu diesen β -Varianten homologen Aminoterminus. Sie ist jedoch carboxyterminal um 350 Aminosäuren verkürzt (Abb. 4 C; Grimm et al., 2005). Schließlich wurden aus menschlicher Niere sechs Varianten von TRPM3 amplifiziert (hTRPM3a-f), deren Aminotermini im Vergleich zu den α -Varianten aus Maus um 155 Aminosäuren verkürzt sind (Lee et al., 2003). Ihr Startcodon wurde in Exon 4 prognostiziert, jedoch ist unklar, inwiefern auch im Mensch verlängerte Varianten mit einem Aminoterminus ähnlich mTRPM3 α 1- α 5 exprimiert werden. Sowohl im Menschen als auch in der Maus wird die Variabilität der vom TRPM3-Gen codierten Proteine durch alternatives Spleissen von 4 internen Exons 8, 15, 17 und 24 zusätzlich erhöht.

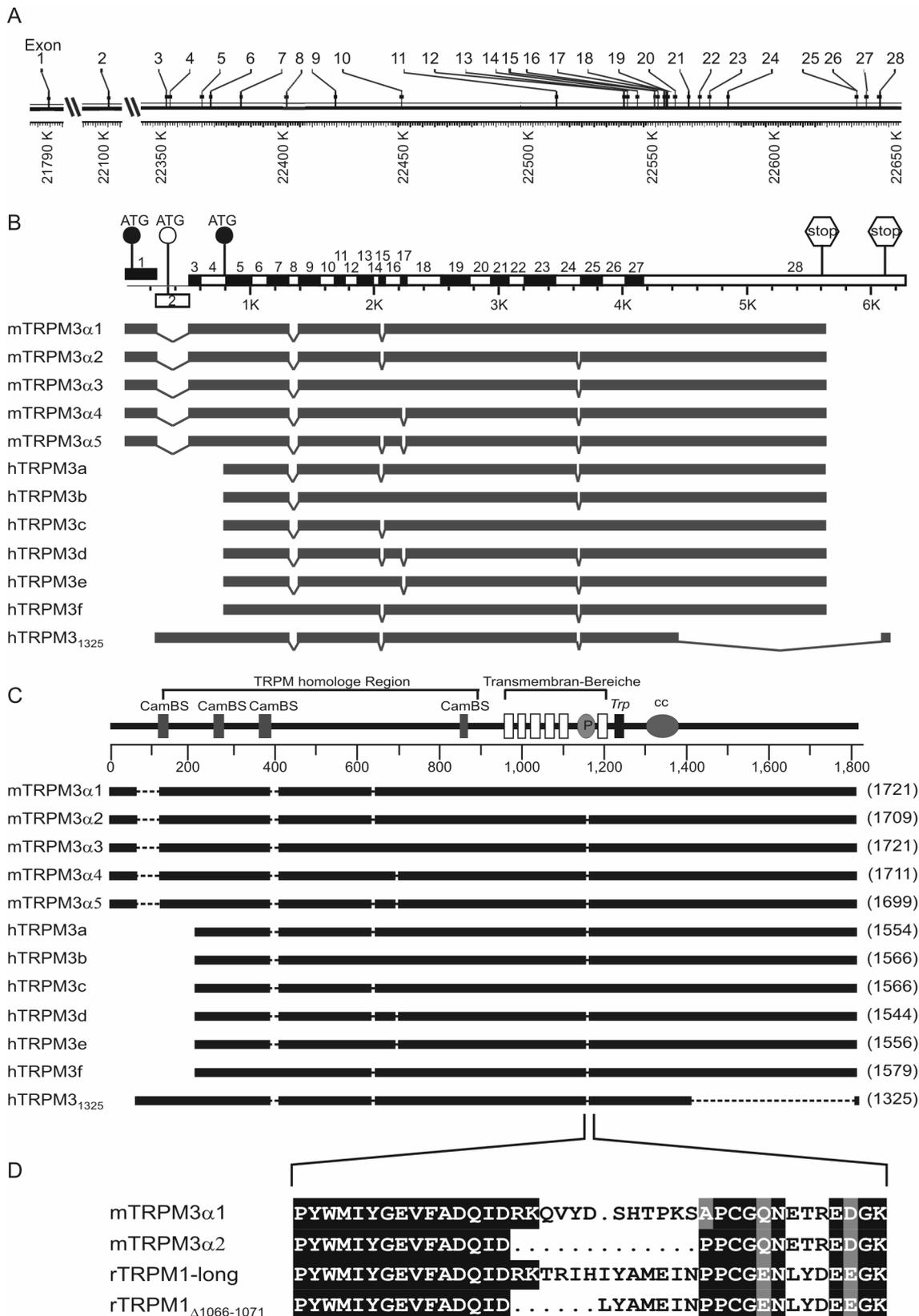


Abb. 4: (adaptiert nach Oberwinkler und Philipp, 2007) **A** Genomische Organisation des TRPM3-Gens der Maus auf Chromosom 19b. Exons sind durch *Zahlen* gekennzeichnet. **B** Struktur identifizierter TRPM3-Transkripte. Transkripte sind als *graue Balken* gezeigt und relativ zu ihrer Größe skaliert (*oberer Balken*), Exons 1-28 sind nummeriert. Start-Codons (ATG) in Exon 1, 2 und 4 und Stopcodons (Stop) in Exon 28 sind angezeigt. **C** Schematische Darstellung der TRPM3-Varianten (*schwarze Balken*), die durch die Transkripte in **B** codiert werden. Der *obere Balken* zeigt eine lineare Darstellung der generellen Organisation der TRPM3-Domänen. Putative Calmodulin-Bindungsstellen

(*CamBS*), die TRPM homologe Region, die Transmembranbereiche inklusive der Kanalpore (*P*), die TRP-Domäne (*TRP*) und eine Coiled-Coil-Region (*cc*) sind angezeigt. Die Varianten (*schwarze Balken*) sind relativ zu ihrer Größe skaliert und die Zahl der Aminosäuren steht in Klammern. Interne Protein-Domänen, die durch alternatives Spleissen entfernt wurden, werden als gepunktete Linie gezeigt. **D** Porenregionen von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 verglichen mit den korrespondierenden Sequenzen von TRPM1-Varianten (Lis et al., 2005). Identische Aminosäuren sind als *schwarze*, konservierte als *graue* Kästchen dargestellt.

TRPM3-Proteine bilden nach Überexpression in HEK293-Zellen ionenleitende Kanalstrukturen in der Plasmamembran (Oberwinkler and Philipp, 2007). Funktionelle Untersuchungen rekombinanter TRPM3-Kanäle gibt es für mTRPM3 α 1 (Oberwinkler et al., 2005), mTRPM3 α 2 (Oberwinkler et al., 2005), hTRPM3a (Lee et al., 2003) und hTRPM3₁₂₃₅ (Grimm et al., 2003; Grimm et al., 2005). Dabei zeigen übereinstimmend alle Varianten eine konstitutive Kanalaktivität, jedoch werden unterschiedliche Aktivierungsmechanismen vorgeschlagen. In FURA-2 Experimenten wurde in hTRPM3a-exprimierenden HEK293-Zellen ein verstärkter Calciumeinstrom nach passiver Speicherentleerung mit Thapsigargin gezeigt (Lee et al., 2003). Daher tragen hTRPM3a-Proteine aus Mensch möglicherweise zum speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom bei. Darüber hinaus wurde eine Verstärkung hTRPM3₁₃₂₅-abhängiger Ionenströme in Gegenwart hypotoner extrazellulärer Lösungen beschrieben (Grimm et al., 2003) und eine Aktivierung von hTRPM3₁₃₂₅-Kanälen durch D-Erythro-Sphingosin (SPH) vorgeschlagen (Grimm et al., 2005). Jüngste elektrophysiologische Experimente zeigen schließlich, dass mTRPM3 α 2-Kanäle aus Maus durch Steroide, insbesondere Pregnenolonsulfat, aktiviert werden können (Wagner et al., 2007a). Diesem Neurosteroid wird auch eine Rolle bei der Modulation von GABA- und NMDA-Rezeptoren zugeschrieben (Baulieu, 1998; Gibbs et al., 2006).

TRPM3-Varianten zeigen wesentliche Unterschiede im Hinblick auf ihre Selektivität für divalente Kationen. Patch-clamp-Experimente und FURA-2-Messungen zeigten, dass mTRPM3 α 1-Kanäle kaum durchlässig für divalente Kationen sind, sondern im Wesentlichen Na⁺-Ionen in die Zelle einströmen lassen. Dem gegenüber sind mTRPM3 α 2-Kanäle permeabel für divalente Kationen und lassen einen Ca²⁺-Einstrom von außen in die Zelle zu (Oberwinkler et al., 2005). Zudem werden TRPM3 α 2-Kanäle durch monovalente Kationen wie Na⁺ in ihrer Aktivität gehemmt: In Abwesenheit monovalenter Kationen im Extrazellulärraum ist der Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle deutlich größer. Die Variante mTRPM3 α 1 unterscheidet sich von mTRPM3 α 2 nur durch die Gegenwart von 12 zusätzlichen Aminosäuren und dem Austausch eines Alanin- gegen einen Prolinrest (Abb. 4 D) in einer Region zwischen der putativen Transmembrandomäne 5 und 6 (Abb. 4 C). Offensichtlich liegt hier die porenbildende Domäne des Kanals. Die Daten zeigen, dass durch alternatives Spleissen die Selektivität von TRPM3-Kanälen drastisch verändert wird (Oberwinkler et al., 2005).

Auch von TRPM1, dem nächsten Verwandten von TRPM3 innerhalb der TRP-Proteinfamilie (Abb. 1), sind Spleissvarianten TRPM1_{long} und TRPM1_{Δ1066-1071} bekannt, die sich - ebenso wie mTRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 - an korrespondierender Stelle nur um wenige Aminosäuren unterscheiden (Abb. 4 D; Lis et al., 2005). TRPM1 wurde bereits 1998 als erstes Mitglied der inzwischen acht Mitglieder umfassenden TRPM-Subfamilie in Melanomzellen identifiziert und zunächst als Melastatin (MLSN) bezeichnet (Duncan et al., 1998). Sowohl *in vitro* als auch in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPM1 umgekehrt proportional mit dem metastatischen Potential von Melanomen korreliert (Duncan et al., 1998). Die ursprüngliche Idee TRPM1, könnte als Tumorsuppressorprotein fungieren, konnte bislang nicht verifiziert werden; jedoch legen verschiedene Studien nahe, dass die Häufigkeit von TRPM1-mRNA als prognostischer Marker der Pathogenese von Melanompatienten dienen könnte (Deeds et al., 2000; Duncan et al., 2001; Miller et al., 2004). Neben seinem Vorkommen in Melanozyten der Haut, wird TRPM1 im Auge und hier auch in der Retina exprimiert (Lis et al., 2005). Hier könnte es mit TRPM3-Proteinen gemeinsam in einer einzelnen Zelle vorkommen. Immunpräzipitations-Experimente und Analysen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers zeigten, dass rekombinante TRPM1- und TRPM3-Proteine miteinander in direkte molekulare Wechselwirkung treten können (Philipp et al., 2006). Möglicherweise bilden TRPM1- und TRPM3-Proteine gemeinsam in Zellen der Retina heteromultimere Kanalkomplexe.

Überraschend ist, dass im Unterschied zu anderen, später identifizierten TRPM-Kanalproteinen bislang keine biophysikalische Charakterisierung TRPM1-abhängiger Ionenströme vorliegt. Lediglich einzelne FURA-2-Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beschreiben einen TRPM1-abhängigen Ca²⁺-Einstrom nach Überexpression der TRPM1-cDNA (Xu et al., 2001b). Dabei zeigte die Coexpression einer verkürzten TRPM1-Variante einen dominant-negativen Effekt auf den durch die lange Variante MLSN-L vermittelten Ca²⁺-Einstrom (Xu et al., 2001b).

2.5 RNA-Interferenz als Methode zur Untersuchung von TRP-Proteinen

Eine attraktive Alternative zur Untersuchung der Funktion und Bedeutung von TRP-Proteinen stellt die sequenzspezifische Hemmung der Synthese zelleigener TRP-Proteine dar. Dabei wird im Unterschied zur heterologen Überexpression die Expression bereits in der Zelle vorhandener TRP-Proteine durch Blockade der mRNA z.B. durch Antisense-RNA unterdrückt. Einen großen Fortschritt brachte die Entdeckung sogenannter *short interfering RNAs* (siRNAs), die eine effektive und gezielte Hemmung der Translation bewirken, ohne dabei eine Interferon-Antwort zu aktivieren, die für die oben beschriebene Methode begleitend beobachtet wurde (Elbashir et al., 2001).

Kurze doppelsträngige RNA-Moleküle kommen natürlicherweise in der Zelle vor und spielen z.B. eine Rolle bei der Hemmung von Transposons oder auch viraler DNA. Der RNA-Interferenz (RNAi)-Signalweg wurde erstmalig in *Caenorhabditis elegans* beschrieben, als nach Injektion von doppelsträngiger RNA eine sequenzspezifische RNA-Degradation beobachtet wurde (Lee et al., 1993). Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass der hemmende Effekt durch doppelsträngige 21-25 bp lange RNA-Moleküle, *small interfering RNAs* (siRNA) vermittelt wird (Zamore et al., 2000), die in der Zelle durch Dicer, eine Ribonuklease Typ III, hergestellt werden (Abb. 5, Bernstein et al., 2001).

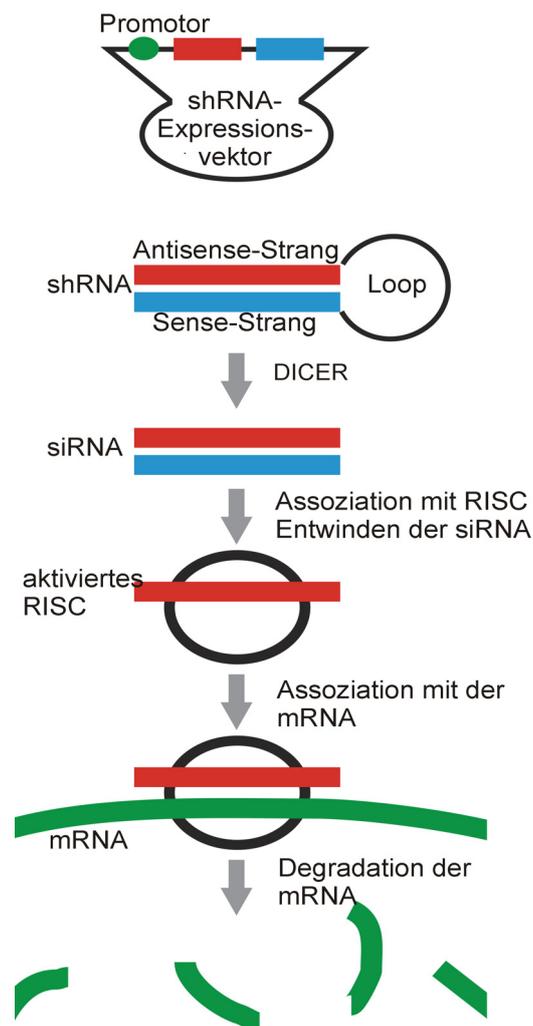


Abb. 5: Prinzip der Vektor-gestützten RNA-Interferenz

Ein Vektor exprimiert unter der Kontrolle eines Pol III-Promotors eine shRNA, die durch das zelleigene DICER-Protein zur siRNA prozessiert wird. Der RISC-Enzym-Komplex macht die siRNA einzelsträngig und bindet über die komplementären Sequenzen an die Ziel-mRNA, die daraufhin degradiert wird.

Short interfering RNAs binden an den *RNA induced silencing complex* (RISC). Dadurch kann der RISC-Komplex komplementäre Ziel-mRNA binden, die durch die RNase Aktivität des Argonauten-Proteins im Kern des Komplexes degradiert wird (Abb. 5; Liu et al., 2004).

Eine Alternative zu synthetisch hergestellten siRNA-Molekülen stellen RNA-Interferenz-Vektoren dar, welche nach Einbringen in die Zellen unter der Kontrolle des Promotors der DNA-abhängigen RNA-Polymerase III eine *short hairpin* RNA (shRNA) exprimieren (Abb. 5). Vorteil der shRNA-Vektoren gegenüber siRNA ist neben dem geringeren Kostenaufwand und der leichteren Handhabung eine stabilere und längeranhaltende Hemmung der Proteinneubildung, da die shRNA in der Zelle exprimiert und stetig nachgeliefert wird. Die Struktur solcher shRNAs wurde von Vorläufern einer weiteren Klasse von natürlich vorkommenden siRNAs, den mikroRNAs (miRNA) abgeleitet (Yi et al., 2003; Pei and Tuschl, 2006).

Sense- und Antisense-Strang der Zielsequenz sind durch eine nicht hybridisierende Kette von elf Nukleotiden verbunden, die eine Haarnadelstruktur ausbilden. Nach Prozessierung durch den DICER-Enzymkomplex entsteht in der Zelle aus einer solchen shRNA eine siRNA, die dann dem RNA-Interferenz-Mechanismus folgt (Abb. 5).

RNA-Interferenz wurde in jüngster Vergangenheit erfolgreich zur Untersuchung von TRP-Proteinen eingesetzt: Durch Knock-down von TRPV1 wurde die Schmerzempfindlichkeit von Ratten gesenkt (Christoph et al., 2006), und nach Hemmung von TRPM2-Kanälen in Langerhans-Inseln wurde eine verminderte Insulinsekretion beobachtet (Togashi et al., 2006). Die Inhibition von TRPM7 in kultivierten Neuronen zeigte eine Beteiligung des Kanals am anoxischen Zelltod (Aarts et al., 2003) und für TRPM8-Proteine wurde eine Funktion als Ca^{2+} -freisetzender Kanal im Endoplasmatischen Retikulum postuliert (Thebault et al., 2005). Schließlich wurde für TRPA1 - in Übereinstimmung mit seiner Lokalisation auf der Spitze von Haarzellen im Innenohr - eine funktionelle Bedeutung für die audielle Signaltransduktion im Innenohr angenommen (Corey et al., 2004). Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen von Mäusen, in welchen das TRPA1-Gen gezielt im Genom zerstört wurde (Knock-out): Diese Mäuse zeigen ein normales Hörvermögen (Kwan et al., 2006).

2.6 Gezielte Inaktivierung von Genen der TRP-Kanalproteine

Knock-out-Mausmodelle haben in der Vergangenheit wesentlich zum Verständnis der biologischen Funktion von TRP-Kanälen beigetragen (Flockerzi, 2007; Freichel and Flockerzi, 2007). Tabelle 2 zeigt, dass jedoch bislang nur für 14 der 28 TRP-Gene Mausmodelle zur Verfügung stehen.

Tab. 2: Identifizierung biologischer Funktionen von TRP-Kationenkanälen mit Hilfe von Knock-out-Mausmodellen (adaptiert nach Flockerzi, 2007; Freichel and Flockerzi, 2007)

Gen	Deletierte Region	Phänotyp	Referenz
TRPC2	Exon 6-11 Exon 8-11	Gestörte Pheromonrezeption, verändertes Sexualverhalten	Leybold et al., 2002 Stowers et al., 2002
TRPC3	transgen	Calcineurin abhängige kardiale Hypertrophie	Nakayama et al., 2006
TRPC4	Exon 6	Veränderte endotheliale Vasorelaxation	Freichel et al., 2004; Tiruppathi et al., 2002
TRPC6	Exon 7	Verstärkte Kontraktion der Tracheen- und Gefässringe induziert durch Agonisten und abhängig von der glatten Muskulatur, erhöhter Blutdruck	Dietrich et al., 2005
TRPV1	Exon 13 Exon 10+11	Verminderte Sensitivität für Vanilloide und schmerzhafte Wärme, veränderte thermale Hyperalgesie nach Gewebe Reizung	Caterina et al., 2000; Birder et al., 2002; Davis et al., 2000
TRPV2	transgen	Kardiomyopathie	Iwata et al., 2003
TRPV3	Exon 14+15	Veränderte Temperaturwahrnehmung bei schmerzhafter und nicht schmerzhafter Hitze	Moqrich et al., 2005
TRPV4	Exon 4	Reduzierte Sensitivität für Druck Veränderte osmotische Wahrnehmung Veränderte Temperaturempfindlichkeit ohne Verletzungen Veränderte Temperaturempfindlichkeit bei Verletzungen Verlust des Hörvermögens mit zunehmendem Alter	Suzuki et al., 2003 Mizuno et al., 2003 Lee et al., 2005 Todaka et al., 2004 Tabuchi et al., 2005
	Exon 12	Verlust der normalen Antwort auf Veränderungen der Osmolarität	Liedtke and Friedman, 2003
TRPV5	Exon 13	Verminderte Ca ²⁺ -Reabsorption/Knochendichte, Zerstörte Resorption durch Osteoclasten	Hoenderop et al., 2003a van der Eerden et al., 2005
TRPV6	Exon 7-9	Verminderte Ca ²⁺ -Reabsorption/Knochendichte, verringerte Fertilität, Alopecie und Dermatitis	Bianco et al., 2007
TRPM4	Exon 15+16	Verstärkter IgE vermittelter Ca ²⁺ -Einstrom in Mastzellen	Vennekens et al., 2007
TRPM5	Exon 15-19	Zerstörter Geschmackssinn (bitter, süß und umami)	Talavera et al., 2005; Damak et al., 2006
	Promotor & Exon 1-4	Veränderter Geschmackssinn (bitter, süß, umami)	Damak et al., 2006
TRPA1	Exon 23	Aktivierung von primären afferenten Nozizeptoren durch Senföl und Knoblauch gestört, normale Kältewahrnehmung, normales Hörvermögen	Bautista et al., 2006
	Exon 21-25	Veränderte Antwort auf Senföl, Kälte (0°C) und mechanische Stimulation, keine veränderte Haarzelltransduktion	Kwan et al., 2006
TRPP2	Exon 1	Polyzystische Niere und Leberschädigung	Wu et al., 1998; Wu et al., 2000
	Exon 1	Polyzystische Niere und Leberschädigung Gestörte bilaterale Entwicklung	Pennekamp et al., 2002

Durch gezielte homologe Rekombination wird ein chromosomaler Abschnitt durch eine veränderte Sequenz ersetzt. Dabei kann es zum Verlust der Genfunktion des Ziel-Gens kommen (Knock-out, „loss of function“ Phänotyp). Umgekehrt kann es aber auch zu einem Hinzugewinn (Knock-in, „gain of function“ Phänotyp) einer Genfunktion kommen, beispielsweise wenn ein Reporter gen ins Genom eingeschleust wird.

Die Strategie einer konditionierten Inaktivierung hat zum Ziel, diese Inaktivierung des Gens zeitlich oder gewebespezifisch zu steuern. Es werden gezielt Erkennungssequenzen für Rekombinasen ins Genom eingefügt, mit deren Hilfe man chromosomale Bereiche ausschneiden kann. Die gängigsten verwendeten Rekombinasen sind die Cre-(causes recombination in P1) und die Flp-Rekombinase, die zur Familie der sequenzspezifischen Integrasen gehören (Sauer and Henderson, 1989; Buchholz et al., 1998; Meyers et al., 1998). Die Cre-Rekombinase katalysiert eine Rekombination zwischen zwei 34 bp langen Erkennungssequenzen, den *locus of recombination* in P1 (loxP)-Sequenzen, die Flp-Rekombinase zwischen den *FLP recognition target* (FRT)-Sequenzen. Mäuse, welche diese Erkennungssequenzen im Genom tragen, werden mit Mäusen verpaart, welche die Rekombinase unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimieren. Auf diese Weise findet eine Rekombination in einem bestimmten Zelltyp oder Gewebe statt. Eine zeitliche Konditionierung des Knock-outs kann durch eine Cre-Rekombinase erreicht werden, an die eine mutierte Östrogen-Bindestelle fusioniert ist (Danielian et al., 1998; Kellendonk et al., 1999). Erst nach Gabe von Tamoxifen wird die Rekombinase aktiviert und katalytisch wirksam.

Damit der gesamte Organismus von der genomischen Veränderung betroffen ist, wird ein sogenanntes „Gentargeting“ von embryonalen Stammzellen (ES) der Maus durchgeführt (Abb. 6 A). Trotz der vergleichsweise kurzen Generationsdauer der Maus, dauert die Herstellung einer Knock-out Maus ca. zwei Jahre (Abb. 6 B).

Embryonale Stammzellen stammen aus der Blastozyste (Tag 3,5) und behalten auch nach Expansion ihre Fähigkeit, in jeden Zelltyp zu differenzieren. Bedingt durch ihre Herkunft aus dem Epiblasten können sie aber nicht zum extraembryonalen Endoderm und nicht zum Trophoblast beitragen (Beddington and Robertson, 1989). Sie sind also pluripotent, nicht jedoch totipotent. Damit die Stammzellen auch in Kultur ihre Pluripotenz behalten, werden sie mit embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen) kokultiviert. Feeder-Zellen sezernieren Leukemia Inhibitory Factor (LIF), der eine Differenzierung der ES-Zellen hemmt (Williams et al., 1988).

Die Effizienz der homologen Rekombination ist gering: nur in jeder tausendsten Zelle findet eine homologe Rekombination statt (Thomas et al., 1986). Deswegen ist es sinnvoll, die gewünschten Zellen zu selektieren (Abb. 6). Bei der Positivselektion wird z.B. ein Neomycinresistenz-Gen ins Genom inseriert. Behandelt man nun die Zellen mit dem Antibiotikum Neomycin, überleben nur solche Zellen, in welchen eine Rekombination stattgefunden hat (Thomas et al., 1986). Zusätzlich kann eine Negativselektion mit der Thymidinkinase (TK) durchgeführt werden. Dieses virale Enzym phosphoryliert das Guanosinanalogen Ganciclovir, welches bei Replikation der DNA zum Kettenabbruch und zum Tod der Zelle führt (Mansour et al., 1988).

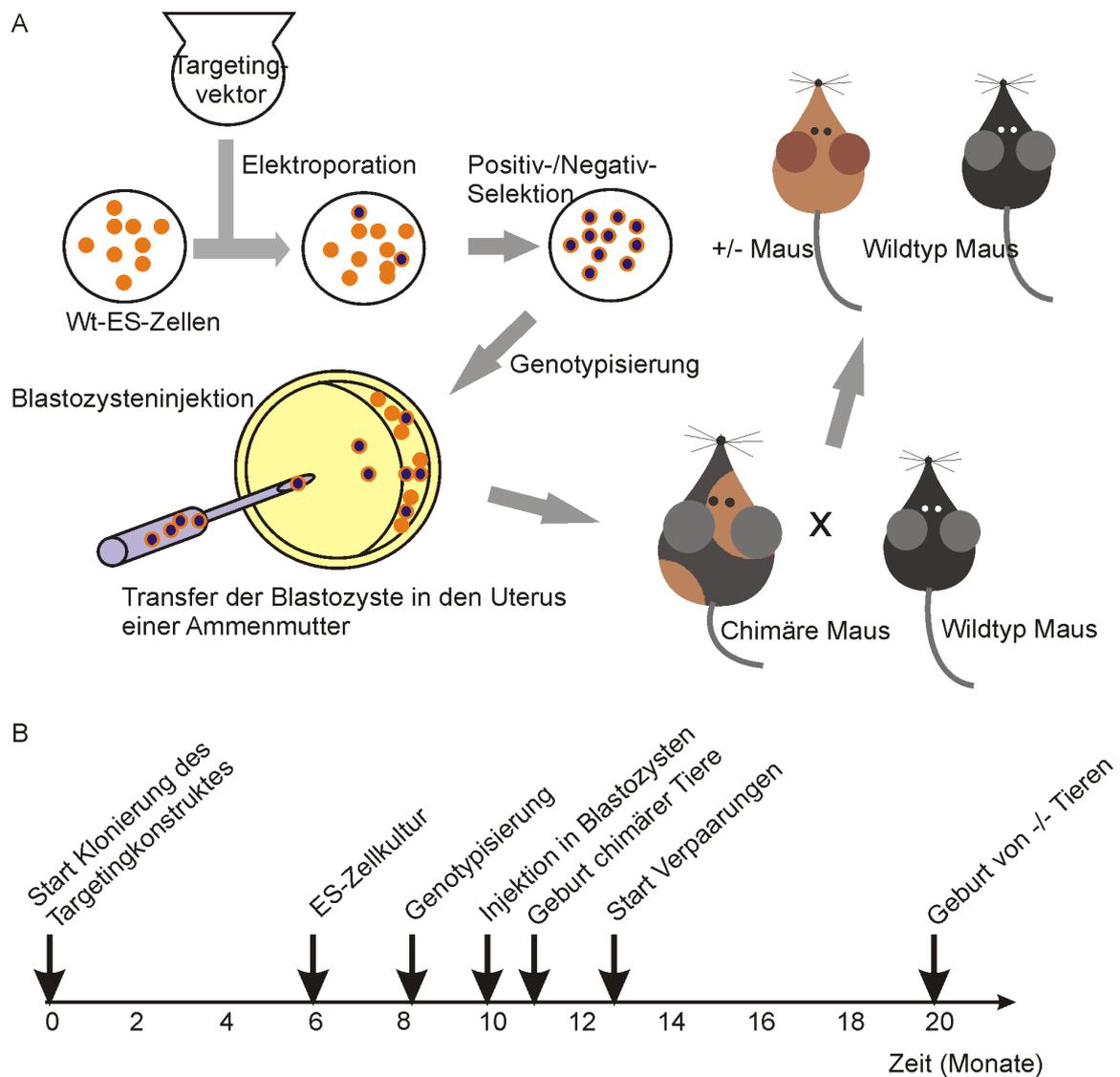


Abb. 6: Prinzip des Gentergetings in embryonalen Stammzellen der Maus

A: Nach Elektroporation des Targetingkonstruktes in Wildtyp-ES-Zellen und Selektion werden die durch Genotypisierung analysierten ES-Zellen in eine Blastozyste injiziert, aus der nach Transfer in den Uterus einer Ammenmutter eine chimäre Maus heranwächst. Bei keimbahngängiger Mutation erhält man nach Verpaarung der Chimären mit Wildtyp-Mäusen für die Mutation heterozygote Tiere.
B: Dauer der Herstellung einer Knock-out Maus.

Die TK-cDNA wird außerhalb der chromosomalen Abschnitte im Targetingkonstrukt positioniert und wird bei homologer Rekombination entfernt. Bei unerwünschter, nicht homologer Integration des Targetingkonstruktes wird sie jedoch ins Genom integriert und die Zellen sterben. Trotz Positiv- und Negativselektion ist die Zahl der falsch-positiven Stammzellen immer noch hoch. Das liegt u.a. an partieller oder mehrfacher Integration des Targetingkonstruktes. Daher ist es unerlässlich, positive Klone durch Southernblot zu identifizieren. Damit aus den manipulierten Stammzellen eine transgene Maus entstehen kann, werden sie in eine Mausblastozyste reimplantiert, aus der sich eine chimäre Maus entwickelt. Chimär bedeutet, dass diese Maus ein Mosaik aus Wildtyp-Zellen und manipulierten Zellen enthält (Bradley et al., 1984). Da Stammzellen und Blastozyste von

Mausstämmen unterschiedlicher Fellfarbe stammen, kann der Grad des Chimärismus anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. Entscheidend ist jedoch, dass die Keimzellen aus den manipulierten Stammzellen hervorgegangen sind, denn nur dann kann die Mutation an die Nachfahren vererbt werden und man erhält Tiere, die die Mutation in jeder Körperzelle tragen. In einem solchen Fall spricht man von einer „keimbahngängigen“ Mutation.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

TRPM3- und TRPM1-Proteine zählen bislang zu den am wenigsten untersuchten Mitgliedern der TRP-Ionenkanalfamilie: Daten zur Funktionsweise dieser Kanäle stammen ausschließlich aus Untersuchungen von Zelllinien nach heterologer Überexpression ihrer cDNA. Sie zeigen, dass rekombinante TRPM3 α 2-Proteine Ca²⁺-permeable Kationenkanäle bilden, die durch das Steroid Pregnenolonsulfat aktiviert werden, während hingegen TRPM3 α 1 ebenso wie TRPM1 nicht durch Pregnenolonsulfat aktiviert werden und nur wenig permeabel für Ca²⁺ sind. Auch die Informationen über das Expressionsmuster von TRPM3- und TRPM1-Proteinen sind lückenhaft und die Funktionsweise von zelleigenen TRPM3-Kanalproteinen sowie deren biologische Bedeutung sind bislang völlig ungeklärt.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher zunächst die Charakterisierung des Vorkommens von TRPM3-Transkripten und Proteinen in verschiedenen Geweben und Zelltypen mit Hilfe von RT-PCR, Northernblot und Westernblot. Die so identifizierten Zellen sollten dann als Modell zur Untersuchung der TRPM3-Kanalfunktion dienen. Durch Knock-down der TRPM3-Expression sollte der Beitrag von TRPM3-Proteinen zum Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstrom untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Veränderung dieses Ca²⁺-Einstroms in Gegenwart von TRPM1 und TRPM3 α 1 analysiert werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Herstellung TRPM3-defizienter Mäuse. Dabei sollte sowohl eine zeitlich bestimmbare als auch eine gewebespezifische Inaktivierung ermöglicht werden. Darüber hinaus sollte durch die Einschleusung der cDNA des grün-fluoreszierenden Reportergens (GFP) unter die Kontrolle des endogenen TRPM3-Promotors die Möglichkeit gegeben werden, durch Detektion der GFP-Fluoreszenz das Expressionsmuster von TRPM3 im Ganztier zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt), VWR (Darmstadt), Merck (Schwalbach) oder Riedel de Häen (Seelze) bezogen.

3.2 Vektoren

pBluescript II-SK-(+/-)

Das Plasmid pBluescript SK- (Stratagene; CA, USA; Abb. 7) diente als Gerüst-Plasmid für das TRPM3-Knock-out Targetingkonstrukt. Neben einem Ampicillinresistenz-Gen besitzt das Plasmid unter anderem ein LacZ-Gen, das einen Blau-Weiß-Test möglich macht (3.6.1.3).

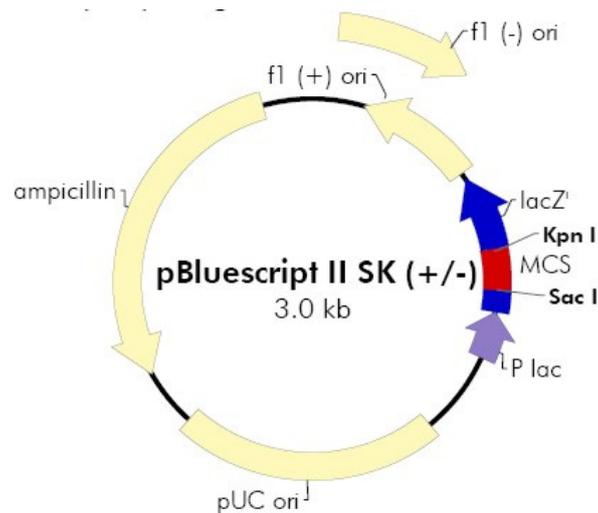


Abb. 7: Zirkuläre Vektorkarte des Plasmids pBluescript II SK (+/-)

pUC18

Der 2686 bp große Klonierungsvektor pUC18 (Fermentas; St. Leon-Rot) enthält sowohl Teile aus dem Genom des Bakteriophagen M13 als auch aus dem Plasmid pBR322. Das pBR322-Fragment trägt das Ampicillinresistenz-Gen (Ap^R) sowie den Replikationsursprung (pMB1). Auf dem Bereich des M13-Vektors liegen die Sequenzen für das α -Peptid des *E.coli*-lacZ-Gens (β -Galaktosidase) und die multiple Klonierungsstelle (Abb. 8).

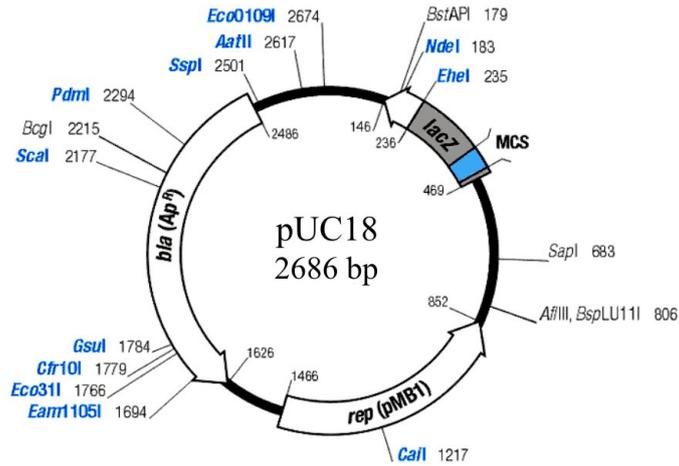


Abb. 8: Zirkuläre Vektorkarte von pUC18

pCAGGSM2-IRES-GFP

Der 6100 bp umfassende Expressionsvektor pCAGGSM2-IRES-GFP (Warnat et al., 1999) basiert auf dem Plasmid pCAGGSM2 (Niwa et al., 1991). Ein β -Aktinpromotor aus dem Huhn steuert die Expression der nachgeschalteten Ziel-cDNA. In pCAGGSM2-IRES-GFP liegt strangabwärts eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus dem Encephalomyokarditis-Virus. Diese zweite Ribosomenbindungsstelle ermöglicht die Translation einer strangabwärts gelegenen cDNA, die das grün-fluoreszierende Reporterprotein GFP codiert. Durch gleichzeitige Expression des Zielproteins und GFP von demselben Transkript wird die Expression des Zielproteins mit Hilfe der grünen Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins optisch sichtbar gemacht.

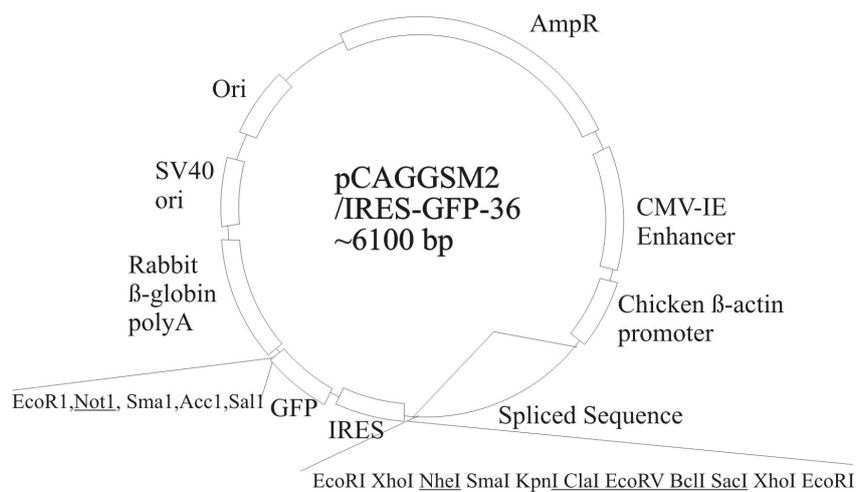
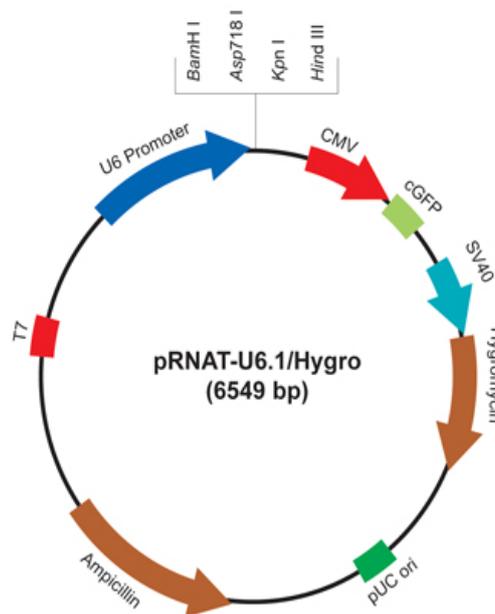


Abb. 9: Zirkuläre Vektorkarte des Plasmids pCAGGSM2-IRES-GFP

pRNAT-U6.1-hygro/ pRNAT-U6.1-EYFP

Der Vektor pRNAT-U6.1-hygro (Genescript; Piscataway/New Jersey) besitzt einen humanen U6 Promotor. Dort bindet die DNA-abhängige RNA-Polymerase III, die für die Transkription kleiner RNA-Typen wie tRNA und 5S-rRNA verantwortlich ist. Der Promotor eignet sich ebenfalls für die Expression von shRNA, unter anderem durch seine Expressionsstärke und ein genau definiertes Signal für Start und Stop der Transkription. Der Vektor codiert eine Ampicillin- und eine Hygromycinresistenz. Zusätzlich enthält er die cDNA des „coral Green Fluorescent Protein“ (cGFP), welches unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus (CMV)–Promotors exprimiert wird. Die starke Expression und die ausgeprägte Fluoreszenz von cGFP machen den Vektor jedoch ungeeignet zur ratiometrischen Fluoreszenzmessung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikatorfarbstoffs FURA-2: obwohl die Anregungswellenlänge von cGFP bei 480 nm liegt, wird das Protein auch zu einem beachtlichen Teil bei den Anregungswellenlängen von FURA-2, nämlich 340 und 380 nm angeregt. Daher wurde die cGFP-cDNA gegen die cDNA des Enhanced Yellow Fluorescent Proteins (EYFP) ausgetauscht. Die EYFP-cDNA wurde über eine NheI/Acc65I-Hydrolyse aus dem Plasmid pEYFP-C1 (Clontech) freigesetzt und in den NheI/BsrGI geschnittenen pRNAT-Vektor kloniert.

**Abb. 10:Zirkuläre Karte des Plasmids pRNAT-U6.1 hygro**

3.3 Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide wurden von den Firmen Operon (Huntsville/AL) oder MWG (Ebersberg) in lyophilisierter Form geliefert (Tab. 3-9). Das Lyophilisat wurde in einer Konzentration von 100 pmol/μl in sterilem H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 3: Für Sequenzierungen verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Herkunft der Sequenz
FV79	CACGACGTTGTAAAACGAC	56	pUC18 oder pBluescript SK+/- und KS+/- flankierend zur MCS
FV 80	CAGGAAACAGCTATGAC	50	pUC18 oder pBluescript SK+/- und KS+/- flankierend zu MCS
PH374	CTGCAGAACTTTGAACTCCAGC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH375	GCTGGAGTTCAAAGTTCTGCAG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH376	GAATCGGTCAAGGGGTTCCAG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH377	ACTGCTGCCCGTAAATAAAGATC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH380	CCAAGATGGCTCCTCATTGGG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH387	GATGTAGTCCGACCATAACCAG	64	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH388	CAATTGAGATCACATTGGGTCC	64	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH392	GTCCTACAAACAGGATGAGCAG	64	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH394	GGTGGCAACAAGATAAATCTTCC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH408	CATCAGGTACTCGATCACCAG	64	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH515	CCGTTTATTTTCTAGGCACTGCC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH516	GTCTGACAGATGGGAGAAAGGC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH517	ACCATCTCCAGACTAGAGGAAC	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH521	CCCAATGAGGAGCCATCTTGG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH611	TGAAGGAGGAAGTAGAATTCCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH625	CCAGCATGTCCGACTCACTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH626	CCCAGCACCTGTTTCATCATCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH627	GATCAACCACTTCCCATTCCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH628	CAGGCCCAAGAAATTCATCTCC	66	cDNA TRPM3 Ratte
PH629	AGAGATCCTGATGTCAGAGCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH630	CTCTTCATAACTGATGATGAGC	62	cDNA TRPM3 Ratte
PH631	TCAAGAGAGTATAGACCCTGC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH632	CTTTTCAGCTCTAGCACCTTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH633	TCGACACAAGATGTGTCAATGC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH634	CTTCCAGAGAAGTAAGTCCTCC	66	cDNA TRPM3 Ratte
PH635	CCATGATGGCTGGCACAATCC	66	cDNA TRPM3 Ratte
PH636	TTAAGTTCCAAGCAGGGGTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH637	CCACACTTTGACTTTCTGCAGC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH638	AGCCTCATGGACATGTTCTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH639	CACGGTGTAAGCTCAGGGACC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH640	ACATTGGAGGGTCTGTGTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH641	TTTAGCCATGGCCTCCTCTCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH642	GATGAAGTGGGAGTGCATGC	64	cDNA TRPM3 Ratte
SM01	CCTCCTGACCTTCCAATAACAAC	68	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM02	TTAGAATCGGGATGGCTGGAC	64	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM03	TAGCACTGAAACAAGTACAGCC	64	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM04	TTCTACAGGAAATTCATCCC	64	Intronsequenz TRPM3Maus
SM05	GCAGAGTCTAGTCAGCACACC	64	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM06	TCAGGTCAGGATGAAGCTTAGC	66	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM07	CACACCTCAGATGACTCATTCC	66	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM08	CTGCTGAACTGTAAGCTCCTC	64	Intronsequenz TRPM3Maus
SM09	CACCAGACACATTCTAGAGAAG	64	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM10	GTTGTTATTGGAAGGTCAGGAGG	64	Intronsequenz TRPM3 Maus

SM11	CCTCGAGGAGCTTACAGTTC	62	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM12	CCTGGGAGAGGAGTTCTAGAG	66	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM13	GGCTTGCTTCTACTAATGG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM14	CCATTAGTAGAAGACAAGCC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM15	TCCTTAGGGACCTGCAGC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM16	GCTGCAGGTCCCTAAGGA	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM17	CATCCAAGAGGAGGAAGTC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM18	GACTTCCTCCTCTTGGATG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM19	TCCAGCAAGTCTCACCTAC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM20	GTAGGTGAGACTTGCTGGA	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM21	ACCACTCTGCACTAGTTCC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM22	GGCTGTACTTGTTTCAGTGCTA	64	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM23	GCTCAAATCTTAAGGCCAC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM24	GTGGCCTTAAGATTTTGAGC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM25	CTTAGTGCGGACCAAGAGC	60	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM26	GCTCTTGGTCCGCACTAAG	60	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM27	GGGATGGGAATTTCTGTAG	60	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM28	TGTGCTGACTAGACTCTGC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM29	CATCTGCTGAACACGAGG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM30	CCTCGTGTTCAAGCAGATG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM31	TTCAGCCAAGGTCACTGG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM32	CCAGTGACCTTGGCTGAA	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM33	GACAGAAGTTACCTATAAAGC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM34	AATGAGTCATCTGAGGTGTG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM35	GCTAAGCTTCATCCTGACC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM36	GCTTTATAGGTAACCTCTGTC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM37	CACTGCGTGTCTCTGAGG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM38	CCTCAGAGACACGCAGTG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM39	ACCTAGCCATTTCTACTCTG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM40	CAGAGTAGAAATGGCTAGGT	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM41	CTGACCTCTGATGGCCTC	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
SM42	GAGGCCATCAGAGGTCAG	58	Intronsequenz TRPM3 Maus
TK1	GGGCAGCGCCAATAGCAGC	68	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK2	CGCAACTGCTGGTGGCCC	62	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK3	GCGGTACCTTATGGGCAGC	62	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK4	CAACGGCGACCTGTATAACG	62	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK5	AGGGCTGGCACTCTGTCTG	60	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK6	TGGGACCGAACCCCGCG	60	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK7	AGCAACTCGGGGGCCCG	60	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK8	GCTGCCATAAGGTACCGC	62	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK9	GGGCCACCAGCAGTTGCG	62	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
TK10	GCTGCTATTGGCCGCTGCC	68	Thymidinkinase-cDNA aus pBTK-1
C5-114	CCACCATATTGCCGCTTTTTG	62	IRES-Sequenz
C5-115	CAAAAGACGGCAATATGGTGG	62	IRES-Sequenz
C5-116	CCTCAAGCGTATTCAACAAGG	62	IRES-Sequenz
C5-117	CCTTGTTGAATACGCTTGAGG	62	IRES-Sequenz
C5-118	CTGAAGTTCATCTGCACCACC	64	cDNA EGFP
C5-119	GGTGGTGAGATGAACTTCAG	64	cDNA EGFP
C5-120	GCCACAACGTCTATATCATGG	62	cDNA EGFP
C5-121	CCATGATATAGACGTTGTGGC	62	cDNA EGFP
C5-122	GCCATACCACATTTGTAGAGG	62	cDNA EGFP
C5-123	CCTCTACAAATGTGGTATGGC	62	cDNA EGFP
C5-124	CCAAGGCAGTCTGGAGCAT	60	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-125	ATGCTCCAGACTGCCTTGG	60	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-126	GCTCAGAGGCTGGGAAGGG	64	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-127	CCCTCCCAGCCTCTGAGC	64	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-128	GTCAAGACCGACCTGTCCG	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-129	CGGACAGGTCGGTCTTGAC	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-130	CTGGACGAAGAGCATCAGGG	64	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen

C5-131	CCCTGATGCTCTTCGTCCAG	64	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-132	CGAGTTCTTCTGAGGGGATC	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-133	GATCCCCTCAGAAGAACTCG	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-134	CCCACTCATGATCTATAGATCT	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen
C5-135	AGATCTATAGATCATGAGTGGG	62	cDNA pgk-Neomycinresistenz-Gen

Tab. 4: Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation von TRPM3-cDNA mit vollständigem Leserahmen

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Herkunft der Sequenz
(PH552)	CGGGTCTCATTCTGTCCACAG	66	TRPM3 cDNA, Ratte
(PH553)	GGGCTTAAGATGCCAGGGCCGTGGG GGAC	68	TRPM3 cDNA, Ratte
(PH374)	CTGCAGAACTTTGAACTCCAGC	66	TRPM3 cDNA, Ratte, Maus
(PH554)	GGGTCCTGCAACACACGGGAAGATG	68	TRPM3 cDNA, Ratte

Tab. 5: Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation von TRPM3- und TRPM1-Fragmenten aus Ins-1- und GH3-Zellen

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Herkunft der Sequenz
PH380	CCAAGATGGCTCCTCATTGGG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH500	CTATGATGAGGAAGGCAAGAGG	66	cDNA TRPM1 Maus,Ratte
PH501	GACCAGCAGGATATTGGCCAC	66	cDNA TRPM1 Maus,Ratte
PH502	CACGCACTGCTCCTCAAACCTC	66	cDNA TRPM1 Maus,Ratte
PH521	CCCAATGAGGAGCCATCTTGG	66	cDNA TRPM3 Maus,Ratte
PH559	GATCTACGGAGAAGTGTTTGCAG	68	cDNA TRPM1 Maus,Ratte
PH629	AGAGATCCTGATGTCAGAGCC	64	cDNA TRPM3 Ratte
PH635	CCATGATGGCTGGCACAAATCC	66	cDNA TRPM3 Ratte

Tab. 6: Oligodesoxyribonukleotide zur Herstellung der Hilfsvektoren pSM01-04

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Modifikation.	Verwendung
SM43	CGCGCGGCGCGCCTATGCGGCC GCGCTAGCTTACTAGTCCACTGG TCTGGAAGCTTTCTAGAG	5'Phos.	in Verbindung mit SM44 Polylinker von pSM01
SM44	CGCGCTCTAGAAAGCTTCCAGAC CAGTGGACTAGTAAGCTAGCGCG GCCGCATAGGCGCGCCG	5'Phos.	in Verbindung mit SM43 Polylinker von pSM01
SM45	CGCGCGGCGCGCCATCTAGAAT AACTTCGTATAGCATACATTATAC GAAGTTATCCACTGGTCTGGACT AGTTTAAGCTTGGCCGGCCGTTT AAACG	5'Phos.	in Verbindung mit SM46 Polylinker von pSM02
SM46	CGCGCGTTTAAACGGCCGGCCA AGCTTAAACTAGTCCAGACCAGT GGATAACTTCGTATAATGTATGCT ATACGAAGTTATTCTAGATGGCG CGCCG	5'Phos.	in Verbindung mit SM45 Polylinker von pSM02
SM47	CGCGCTCTAGAGAGCTCATAACT TCGTATAGCATACATTATACGAAG TTATAAGCTTCCGGTACCG	5'Phos.	in Verbindung mit SM48 Polylinker von pSM03
SM48	CGCGCGGTACCGGAAGCTTATA ACTTCGTATAATGTATGCTATACG AAGTTATGAGCTCTCTAGAG	5'Phos.	in Verbindung mit SM47 Polylinker von pSM03
SM49	CGCGCGTTTAAACGGCCGGCCG TCGACTCTAGACAGGTACCACGA ATTCGCGGCCGCTATGGCCGGC CGTTTAAACG	5'Phos.	in Verbindung mit SM50 Polylinker von pSM04

SM50	CGCGCGTTTAAACGGCCGGCC ATAGCGGCCGCGAATTCGTGGT ACCTGTCTAGAGTCGACGGCC GGCCGTTTAAACG	5'Phos.	in Verbindung mit SM49 Polylinker von pSM04
------	---	---------	---

Tab. 7: Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation homologer Bereiche 5'- und 3'-flankierend zu Exon 24

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Herkunft der Sequenz/ Verwendung
SM01	CCTCCTGACCTTCCAATAACAAC	68	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM02	TTAGAATCGGGATGGCTGGAC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM03	TAGCACTGAAACAAGTACAGCC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM04	TTCTACAGGAAATTCCCATCCC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM05	GCAGAGTCTAGTCAGCACACC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM06	TCAGGTCAGGATGAAGCTTAGC	66	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM07	CACACCTCAGATGACTCATTCC	66	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM08	CTGCTGAACTGTAAGCTCCTC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus

Tab. 8: Oligodesoxyribonukleotide für die Klonierung von DNA-Sonden 5'-und 3'-flankierend zur Knock-out-Zielsequenz

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Verwendung
SM09	CACCAGACACATTCTAGAGAAG	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM10	GTTGTTATTGGAAGGTCAGGAGG	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM11	CCTCGAGGAGCTTACAGTTC	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM12	CCTGGGAGAGGAGTTCTAGAG	66	genomische Sequenz von TRPM3 Maus

Tab. 9: Oligodesoxyribonukleotide zur Genotypisierung transgener Mäuse durch PCR

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	T _m (°C)	Herkunft der Sequenz
SM55	GGCAGAGTGAGGGGAGAAAC	64	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM61	CGCAGCAACATTGTCATTTCC	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
C5-122	GCCATACCACATTTGTAGAGG	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
C5-139	CGCACACCGGCCTTATTCC	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
C5-125	ATGCTCCAGACTGCCTTGG	60	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM59	AGGATAGAGCTTAAGTTCTCCC	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM56	CTGCTCTTAGATCTGAAAGG	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
SM60	GGGTGGGATTAGATAAATGCC	62	genomische Sequenz von TRPM3 Maus
Cre_1	ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT	68	Cre-Rekombinase
Cre_2	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	66	Cre-Rekombinase
Flp-1	CCCATTCCATGCGGGGTATCG	68	Flp-Rekombinase
Flp-2	GCATCTGGGAGATCACTGAG	62	Flp-Rekombinase

3.4 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet (Tab. 10):

Tab. 10: Verwendete Antikörper

Name/ gekoppelt mit	Verdünnung	Erkennung von	Herkunft/Hersteller
AK695	1:200	mTRPM3 Peptidsequenz: QEKEPEEPEKPTKEK	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum
Anti Myc-AK	1:1000 (Westernblot) 1:200 (Immuncytochemie)	c-Myc	Maushybridom Klon 9E10, Roche
7C5	Hybridom-Kulturüberstand	mTRPM3 α 2 Aminoterminus	Rattenhybridom
Goat anti Rabbit IgG/Meerrettich Peroxidase	1:50.000	IgG aus Kaninchen	Ziegenserum, GE-Healthcare (Piscataway, New Jersey)
Goat anti Maus IgG/Meerrettich Peroxidase	1:50.000	IgG aus Maus	Ziegenserum, Dianova (Hamburg)
Goat anti rabbit/ Alexa Fluor 594	1:1000	IgG aus Kaninchen	Ziegenserum, Molecular Probes (Palo Alto, CA)
Goat anti mouse/ Alexa Fluor 594	1:1000	IgG aus Maus	Ziegenserum, Molecular Probes (Palo Alto, CA)
Goat anti rat/ Alexa Fluor 594	1:1000	IgG aus Ratte	Ziegenserum, Molecular Probes (Palo Alto, CA)

3.5 Kultivierung eukaryontischer Zellen

3.5.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien und ihre Kulturbedingungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Zellen wurden entweder in 75 cm² Kulturflaschen mit 10-15 ml Medium oder in Kulturschälchen (\varnothing 3 cm) mit 2 ml Medium kultiviert. Zur Passage der Zellen in ein neues Gefäß wurden sie einmal mit PBS gewaschen, mit 1 x Trypsin/EDTA (30-40 μ l Trypsin/EDTA pro cm² Oberfläche) von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst und in einer geeigneten Verdünnung in ein frisches Kulturgefäß überführt. Die Retinoblastom-Zelllinien Y79, RBL-30, RB-355, RBL-15, RBL-13, RB-247-C3, RB-383 und WERI-RB-1 wachsen in Suspension und wurden zur Passage 5 min bei 150 x g zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen resuspendiert. Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen aus der Maus wird gesondert in Kapitel 3.8 beschrieben.

Tab. 11: Zelllinien und ihre Kulturbedingungen

Zelllinie	Herkunft	Kultur- bedingung (1)	Kultur- medium (2)	Passagen pro Woche	Referenz
HEK293	Niere, Mensch	1	A	2-3	ATCC CRL 1573
GH3	Adenohypophyse, Ratte	1	B	2	Tashjian, Jr. et al., 1970
Ins-1	β -Zellen des Pankreas, Ratte	1	C	2	Asfari et al., 1992
Z310	Epithelzellen des Plexus choroideus, Ratte	1	D	2-3	Zheng and Zhao, 2002
NPE	nichtpigmentiertes Epithel des Ziliarkörpers, Ratte	1	D	2	Mitchell et al., 1999
Y79	Retinoblastom, Mensch	2	E	2	McFall et al., 1977
RBL-30	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
RB-355	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
RBL-15	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
RBL-13	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
RB-247-C3	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
RB-383	Retinoblastom, Mensch	2	E	max. 1	Griegel et al., 1990
WERI-RB-1	Retinoblastom, Mensch	2	F	2	McFall et al., 1977

- (1) Kulturbedingung 1 5% CO₂, 37°C, gesättigte Wasserdampf-Atmosphäre
 Kulturbedingung 2 10% CO₂, 37°C, gesättigte Wasserdampf-Atmosphäre

- (2) Medium A Minimum Essential Medium (# 31095-029, Invitrogen)
 10% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen)

Medium B Ham's F10-Medium (# 41550-021, Invitrogen)
 15% Pferdeserum (# 16050-122, Invitrogen)
 2,5% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen)
 2 mM Glutamax (# 35050-038, Invitrogen)

Medium C RPMI1640 (# 21875, Invitrogen)
 10% fötales Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen)
 1 mM Natriumpyruvat (# S8636, Sigma)
 1 mM Hapes (# H0887, Sigma)
 50 μ M β -Mercaptoethanol (# M7522, Sigma)

Medium D DMEM (# 41966-029, Invitrogen)
 10% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen)
 100 U/ml Penicillin (# 15240-122, Invitrogen)
 100 μ g/ml Streptomycin (# 15240-122, Invitrogen)

Medium E	DMEM (# 41966-029, Invitrogen) 15% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen) 4 mM L-Glutamin SL (#25030-024, Invitrogen) 50 µM β-Mercaptoethanol (# M7522, Sigma) 10 µg/ml Insulin (# I6634, Sigma) 100 U/ml Penicillin (#15240-122, Invitrogen) 100 µg/ml Streptomycin (#15240-122, Invitrogen)
Medium F	RPMI1640 mit Glutamin (# 21875, Invitrogen) 10% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen) 4,5 g/L Glucose (# G8644, Sigma) 10 mM Hepes (# H0887, Sigma) 1 mM Natriumpyruvat (# S8636, Sigma)
PBS:	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 8,0 g/l NaCl 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄
1 x Trypsin-EDTA : (0,05% w/v)	5 ml 10 x Trypsin-EDTA (# T4424, Sigma) (5,0 g/l Trypsin; 2,0 g/l EDTA; 8,5 g/l NaCl) ad 50 ml mit PBS Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.5.2 Präparation und Kultivierung primärer Epithelzellen aus Plexus choroideus der Maus

Eine Maus wurde gestreckt, dekapitiert und das Gehirn freigelegt. Die Plexi choroidei des vierten und der beiden lateralen (erster und zweiter) Ventrikel wurden präpariert und in eiskaltem PBS gewaschen. Der Zellverband wurde durch Inkubation mit Trypsin (0,025% in PBS) für 15-25 min und Scheeren mit einer 200 µl Pipettenspitze aufgelöst. Nach Filtration durch einen 70 µM-Filter (Falcon/Beckton Dickinson; Palo Alto/CA) wurden die Zellen in zwei Teflonringe (Ø 7 mm) auf einem mit Laminin beschichteten Glasdeckgläschen (Ø 2,5 cm) pipettiert. Um zu verhindern, dass Fibroblasten die Kultur überwuchern, wurden dem Kulturmedium 20 µM Cytosin-Arabinosid (# C6645; Sigma-Aldrich) zugesetzt. In Kultur bildeten die Epithelzellen einen backsteinmauerartigen, einschichtigen Zellverband. Ca²⁺-Messungen (vgl. 3.9) oder Transfektionen (vgl. 3.5.3) wurden nach 6-7 Tagen durchgeführt.

Kulturbedium	DMEM (# 41965-039; Invitrogen; Karlsruhe) : Ham's F12 (# 21765-029; Invitrogen) 1:1 10% Fötale Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
---------------------	---

3.5.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

GH3-, Ins-1-Zellen sowie primäre Epithelzellen aus Plexus choroideus (3.5.2) wurden mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die besten Transfektionsergebnisse erhielt man bei GH3-Zellen und Primärzellen aus Plexus choroideus mit 10 µl Transfektionsreagenz und 4 µg DNA. Bei Ins-1-Zellen genügten 5 µl Transfektionsreagenz und 2 µg DNA. Höchste Transfektionsraten bei HEK293-Zellen wurden mit 6 µl FuGene-Reagenz (Roche; Mannheim) und 2 µg DNA erzielt. Alle Transfektionen wurden in Kulturschälchen (Ø 3 cm) durchgeführt. GH3-, Ins-1- und HEK293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von 60-70% ausgesät.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Kultivierung und Transformation von *Escherichia coli*

3.6.1.1 Bakterienstämme und Medien

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

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

Die Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium oder auf Festmedium kultiviert. Zur Herstellung von Festmedium wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt und nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C je 25 ml in sterile Petrischalen (Ø 10 cm) gegossen. Selektionsmedien wurden durch Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin hergestellt.

LB-Medium; pH 7,5:	1% (w/v)	Caseinhydrolysat
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1% (w/v)	NaCl

3.6.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen (Nishimura et al., 1990) wurden 100 ml LB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 1 ml einer Übernachtskultur des Stammes XL1-Blue beimpft und bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer Zelldichte von $A_{578\text{nm}} = 0,35-0,45$ im Schüttelinkubator geschüttelt. Nach Abkühlen für 10 min auf Eis, wurde die Zellsuspension für 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in insgesamt 500 µl eisgekühltem Medium A resuspendiert und anschließend vorsichtig mit dem 5-fachen Volumen Medium B vermischt. Diese Suspension wurde in 110 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Die Kompetenz der Zellen wurde durch Transformation (vgl. 3.6.1.3) von 10 ng pUC18-Plasmid-DNA bestimmt.

Medium A: 10 mM MgSO₄
 0,2% (w/v) Glucose
 in LB-Medium gelöst und sterilfiltriert

Medium B: 36% (w/v) Glycerin
 12% (w/v) Polyethylenglykol 8000
 12 mM MgSO₄
 in LB-Medium gelöst und sterilfiltriert

3.6.1.3 Transformation kompetenter *E.coli*

Die tiefgefrorenen, kompetenten Zellen (vgl. 3.6.1.2) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis, Hitzeschock für 1 min bei 42°C sowie 2 min Abkühlung auf Eis, wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Je 200 µl der Kultur wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zellen des *E.coli*-Stammes XL1-Blue tragen die $\Delta 15$ -Deletion des lacZ-Gens und sind daher nicht in der Lage eine funktionelle β -Galaktosidase zu bilden (Bullock et al., 1987). Werden solche Zellen mit dem Plasmid pUC18 oder pBluescript (vgl. 3.2) transformiert, komplementiert das Plasmid-codierte α -Peptid der β -Galaktosidase den Gendefekt (α -Komplementation). Die β -Galaktosidase wird durch Bildung eines blauen Indolfarbstoffs nachgewiesen, der durch Spaltung von 5-Bromo-4-Chlor-3-indolyl-13 β -galaktopyranosid (X-Gal) entsteht. Dem Transformationsansatz wurden vor dem Ausplattieren 200 µl X-Gal (40 mg/ml gelöst in Dimethylformamid) sowie 50 µl Isopropyl- β -D-thiogalactosylpyranosid (IPTG, 0,1 M) zur Induktion der Genexpression des α -Peptids zugegeben. Bei Insertion eines DNA-Fragments in die multiple Klonierungsstelle des pUC18-Vektors oder des pBluescript-Vektors wird die cDNA des α -Peptids unterbrochen. Zellkolonien, die mit rekombinanten Plasmiden

transformiert werden, unterscheiden sich daher durch ihre weiße Farbe von blauen Zellkolonien, die mit nicht rekombinanten Plasmiden transformiert wurden (Blau-Weiß-Test).

3.6.1.4 Anlage von Bakteriendauerkulturen

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden 1,5 ml Flüssigkultur in der Tischzentrifuge bei 3500 rpm sedimentiert, in 1 ml Bakterienlagermedium resuspendiert und bei -20°C gelagert.

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

3.6.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.6.2.1 Gewinnung genomischer DNA

Embryonale Stammzellen der Maus wurden bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz inkubiert (Kulturgefäß \varnothing 0,32 cm², 96-Lochplatte). Nach Absaugen des Mediums wurde 150 μl Lysis-Puffer zugegeben und 5-16 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 μl Isopropanol und anschließender Inkubation auf einem Kreiselschüttler über Nacht bei 4°C wurde die DNA gefällt. Die genomische DNA wurde als Flocke sichtbar und konnte mit einer Kanüle (0,9 mm x 40 mm Microlance 3; BD, Palo Alto) aufgewickelt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zum Trocknen überführt werden. Um ein Scheitern der makromolekularen genomischen DNA zu vermeiden, wurde sie in 80 μl TE-Puffer für 30 min bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Haep Labor Consults; Bovenden) gelöst.

Lysis-Puffer	100 mM	TRIS-HCl
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	0,2% (w/v)	SDS
	100 $\mu\text{g/ml}$	ProteinaseK (frisch zugeben)
TE-Puffer	10 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA

Alternativ wurde genomische DNA aus dem Schwanz von Mäusen mit Hilfe des QiaAmp DNA-Mini Kits (# 51304, Firma Qiagen, Hilden) isoliert. Bei dieser Methode wird das Gewebe mit Hilfe von Proteinase K aufgeschlossen, die freigesetzte DNA durch Bindung an die Membran einer Zentrifugationssäule gereinigt und schließlich in Abwesenheit von Salzen eluiert.

3.6.2.2 Analytische Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Holmes and Quigley, 1981)

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (3500 rpm, Biofuge pico; Heraeus), in 200 µl STET-Puffer/Lysozym (100 ng/ml) resuspendiert und 30 sec auf 100°C erhitzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und verworfen. Die DNA, die im Überstand enthalten war, wurde durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und Zentrifugation (30 min, 13000 rpm) gefällt. Nach Waschen mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol (10 min, 13000 rpm) und anschließendem Trocknen, entweder bei Raumtemperatur für 30 min oder in der Speedvac® (Savant, Telechem International Inc.; Sunnyvale/CA) für 1 min, wurde die DNA in 50 µl H₂O/RNaseA (100 µg/ml) aufgenommen. Für Restriktionsanalysen (vgl. 3.6.5.1) wurden 5 µl der DNA-Lösung verwendet.

STET-Puffer	50 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	50 mM	EDTA
	5% (w/v)	Saccharose

3.6.2.3 Plasmidpräparation durch Anionenaustausch-Chromatografie

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA im großem Maßstab mit Ausbeuten größer als 100 µg wurde ein Präparationssystem (Kit) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. 400 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur eines rekombinanten *E.coli*-Klons beimpft und 12-16 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 6000 x g sedimentiert und in 10 ml 4°C kaltem P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer wurden die Zellen anschließend alkalisch lysiert. Nach 5 min wurde die Lösung mit 10 ml P3-Puffer neutralisiert und nach 20 min Inkubation auf Eis wurden denaturierte Proteine durch 30 min Zentrifugation bei 15000 x g (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen, bevor die an das Anionenaustauscherharz gebundene DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert wurde. Nach 30 min Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C wurde das Sediment mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem H₂O gelöst. Die Ausbeute und Reinheit der DNA wurde photometrisch (vgl. 3.6.3.1) und durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.6.3.4) analysiert.

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

Plasmid-DNA, die für die Transfektion eukaryontischer Zellen verwendet wurde, wurde mit einem „Endofree-Maxi-Plasmid-Kit“ der Firma Qiagen nach dem oben beschriebenen Prinzip unter Verwendung von endotoxinfreien Lösungen und Puffern isoliert. Alle Utensilien wurden, soweit möglich, 3 h bei 200°C gebacken.

3.6.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Inaktivierung von RNAsen wurden aminfreie Lösungen und Puffer für 12 h mit 0,01% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Durch zweimaliges Autoklavieren wurde DEPC anschließend aus den Lösungen entfernt. RNA wurde aus verschiedenen Geweben von Maus und Ratte sowie aus Zellkulturlinien mit Hilfe von peqGold RNAPure™ (Peqlab Biotechnologie; Erlangen) isoliert. Gewebe wurde unmittelbar nach Eintritt des Todes präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Zellen aus drei 70-80% konfluent bewachsenen 175 cm²-Kulturflaschen oder 1 g Gewebe wurden in 10 ml peqGold RNAPure-Lösung im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Chloroform wurden die Proben 30 sec kräftig geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g konnte man eine Auftrennung in drei Phasen erkennen: Gewebereste und Proteine in der organischen unteren Phase, DNA und Lipide in der Interphase und RNA in der wässrigen oberen Phase. Die wässrige Phase wurde abgezogen, die RNA nach Zugabe von 5 ml Isopropanol 15 min bei RT präzipitiert und 30 min bei 12000 x g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet, in DEPC behandeltem Wasser gelöst und photometrisch analysiert (vgl. 3.6.3.1).

3.6.2.5 Gewinnung von PolyA⁺-RNA

Mit Hilfe von Cellulose-gebundener Oligo-Thymidilat-Moleküle (Oligo-(dT)-Cellulose) kann polyadenylierte RNA aus einem Gemisch von Nukleinsäuren isoliert werden. Dazu wurde 100 mg Oligo-(dT)-Cellulose (Type 7; Amersham Pharmacia; Freiburg) mit 1 ml Waschpuffer äquilibriert. 500-1000 µg Gesamt-RNA wurden in 600 µl TES-Puffer gelöst, 10 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 75 µl 5 M NaCl und 500 µl Oligo-(dT)-Cellulose-Suspension wurde 15 min bei RT geschüttelt und anschließend 2 min bei 800 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert, 2 min bei RT geschüttelt und erneut 2 min bei 800 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal mit Waschpuffer und dann einmal mit eiskaltem DEPC behandeltem H₂O wiederholt. Durch Zugabe von 400 µl DEPC behandeltem H₂O, 5 min Inkubation bei 55°C, sofortiger Kühlung auf Eis und Zentrifugation für 2 min bei 800 x g erfolgte die Elution der RNA. Dieser Elutionsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Eluate wurden vereinigt und photometrisch (vgl. 3.6.3.1) analysiert. Schließlich wurde die RNA durch Zugabe von Ammoniumacetat und Ethanol präzipitiert (vgl. 3.6.3.2) und als Präzipitat bei -80°C aufbewahrt.

TES-Puffer	10 mM	TRIS-HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA pH 7,5
	0,1% (w/v)	SDS
Waschpuffer	TES-Puffer	
	0,5 M NaCl	

3.6.3 Analyse von Nukleinsäuren

3.6.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Absorption nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm photometrisch bestimmt. Ein Maß für die Reinheit der Präparation ist der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm, der zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm gilt:

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

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

Für Absorptionsmessungen wurde ein GeneQuant II-Photometer (Pharmacia Biotech; Piscataway/ New Jersey) verwendet.

3.6.3.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

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

3.6.3.3 Phenolextraktion von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen, nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) zugegeben, kräftig gemischt und anschließend zur Phasentrennung 3 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde solange wiederholt bis keine Proteininterphase mehr erkennbar war. Anschließend wurden Phenolreste durch wiederholtes Ausschütteln mit einem Volumen Diethylether aus der Nukleinsäurelösung entfernt.

3.6.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit Kettenlängen von 0,5-8 kb wurden in 0,8% (w/v) Agarosegelen, DNA-Fragmente mit Kettenlängen von 0,1-1 kb in 2% (w/v) Gelen getrennt. Für präparative Gele wurde SeaKem GTG-Agarose (Biozym Scientific GmbH; Oldendorf), für analytische Gele NEO-Agarose (Roth; Karlsruhe) verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, auf ca. 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in Gelträger gegossen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA wurde mit 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer Horizontalapparatur bei einer angelegten Spannung von 120 V. Um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Größenstandard (1 kb-Ladder; 0,075-12,2 kb; Invitrogen) in eine Tasche des Gels aufgetragen. Die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

10 x TBE

108 g/l

TRIS-HCl

55 g/l

Borsäure

9,3 g/l

EDTA

pH 8,0

6 x Auftragspuffer	15% (w/v)	Ficoll
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol

3.6.3.5 Auftrennung von Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel (PAGE)

Zur Trennung kleinerer DNA-Fragmente (70-1000 bp) wurden 5% Polyacrylamidgele verwendet. Zur Herstellung wurden 12,5 ml 40% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (39:1), 10 ml 10 x TBE-Puffer und 77,5 ml H₂O gemischt. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 80 µl 30% (w/v) APS und 35 µl TEMED. Für die Elektrophorese wurde die DNA mit 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer versetzt und in einer Vertikalapparatur bei 150-220 V in 1 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde 5-10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,1 µg/ml) inkubiert und anschließend unter UV-Beleuchtung fotografiert.

3.6.3.6 Gelelektrophorese von Ribonukleinsäuren (RNA)

Zur Auftrennung von RNA für Northernblot-Analysen (3.6.8) wurden denaturierende Agarosegele, bestehend aus 1,2% (w/v) Agarose (SeaKem), 4% (v/v) Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer verwendet. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in 5 µl DEPC behandelten Wasser (H₂O_{DEPC}) aufgenommen und mit 12,5 µl Formamid (deionisiert), 4 µl Formaldehyd, 2,5 µl 10 x MOPS und 1 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 55°C und Abkühlen auf Eis für 5 min, wurde die Probe mit 6 x RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet und die Auftrennung erfolgte bei 120 V unter Umwälzen des Laufpuffers.

10 x MOPS	20 mM	N-Morpholinopropansulfonsäure
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA

6 x RNA-Ladepuffer	15% (w/v)	Ficoll
	25% (w/v)	Bromphenolblau

deionisiertes Formamid	50 ml	Formamid
	5 g	Ionenaustauscher MB-1 (Serdolit) 1 h rühren und dann filtrieren, um den Ionenaustauscher zu entfernen

3.6.3.7 Elektroelution

Gelelektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente (vgl. 3.6.3.4) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch (25 mm x 15 mm; Sigma-Aldrich; Taufkirchen) überführt. Nach Zugabe von 350 µl H₂O wurde der Schlauch ohne Lufteinschlüsse mit Klammern verschlossen und in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA wurde bei 135 mA innerhalb von 45 min aus dem Gel eluiert und anschließend durch Ethanolpräzipitation (vgl. 3.6.3.2) isoliert.

3.6.3.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Sanger-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Systems (PE Applied Biosystems; Foster City/CA) und einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 12 µl 500 ng DNA, 1 µl sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer (10 pmol/µl; Tab. 3) sowie 1,5 µl Big Dye-Mix gemischt. Der Reaktionszyklus sah folgendermaßen aus:

95°C	1 min	} 30 Zyklen
95°C	30 sec	
55°C	2 min 30 sec	

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

3.6.4 Amplifikation von Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht die selektive und exponentielle Vermehrung von DNA-Fragmenten ausgehend von einer DNA-Matrize. Man benötigt zu Plus- und Minusstrang komplementäre, gegensinnig orientierte Oligodesoxynukleotide (Primer), die an den zu amplifizierenden Bereich angrenzen und eine

thermostabile DNA-Polymerase (Saiki et al., 1988). Nach der Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA bei 94°C hybridisieren die Primer an die Einzelstränge (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer. Die Kettenverlängerung durch die Polymerase findet dann bei 72°C in Anwesenheit freier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) statt (Elongation). Nach 20 bis 40 facher Wiederholung dieses Zyklus können so durch die Lage der Primer festgelegte DNA-Bereiche, die nur in geringer Kopienzahl im Probenmaterial vorliegen, millionenfach vermehrt werden. Die Entdeckung der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) war die Voraussetzung für die Automatisierbarkeit dieser Technik. Diese Polymerase wird während des DNA-Denaturierungsschrittes nicht geschädigt und muss somit nur vor dem Start der Reaktionszyklen einmalig zugegeben werden.

3.6.4.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Voraussetzung für die Amplifikation von mRNA-Transkripten mit Hilfe der PCR ist die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase. Für diesen, auch als Erststrangsynthese bezeichneten Prozess, wurde ein Kit System (Superscript™ II First-Strand Synthesis System; Invitrogen) verwendet. In einem Gesamtvolumen von 12 µl wurden 4-5 µg Gesamt-RNA, 1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer (0,5 µg/µl) oder 1 µl eines Hexamernukleotidgemisches mit zufälliger Nukleotidfolge (Random-Primer; 50 ng/µl) und 1 µl 10 mM dNTP-Mix bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 ml 10 x Reverse Transkriptase-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; pH 8,4), 4 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl RNase-Inhibitor (RNase Out, 40 Units/µl) sowie 2 µl 0,1 M DTT, wurde 2 min bei 42° inkubiert, dann 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (50 Units/µl) zugegeben und weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 70°C für 15 min gestoppt. Nach Abkühlen auf Eis wurde die RNA durch Zugabe von 1 µl RNaseH (2 Units/µl) 20 min bei 37°C hydrolisiert. 3-5 µl der synthetisierten cDNA wurden als Matrize in einem Endvolumen von 50 µl für die PCR (vgl. 3.6.4) eingesetzt. Für die Klonierung von TRPM3-cDNA aus dem Hirn von Ratte, Ins-1- und GH3-Zellen wurde ein speziell für die Amplifikation langer Fragmente konzipiertes PCR-System verwendet (Long Template PCR System; Roche; Mannheim). Der PCR-Ansatz enthielt 4 µl oligo-(dT) gepimten Erststrang, 2,5 µl dNTP (10 mM) und jeweils 1,5 µl sequenzspezifischen Primer (10 pmol/µl) in einem Volumen von 25 µl (Mix 1). Dieser Ansatz wurde nach Erreichen von 62°C zum Enzymmix (Mix 2), bestehend aus 0,75 µl Enzymen und 5 µl Puffer 3 in einem Volumen von 25 µl, pipettiert.

62°C	Zugabe von Mix 2 zu Mix 1	
94°C	2 min	
94°C	10 sec	} 15 Zyklen
68°C	5 min 30 sec	
94°C	10 sec	} 25 Zyklen
68°C	5 min 30 sec + 20 sec/Zyklus	
68°C	7 min	

3.6.4.2 Ein-Schritt-RT-PCR

Die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente (100-1000 bp), z.B. zur Analytik von Ins-1- und GH3-Zellen, wurde mit einem One-Step-RT-PCR-System (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Bei diesem System wird eine durch einen Antikörper gehemmte Taq-Polymerase verwendet. Erst bei Temperaturen >90°C wird der Antikörper denaturiert und die Polymerase aktiv. So ist es möglich, die Erststrangsynthese bei 50°C mit der Reversen Transkriptase (RT) und die nachfolgende Amplifikation der DNA durch die Platinum Taq-Polymerase im selben Reaktionsgefäß durchzuführen. Es wurden jeweils 10 ng Gesamt RNA als Template verwendet. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 25 µl 2 x Reaktionsmix, 1 µl RT/Platinum Taq-Enzymmix und jeweils 1,5 µl Primer (10 pmol/µl) zugegeben und folgender Reaktionszyklus durchgeführt:

Erststrangsynthese	50°C	30 min	
PCR	94°C	2 min	
	94°C	15 sec	} 15 Zyklen
	60°C	30 sec	
	70°C	30 sec	
	94°C	15 sec	} 25 Zyklen
	60°C	30 sec	
	70°C	30 sec + 2 sec/Zyklus	
	72°C	5 min	

3.6.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung genomischer DNA

Zur Amplifikation und Klonierung genomischer DNA-Fragmente (1000-3000 bp) aus embryonalen Stammzellen der Maus wurde die Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes; Espoo/Finnland) verwendet. Diese Polymerase weist eine besonders hohe Lesegenauigkeit (Fidelity) auf und minimiert somit die Gefahr der Einführung PCR-abhängiger Nukleotidaustausche. Für die Reaktion wurde 1 µl genomische ES-Zell-DNA, 0,5 µl Phusion-Polymerase, 1 µl dNTP (10 mM), 10 µl 5 x Phusion-Puffer HF und jeweils 2,5 µl

Primer (10 pmol/ μ l) in einem Volumen von 50 μ l eingesetzt. Die Zyklenzahl der PCR wurde optimiert und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

98°C	30 sec	}	27 Zyklen
98°C	5 sec		
63°C	20 sec		
72°C	1 min 30 sec		
72°C	5 min		

3.6.4.4 Genotypisierung von Mäusen mit Hilfe der PCR

Es wurde entweder die Schwanzspitze, ein Zeh oder ein ausgestanzter Ohrfleck in 100 μ l 1 x Taq-Puffer/0,2 mg/ml ProteinaseK über Nacht bei 55°C aufgelöst. Nach 20 min Inkubation bei 94°C wurden 2 μ l des Lysats für die PCR eingesetzt. Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind in Tabelle 9 (3.3) aufgelistet. Zusätzlich wurden Mäuse auch mit Hilfe von Southernblot-Analysen genotypisiert (vgl. 3.6.7).

PCR-Ansatz	2 μ l	Lysat
	0,5 μ l	Taq-Polymerase (Genotaq, laboreigene Herstellung)
	5 μ l	10 x Taq-Puffer (100 mM TRIS, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ (pH 8,3))
	1 μ l	dNTPs (10 mM)
	2,5 μ l	Primer 1 (10 pmol/ μ l)
	2,5 μ l	Primer 2 (10 pmol/ μ l)
	ad 50 μ l	H ₂ O

Zyklus	94°C	1:30 min	}	10 Zyklen (-0,5°C T _{anneal} / Zyklus
	94°C	30 sec		
	65°C	30 sec		
	72°C	30 sec		
	94°C	30 sec	}	26 Zyklen
	60°C	30 sec		
	72°C	30 sec		
	72°C	5 min		

3.6.5 Enzymatische Modifikationen von Nucleinsäuren

3.6.5.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsendonukleasen und Puffer der Firma New England Biolabs (NEB; Schwalbach) verwendet. DNA wurde in einer Endkonzentration zwischen 50 und 500 ng/ μ l eingesetzt und unter den geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen mit 1-10 Einheiten (U) Enzym pro μ g DNA hydrolysiert. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde durch Gelelektrophorese (3.6.3.4) überprüft. Zur Hydrolyse genomischer DNA wurden 10-30 μ l der genomischen DNA (vgl. 3.6.2.1) in einem Volumen von 35 μ l mit 50-60 U Restriktionsendonuklease unter den geeigneten Pufferbedingungen über Nacht bei 37°C im Inkubationsrüttler (Haep Labor Consult; Bovenden) hydrolysiert.

3.6.5.2 Phosphorylierung und Glätten von Nucleotidüberhängen von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden vor der Ligation in einen Vektor mit Hilfe der T4-Polynucleotidkinase (T4-PNK) phosphoryliert, da die verwendeten Oligonucleotidprimer synthesebedingt keine 5'-Phosphatgruppen besitzen. Bei Verwendung des Long Template PCR Systems (vgl. 3.6.4.1) entstehen Amplifikate, die einen 3'-Adenosin-Überhang aufweisen. Um die Überhänge zu entfernen und glatte DNA-Enden herzustellen, wurde die Exonuklease-Aktivität der T4-DNA-Polymerase (Roche; Mannheim) genutzt. Durch Phenolextraktion (vgl. 3.6.3.3) und Ethanolpräzipitation (vgl. 3.6.3.2) wurde zunächst die Polymerase entfernt. Die PCR-Produkte wurden in 22,75 μ l H₂O gelöst und zu der Nucleinsäurelösung wurden 1,25 μ l dNTP (1,25 mM), 2 μ l T4 PNK (10Units/ μ l), 1 μ l T4-DNA-Polymerase (1 Unit/ μ l) und 3 μ l 10 x Ligasepuffer (NEB) pipettiert. Der verwendete 10 x Ligasepuffer enthält das zur Phosphorylierung notwendige ATP in einer Konzentration von 10 mM. Der Reaktionsansatz wurde 40 min bei 37°C inkubiert bevor die Enzyme durch Inkubation für 10 min bei 75°C inaktiviert wurden.

3.6.5.3 Hybridisierung komplementärer Oligodesoxyribonucleotide

Jeweils 30 μ l komplementärer Oligodesoxyribonucleotide (10 pmol/ μ l) wurden vermischt und 5 min auf 95°C erhitzt bevor das Nucleinsäuregemisch langsam bis auf Raumtemperatur abkühlte. Durch das langsame Sinken der Temperatur lagerten sich die komplementären Stränge zu einer doppelsträngigen DNA aneinander. Von diesem Ansatz wurde 1 μ l für Ligationen (vgl. 3.6.5.5) eingesetzt.

3.6.5.4 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um eine Selbstligation von Vektor-DNA zu vermeiden, wurden freie 5'-Phosphatgruppen, die bei der Restriktion entstanden waren, vor der Ligationsreaktion mit Hilfe alkalischer

Phosphatase (CIP; Roche; Mannheim) entfernt. 5 bis 10 µg geschnittener Vektor-DNA wurden mit 10 µl 10 x CIP-Puffer und 1 bis 2 Einheiten (U) Phosphatase in einem Endvolumen von 100 µl 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch 20 min Inkubation bei 65°C inaktiviert oder durch Phenolextraktion (vgl. 3.6.3.3) entfernt.

3.6.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller (NEB; Schwalbach) gelieferten Puffer durchgeführt. 50-200 ng Vektor-DNA wurde zum Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit 1 Unit Ligase 12-14 h bei 16°C in einem Gesamtvolumen von 15 µl inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation (vgl. 3.6.1.3) verwendet.

3.6.6 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1984) entwickelten Verfahrens (Random-Priming) radioaktiv markiert, um sie als Sonden zur Hybridisierung im Rahmen von Northern- oder Southernblot-Analysen zu verwenden. Dabei hybridisieren Hexadesoxyribonukleotide zufälliger Sequenzabfolge (Random-Primer) an statistisch verteilte, komplementäre Bereiche einzelsträngiger DNA. Sie dienen als Primer für eine Polymerisationsreaktion mit Hilfe der Klenow-Polymerase I in Anwesenheit radioaktiv markierter Desoxyribonukleotide. 25-50 ng dsDNA-Fragmente wurden in 45 µl H₂O gelöst, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Die DNA wurde dann zu einem fertigen Gemisch aus dATP, dGTP, dTTP, Klenow-Polymerase I und Reaktionspuffer (Rediprime Random Labelling Kit; Amersham Biosciences, Piscataway/New Jersey) gegeben. Es wurden 50 µCi [α -³²P]-dCTP (6000 Ci/mmol) hinzugefügt und dieser Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden durch Gelfiltration (Sephadex G-50, Nick-Säulen, Amersham Biosciences, Piscataway/New Jersey) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz auf eine mit 1 x TE-Puffer äquilibrierte Säule gegeben, mit 1,4 ml 1 x TE-Puffer eluiert und Fraktionen von je 200 µl gesammelt. Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden in Fraktion 3, nicht eingebaute Nukleotide in den Fraktionen 5-7 gesammelt und durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Szintillationszähler (Wallac 1410 Liquid Scintillation Counter; Perkin Elmer, Waltham/Massachusetts) quantifiziert.

1 x TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA, pH 8,0

3.6.7 Southernblot

10-30 µl gespaltene genomische DNA (vgl. 3.6.5.1) wurde in einem 0,6% Agarosegel elektrophoretisch getrennt (vgl. 3.6.3.4). Das Gel wurde anschließend 30 min in 0,25 M HCl, dann für 30 min in Denaturierungspuffer und schließlich in Neutralisierungspuffer für weitere 30 min inkubiert. Danach folgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N, GE-Healthcare) mit Hilfe von Kapillarkräften. Der Aufbau eines solchen sogenannten „Kapillarblots“ ist unter 3.6.8 beschrieben. Als Transferpuffer diente 10 x SSC. Nach dem mindestens 16 h Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (1200 µJ/cm² im UV-Stratalinker, Stratagene) und Backen für mindestens 2 h bei 80°C auf der Nylonmembran fixiert.

0,25 M HCl	20,76 ml	HCl 37%
	ad 1000 ml	H ₂ O bidest
Denaturierungspuffer	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M	TRIS-HCL pH 7,5
	3 M	NaCl
10 x SSC	150 mM	Natriumcitrat
	1,5 M	NaCl

Die Membran wurde in Church-Puffer (Church and Gilbert, 1984) für mindestens 2 h prähybridisiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte über Nacht in frischem Church-Puffer nach Zugabe von 10⁷ dpm/ml der radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (5 min 96°C, 5 min auf Eis). Sowohl die Prähybridisierung als auch die Hybridisierung fanden in einem Plastikbeutel bei 65°C statt, wobei 1 ml Hybridisierungslösung pro cm² Membran eingesetzt wurde. Ungebundene Sondenmoleküle wurden nach der Hybridisierung durch Waschen mit SSC/0,1% SDS-Waschlösungen bei 65°C im Schüttelwasserbad, wie unter 3.6.8 beschrieben, entfernt. Die Membran wurde auf einem Phosphoimagerscreen (Fujifilm 2500, Raytest) für mindestens 5 h exponiert und Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe des Phosphoimagers Basreader (Raytest GmbH; Straubenhardt) sichtbar gemacht.

Church-Puffer	0,5 M	Natriumphosphatpuffer
	1% (w/v)	BSA
	7% (w/v)	SDS
	1 mM	EDTA
	0,1 mg/ml	Lachssperma-DNA

3.6.8 Northernblot

Elektrophoretisch getrennte RNA (vgl. 3.6.3.6) wurde mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Hybond N; Amersham Biosciences, Piscataway/New Jersey) übertragen. In einer Wanne mit einem in 20 x SSC getränkten Sponteschwamm wurde zuerst Whatman 3M-Papier (Whatman, Fisher Scientific, Schwerte), dann das Formaldehydgel, eine auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran (Hybond N, GE-Healthcare) und wieder Whatman 3M-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Darüber wurde eine Schicht von 15-20 cm Zellstoff gestapelt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem 1 kg Gewicht beschwert. Zur Vermeidung von Pufferbrücken wurden Parafilmstreifen rund um das Gel gelegt. Nach Transfer über Nacht wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Energie von 1200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ im UV-Stratalinker (Stratagene) mit der Nylonmembran kovalent verknüpft und anschließend 2 h bei 80°C gebacken.

Die Membran wurde in eine Glasröhre mit 10 ml Hybridisierungslösung überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei 65°C, dann mindestens 2 h bei 42°C in einem Hybridisierungsofen unter ständigem Drehen inkubiert. Die radioaktive DNA-Sonde (vgl. 3.6.6) wurde 5 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Der Hybridisierungslösung wurden 10⁷ dpm/ml Sonde zugegeben und dann mit der Membran über Nacht bei 42°C inkubiert. Ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden durch Waschen mit SSC/0,1% SDS entfernt. Die Salzkonzentration betrug anfänglich 2 x SSC/0,1% SDS und wurde je nach gewünschter Stringenz bis auf 0,1 x SSC/0,1% SDS verringert. Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und gegen einen Röntgenfilm in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolien exponiert.

20 x SSC	300 mM	Na-Citrat
	3 M	NaCl, pH 7,0
Hybridisierungslösung:	50% (v/v)	deionisiertes Formamid
	5 x	SSC
	0,1% (w/v)	Natriumdiphosphat
	1,0% (w/v)	SDS
	0,25% (w/v)	Ficoll (MG 400000)
	0,25% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon (MG 40000)
	6,25 mM	EDTA
	0,15 mg/ml	DNA aus Lachssperma (vor Zugabe 5 min bei 100°C denaturieren)

3.7 Proteinchemische Methoden

3.7.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryontischen Zellen

Zellen aus 4-5 Kulturschälchen (Ø 3 cm, 70-90% konfluent) wurden einmal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 1 x Trypsin/EDTA (vgl. 3.5.1) gelöst und 5 min bei 150-200 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100-200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und 30 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von Proteaseinhibitoren und durch permanente Kühlung des Lysats wurde einer Degradation der Proteine entgegengewirkt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. 3.7.2) wurde das Lysat mit dem gleichen Volumen 2 x Lämmli-Puffer gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

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

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

3.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Dabei wurden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) getrennt, sodass durch Neutralisierung aller positiven Ladungen die Proteine im Wesentlichen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts zur Anode wandern. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde dem Proteinauftragspuffer (2 x Lämmli-Puffer) kurz vor Verwendung β -Mercaptoethanol zugegeben (s.o).

Die Proteinlysate wurden 30 min bei 37°C denaturiert und in die Taschen eines Vertikalgels appliziert. Proteine wurden in 1 x SDS-Elektrophoresepuffer bei einer angelegten Spannung von 100-150 V getrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsstandard (Kaleidoscop prestained standards; 6,9-210,2 kD; BioRad, Hercules/CA) in eine benachbarte Probenauftragstasche appliziert.

Sammelgel (4%)	125 mM	TRIS-HCl, pH 6,8
	0,1% (w/v)	SDS
	4% (v/v)	Acrylamid (40% Acrylamid: Bisacrylamid 29:1)
	0,075% (w/v)	APS
	0,15% (v/v)	TEMED

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

3.7.4 Westernblot

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine (vgl. 3.7.3) wurden wie folgt auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C extra; Amersham Biosciences; Piscataway/New Jersey) übertragen: Auf ein in Blottingpuffer getränktes Schwammtuch wurden zwei Lagen Whatman 3M-Papier (Whatman, Fisher Scientific), dann das Proteingel, eine auf Gelgröße zugeschnittene Membran, zwei Lagen Whatman 3M-Papier und abschließend ein Schwammtuch luftblasenfrei aufgelegt, in eine Gitterkassette gelegt und in eine Blottingapparatur (Biorad; Hercules/CA) eingespannt. Zum Transfer der Proteine wurde ein Strom von 350 mA für 90 min bei 4°C angelegt.

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

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 1 h in 5% Magermilchpulver/TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% BSA/TBS erfolgte über Nacht bei 4°C. Nachdem überschüssiger Antikörper durch 3 x 10 min Waschen mit TBS/10%Tween 20 entfernt worden war, folgte 1 h Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in 5% Magermilchpulver/TBS bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten für 10 min mit TBS/10%Tween wurde die Peroxidaseaktivität durch Chemiluminiszenz mit Hilfe des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Waltham/Massachusetts) und Exposition für 30 sec bis 60 min gegen einen Röntgenfilm (Amersham Biosciences, Piscataway/New Jersey) sichtbar gemacht.

10 x TBS	500 mM	TRIS-HCl pH 7,5
	1,5 M	NaCl

3.7.5 Immuncytochemische Färbung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger in Kulturmedium ausgesät und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Sie wurden mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd/PBS 10 min fixiert und mit 0,05% TritonX100/TBS 1 min permeabilisiert. Nach Blockierung für 1-3 h in 5% BSA/TBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% BSA/TBS über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde ungebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und der Objektträger eine Stunde mit einem Alexa594-gekoppelten Zweitantikörper (1:1000 verdünnt in 5% BSA/TBS) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem überschüssiger Zweitantikörper durch dreimal waschen mit PBS entfernt worden war, wurden 80 µl 75% Glycerin/PBS und ein rechteckiges Glasplättchen auf die Zellen aufgebracht und am Rand mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C. Die Antikörperfärbung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss AG, Göttingen), einer aufgesetzten CCD-Kamera und der Software AxioVision Rel.4.6 (Carl Zeiss AG, Göttingen) fotografisch dokumentiert und quantitativ ausgewertet.

3.8 Methoden zur Herstellung einer transgenen Maus

3.8.1 Kultivierung von ES-Zellen

Es wurden embryonale Stammzellen (ES) der Linie R1 verwendet. Diese Zellen stammen aus einer männlichen Maus des Hybridstamms 129/Sv x 129/SvJ (Nagy et al., 1993) und wurden vor Inkulturnahme bereits 16 mal passagiert. Die Mäuse dieses Stammes besitzen eine bräunliche Fellfarbe, die durch das Agouti-Gen bestimmt wird und dominant gegenüber dem Gen für die schwarze Fellfarbe ist. Die ES-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer gesättigten Wasserdampf-Atmosphäre, wie in Tabelle 12 beschrieben, kultiviert. Auf Antibiotika wurde bei der Kultivierung verzichtet.

Tab. 12: Kultivierung von ES-Zellen in verschiedenen Kulturgefäßen

Oberfläche des Kulturgefäßes (cm ²)	Kulturmedium (ml)	Trypsin zum Lösen der Zellen bei der Passage (ml)
0,32 (96-Loch)	0,25-0,3	0,05-0,08
2 (24-Loch)	1	0,2-0,25
9,6 (6-Loch)	2	0,5-0,8
25	3-4	1
75	10	2
175	18-20	4-5

Die Zellen wachsen als rundliche, klar abgegrenzte Kolonien. Eine beginnende Differenzierung der ES-Zellen zeigt sich dadurch, dass sich die Kolonien abflachen und keine klaren Abgrenzungen mehr zu erkennen sind. Da die Pluripotenz der Zellen auf jeden

Fall erhalten bleiben muss, wurde das Wachstumsstadium ständig mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ins Kulturmedium (ESL) wurde einer Differenzierung der Zellen entgegengewirkt. Embryonale Fibroblasten (Feeder) wurden in Cokultur mit den ES-Zellen gehalten (vgl. 3.8.2), da sie geringe Mengen LIF sezernieren und das Anheften der ES-Zellen erleichtern. Dem Kulturmedium zugesetztes fötales Kälberserum wurde vor der Zugabe 20 min auf 56°C erhitzt, um unerwünschte Enzymaktivitäten zu mindern. Da embryonale Stammzellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase sehr schnell proliferieren, wurde die Nährlösung täglich erneuert. Üblicherweise alle 2-3 Tage wurden die ES-Zellen in neue Kulturgefäße überführt und expandiert (3.8.4).

ESL-Medium	400 ml	DMEM mit Glutamax (# 31966-02; Invitrogen)
	100 ml	Fötales Kälberserum (# S0115/ LotNr. 437 A Biochrom; Berlin)
	5 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (# 11140-035; Invitrogen)
	3,5 µl	β-Mercaptoethanol (# M7522; Sigma-Aldrich)
	1 ml	LIF (ESGRO ^R , 5 x 10 ⁵ U/ml; #ESG1107, Chemicon/Millipore, Billerica)

3.8.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten (Feeder-Zellen)

Embryonale Fibroblasten wurden aus Mausembryos, welche heterozygot das Phosphotransferase-Gen trugen, am Tag 14,5 der Embryonalentwicklung präpariert. Die Zellen dieser Tiere sind resistent gegen das Antibiotikum Neomycin. Der Kopf sowie die inneren Organe wurden entfernt und der Rest nach Waschen mit PBS ohne Calcium/Magnesium mit einer Schere in möglichst kleine Stücke geschnitten. Der Zellverband wurde durch Inkubation mit 1 x Trypsin (1 ml 1 x Trypsin pro Embryo, 5-10 Minuten bei 37°C) aufgelöst. Nach Scheeren der Gewebesuspension mit einer 25 ml, einer 10 ml, einer 5 ml und schließlich mit einer 1 ml Pipette wurde die Reaktion durch Zugabe von EF-Medium gestoppt. Nachdem die Zelltrümmer nach 5-10 Minuten abgesunken waren, wurden die Fibroblasten im Überstand auf zwei 175 cm² Zellkulturflaschen verteilt, in EF-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre 6 Tage bis zur Konfluenz des Zellrasens inkubiert und dann geerntet. Die Zellen wurden durch zweimalige Bestrahlung mit jeweils 30 Gray in der radiologischen Klinik der Universitätsklinik Homburg/Saar mitotisch inaktiviert, in 6 Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff in EF-Medium/10% DMSO gelagert.

PBS

(ohne Calcium und Magnesium) 500 ml PBS (# 14190-094; Invitrogen)
Zugabe von 0,2 mM EDTA (pH 8,0)

1 x Trypsin	10 ml	10 x Trypsin/ EDTA (# T4174; Sigma-Aldrich)
	90 ml	PBS ohne Calcium/ Magnesium

EF-Medium	450 ml	DMEM mit Glutamax (# 31966-02, Invitrogen)
	50 ml	Fötales Kälberserum (# 104370-028, Invitrogen)
	5 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (# 11140-035, Invitrogen)

3.8.3 Inkulturnahme kryokonservierter ES-Zellen

Am Tag vor der Inkulturnahme wurden die Zellen dem Stickstofftank (-196°C) entnommen und bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor Inkulturnahme wurden sie aus dem -80°C Gefrierschrank genommen, schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 11 ml ESL-Medium aufgenommen. Nach Sedimentation für 5 min bei 1000 rpm (Hermle-Zentrifuge Z320, Rotor 22072V01) wurden die Zellen zum Entfernen von DMSO-Rückständen noch zweimal in 11 ml ESL-Medium resuspendiert und zentrifugiert. Nach Scheeren der Zellen mit einer Pasteurpipette, deren Öffnung durch Hitzeeinwirkung verengt worden war, wurden die Zellen in einer passenden Menge ESL-Medium (vgl. Tab. 12) aufgenommen und auf Feeder-Zellen verteilt, die am Tag zuvor auf gleiche Weise in einer Zelldichte von ca. 30% in EF-Medium ausgesät worden waren.

3.8.4 Passage von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden zweimal mit PBS ohne Calcium/Magnesium gewaschen, bevor sie mit Hilfe von 1 x Trypsin (vgl. Tab. 12) und 3 min Inkubation bei 37°C von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und in 11 ml ESL-Medium aufgenommen wurden. Nach Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, Hermle-Zentrifuge Z320, Rotor 22072V01Z) und einmaligem Waschen mit ESL-Medium wurden die Zellen in ESL-Medium resuspendiert (vgl. Tab. 12). In der Regel wurden die ES-Zellen alle 2-3 Tage passagiert und 1:4 bis 1:12 verdünnt.

3.8.5 Kryokonservierung von ES-Zellen

10^6 Zellen wurden in 1 ml ESL-Medium/10% DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Es folgten mindestens 15 min Inkubation auf Trockeneis, bevor die Zellen schließlich bei -80°C gelagert wurden. Bei dieser Temperatur lassen sich die ES-Zellen maximal drei Monate aufbewahren. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zum Einfrieren von ES-Zellen in 96-Lochplatten wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Calcium/Magnesium mit $50\ \mu\text{l}$ 1 x Trypsin behandelt und nach 3 min Inkubation bei 37°C direkt in $230\ \mu\text{l}$ ESL/12,2% DMSO (Endkonzentration 10% DMSO) resuspendiert. Die 96-Lochplatte wurde mit einer frostsicheren Plastikfolie (SealView; Neolab; Heidelberg) versiegelt.

3.8.6 Elektroporation von ES-Zellen

$100\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA wurden mit Ascl 4 h bei 37°C hydrolysiert. Das Enzym wurde 20 min bei 65°C inaktiviert. Die DNA wurde durch Phenolextraktion (vgl. 3.6.3.3) gereinigt und durch Zugabe von Natriumacetat und Ethanol präzipitiert (vgl. 3.6.3.2). Die präzipitierte DNA wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze herausgefischt und in ein frisches Reaktionsgefäß zum Trocknen überführt. Nach Lösen der DNA in PBS ($\sim 600\ \mu\text{l}$) wurden 5, 10 und $15\ \mu\text{l}$ auf einem 0,8% Agarosegel aufgetragen und die DNA-Menge mit einem DNA-Standard gegebener Konzentration abgeschätzt. Für die Elektroporation wurden ca. $40\ \mu\text{g}$ DNA in einem Volumen von $600\ \mu\text{l}$ PBS verwendet. 3 h vor der Elektroporation wurde das Kulturmedium der ES-Zellen erneuert. Die Zellen von sechs $75\ \text{cm}^2$ Kulturflaschen (ca. 10^7 Zellen) wurden sedimentiert (5 min, 1000 rpm, Hermle-Zentrifuge Z320, Rotor 22072V01Z) und in der DNA-Lösung resuspendiert. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette (Polabstand 0,4 cm, Biorad, Hercules/ CA) überführt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach ohne zusätzlichen Widerstand einer Spannung von 0,8 kV ($3\ \mu\text{F}$, Biorad-Pulser) ausgesetzt. Nach dem Spannungspuls und 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen in 60 ml ESL-Medium resuspendiert und auf sechs Kulturschalen ($\varnothing 10\ \text{cm}$) mit Feeder-Zellen verteilt.

3.8.7 Selektion rekombinanter ES-Zellen

Einen Tag nach der Elektroporation begann die Selektion der rekombinanten ES-Zellen mit G418 (Endkonzentration $250\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Invitrogen) und weitere 24 h danach die zusätzliche Selektion mit Ganciclovir (Endkonzentration $2\ \mu\text{M}$; Roche; Mannheim). Ganciclovir wurde dem Medium immer frisch zugesetzt, da es unter Kulturbedingungen instabil ist. Um massenhaft absterbende Zellen zu entfernen, erfolgte ein Mediumwechsel in den ersten 3 - 5 Tagen der Selektion zweimal täglich, danach einmal täglich. Nach ungefähr einer Woche

waren nicht resistente Zellen abgestorben. Nach ca. 2 Wochen wurden rekombinante Klone als weiße Flecken von ca. 1 mm Durchmesser in der Kulturschale erkennbar. Diese Klone wurden unter der Sterilbank mit Hilfe eines Stereomikroskops isoliert: Dabei wurde die Kolonie mit einer 200 µl Pipettenspitze mit Filtereinsatz vorsichtig abgelöst, mit möglichst wenig Medium aufgesaugt und in ein Loch einer 96-Lochplatte mit 50 µl 1 x Trypsin überführt. Durch Scheeren mit der Pipette und Inkubation für 5 min bei 37°C wurde der Zellverband aufgelöst und die Zellsuspension anschließend in ein Loch einer 96-Lochplatte mit 200 µl ESL-Medium überführt. Diese „Meisterplatten“ dienten - nach Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone - zur Kultivierung und Expansion der Zellen. Das Medium der Meisterplatten wurde täglich gewechselt und die Zellen permanent im Hinblick auf ihre Dichte und Morphologie untersucht und bewertet. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die ES-Zellklone entweder einzeln in Kryoröhrchen oder in der 96-Lochplatte weggefroren (vgl. 3.8.5). Aus der Meisterplatte wurden durch Entnahme von 2 x 50 µl der Zellsuspension und Überführen in je zwei Löcher von 96-Lochplatten zwei Replica-Platten hergestellt. Die Zellen dieser Platten dienten zur Isolierung genomischer DNA (vgl. 3.6.2.1) und nach Austausch des Mediums mit ESL/G418/Ganciclovir am folgenden Tag wurden sie bis zur Konfluenz des Zellrasens inkubiert.

3.8.8 Injektion rekombinanter ES-Zellen in Blastozysten

Die Zellen von sechs 75 cm²-Kulturflaschen (ca. 10⁷ Zellen) wurden sedimentiert (5 min, 1000 rpm, Hermle-Zentrifuge Z320, Rotor 22072V01Z), in 14 ml ESL-Medium aufgenommen, auf zwei Kulturschalen (Ø 10 cm) verteilt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Trennung der Feeder-Zellen und ES-Zellen. Die Feeder-Zellen sinken aufgrund ihrer Größe schneller ab und werden adhärent, während die ES-Zellen länger in Suspension bleiben und mit der Pipette abgesaugt werden können. Dieser Schritt wurde 2-3 mal wiederholt, bis sich nahezu keine Feeder-Zellen mehr absetzten. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die ES-Zellen in einer Dichte von 2-4 x 10⁵ Zellen/ml in ES-Transportmedium resuspendiert.

ES-Transportmedium	ESL-Medium	
	20 mM	Hepes (Invitrogen)
	50 U/ml	Penicillin (Invitrogen)
	50 µg/ml	Streptomycin (Invitrogen)

Die Blastozysteninjektion der ES-Zellen und Implantation der Blastozysten in Ammenmäuse wurde am Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH) in Heidelberg von Herrn Frank Zimmermann vorgenommen. Die Blastozysten stammten von Weibchen des

Inzuchtstammes C57Bl/6N und befanden sich im Embryonalstadium Tag 2.5 p.c. Scheinschwangere Mäuse wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Böcken erzeugt.

3.8.9 Verwendete Mauslinien

Informationen zu verwendeten Mauslinien können unter <http://www.jaxmice.jax.org> eingesehen werden.

Die Inzuchtlinien C57Bl/N6 und 129/SvJ

Ein Inzuchtstamm ist definiert als eine Linie, die durch wiederholte Bruder-Schwester-Verpaarungen über mehr als 20 Generationen entstanden ist. Alle Tiere dieser Linie sind für alle genetischen Loci, ausgenommen Spontanmutationen, homozygot (Altman and Katz, 1979; Morse, 1978) Heute sind mehr als 500 Inzuchtlinien bekannt. Jede hat eine standartisierte Nomenklatur, welche Linie und Sublinie kennzeichnet. Der in der Bezeichnung enthaltene Schrägstrich kennzeichnet die Linie als Inzuchtstamm, beispielsweise C57Bl/6N oder 129/SvJ. Beide Inzuchtlinien wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, USA) bezogen.

Die Cre-Deleter Maus

Bei der Cre-Deleter Maus (Schwenk et al., 1995) wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors (CMV-Promotor) nur in der frühen Embryogenese exprimiert und ist in allen Körperzellen aktiv, inklusive der Keimzellen. Das Transgen ist dabei X-chromosomal gekoppelt, denn es wird von männlichen Tieren nur an weibliche Nachkommen weitergegeben. Enthält ein Gen mehrere loxP-Sequenzen, so wird durch die Aktivität der Cre-Rekombinase die gesamte Sequenz zwischen der ersten 5'-gelegenen und letzten 3'-gelegenen loxP-Sequenz entfernt.

Die Ella-Cre-Maus

Bei der Ella-Cre-Maus (Lakso et al., 1996) wird die Cre-Rekombinase stabil unter der Kontrolle des adenoviralen Ella-Promotors exprimiert, welcher nur in Oozyten und Präimplantationsstadien, also nur im frühen Embryonalstadium, aktiv ist. Bei Vorhandensein mehrerer loxP-Sequenzen in dem Targeting-Allel kann es zu einer Mosaik-Bildung kommen.

Die Flp-Maus

Mäuse der transgenen Flp-Linie exprimieren die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des β -Actin-Promotors. Dieser Promotor ist sowohl in somatischen als auch in Keimzellen aktiv. Mit Hilfe der Flp-Rekombinase werden Sequenzen, welche zwischen zwei FRT-Sequenzen liegen, entfernt (Dymecki and Tomaszewicz, 1998).

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

Zur funktionellen Analyse von TRPM3-Ionenkanälen wurde der ratiometrische Calciumindikatorfarbstoff FURA-2-AM (Molecular Probes, Palo Alto/CA) verwendet. Dieser Acetoxymethyl (AM)-Ester kann Zellmembranen passieren. Nach Abspaltung der Acetoxymethylgruppe durch zelleigene Esterasen wird FURA-2 in der Zelle zurückgehalten. FURA-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator. Die Ca^{2+} -gebundene Form wird durch Licht der Wellenlänge 340 nm, die ungebundene Form bei 380 nm angeregt und es wird jeweils Licht der Wellenlänge 485 nm emittiert. Durch Bildung des Quotienten der Fluoreszenzemission nach Exzitation mit Licht der Wellenlängen 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}) läßt sich die Calciumionenkonzentration, unabhängig von Zellgröße und FURA-2-Konzentration bestimmen.

Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (\varnothing 3 cm) ausplattiert, einmal mit 1,5 ml Puffer S/2Ca oder S/1Ca (Tab. 13) gewaschen und 30 - 60 min mit 5 μM FURA-2 AM in 1,5 ml Puffer S/2Ca oder S/1Ca im Dunkeln bei RT geladen. Danach wurden die Zellen einmal mit Puffer S/2Ca oder S/1Ca gewaschen, bevor das Deckgläschen in eine Perfusionskammer eingespannt und die Messung gestartet wurde. Während der gesamten Messung wurden die Zellen mit Puffer bei einer Flußrate von ~ 1 ml/min perfundiert. Pregnenolonsulfat (# P162; Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 30 μM in Puffer S/2Ca oder S/1Ca durch Ultraschall 5 min gelöst.

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

Alle grafischen Darstellungen und Berechnungen wurden mit dem Programm Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northhampton/USA) erstellt und wenn nicht anders angegeben wurde der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) errechnet. Die Daten wurden mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse (Anova) statistisch geprüft. Zum Vergleich der Ca^{2+} -Antworten verschiedener Gruppen untereinander wurden die innerhalb jeder Gruppe gemittelten Maximalantworten (F_{340}/F_{380}) nach Stimulation, normiert auf den Ausgangswert vor Stimulation, verglichen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde Puffer S in Gegenwart verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen verwendet (Tab. 13). Dabei bedeutet S/1Ca, dass dieser Puffer zusätzlich 1 mM Ca^{2+} -Ionen enthält. Puffer S/0Ca bedeutet, dass dem Puffer S kein Calcium zugefügt wurde, und nur die im Wasser enthaltenen Ca^{2+} -Ionen (~ 20 nM) vorhanden waren.

Tab. 13: Für FURA-Messungen verwendete Pufferlösungen

Substanz	Puffer S	Puffer MVF	Puffer 135Na	Puffer S/EGTA
NaCl (mM)	135	-	135	135
KCl (mM)	5,4	-	-	5,4
MgCl ₂ (mM)	2	-	-	2
CaCl ₂ (mM)		10	10	-
Glucose (mM)	20	260	10	20
Hepes (mM)	10	10	10	10
EGTA (mM)	-	-	-	2

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von TRPM3 in verschiedenen Zellen und Geweben

4.1.1 Northernblot

Zur Identifizierung TRPM3-exprimierender Zellen wurden Northernblot-Analysen von unterschiedlichen Zelllinien und Geweben durchgeführt (Abb. 11). Als Sonden wurden radioaktiv markierte SstI/XhoI-Fragmente der Länge 666, 794, 978, 1395 und 1479 bp des Plasmids MycTRPM3 α 1-pCAGGSM2-IRES-GFP verwendet. Sie umspannen den gesamten codierenden Bereich der TRPM3-cDNA.

TRPM3 wird stark im Gehirn von Maus und Ratte exprimiert. Besonders unter Berücksichtigung der sehr schwachen Signale, die nach Hybridisierung mit GAPDH-Kontrollsonden erhalten wurden, zeigte sich eine auffällig starke Expression von TRPM3-Transkripten im Plexus choroideus (Abb. 11). Dieses Gewebe bildet die Blut-Liquor-Schranke, bildet die Cerebrospinalflüssigkeit und kontrolliert deren Zusammensetzung. Die gezeigten Daten stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die nach *in situ* Hybridisierungsexperimenten mit TRPM3-Sonden erhalten wurden (Oberwinkler et al., 2005) und weisen auf eine mögliche Beteiligung von TRPM3-Kanälen an der Regulation der Ionenzusammensetzung der Cerebrospinalflüssigkeit hin. Die aus Plexus choroideus-Epithelzellen der Ratte stammende Zelllinie Z310 (Zheng and Zhao, 2002) zeigte überraschenderweise eine deutlich schwächere TRPM3-Expression von nur verkürzten Transkripten. Offensichtlich veränderte die Immortalisierung der Zellen mit einem viralen Plasmid oder die nachfolgende Kultivierung der Zellen die Genexpression von TRPM3 (Zheng and Zhao, 2002). Auch Zellen der Hypophyse der Maus exprimieren TRPM3-Transkripte (Abb. 11). Der Hormonsekretion dieser Drüse kommt eine übergeordnete Rolle bei der Regulation des endokrinen Systems im Körper zu. Prolaktin- und Wachstumshormon-sekretierende GH3-Zellen, welche von der Adenohypophyse der Ratte abstammen (Tashjian, Jr. et al., 1970), zeigten ebenfalls TRPM3-Expression (Abb. 11) und lassen eine hormonelle Steuerfunktion von TRPM3-Kanälen in der Hypophyse vermuten. Auch Zellen der Zelllinie Ins-1, welche von β -Zellen aus Langerhans-Inseln des Pankreas stammen, exprimieren TRPM3-Transkripte (Abb. 11). β -Zellen sind für die Insulinsekretion und somit für die Regulation des Zuckerhaushalts im Körper von Bedeutung. Da die Insulinausschüttung durch Ca^{2+} -Signale ausgelöst wird, ist eine Beteiligung von TRPM3 an der Steuerung der Insulinfreisetzung naheliegend.

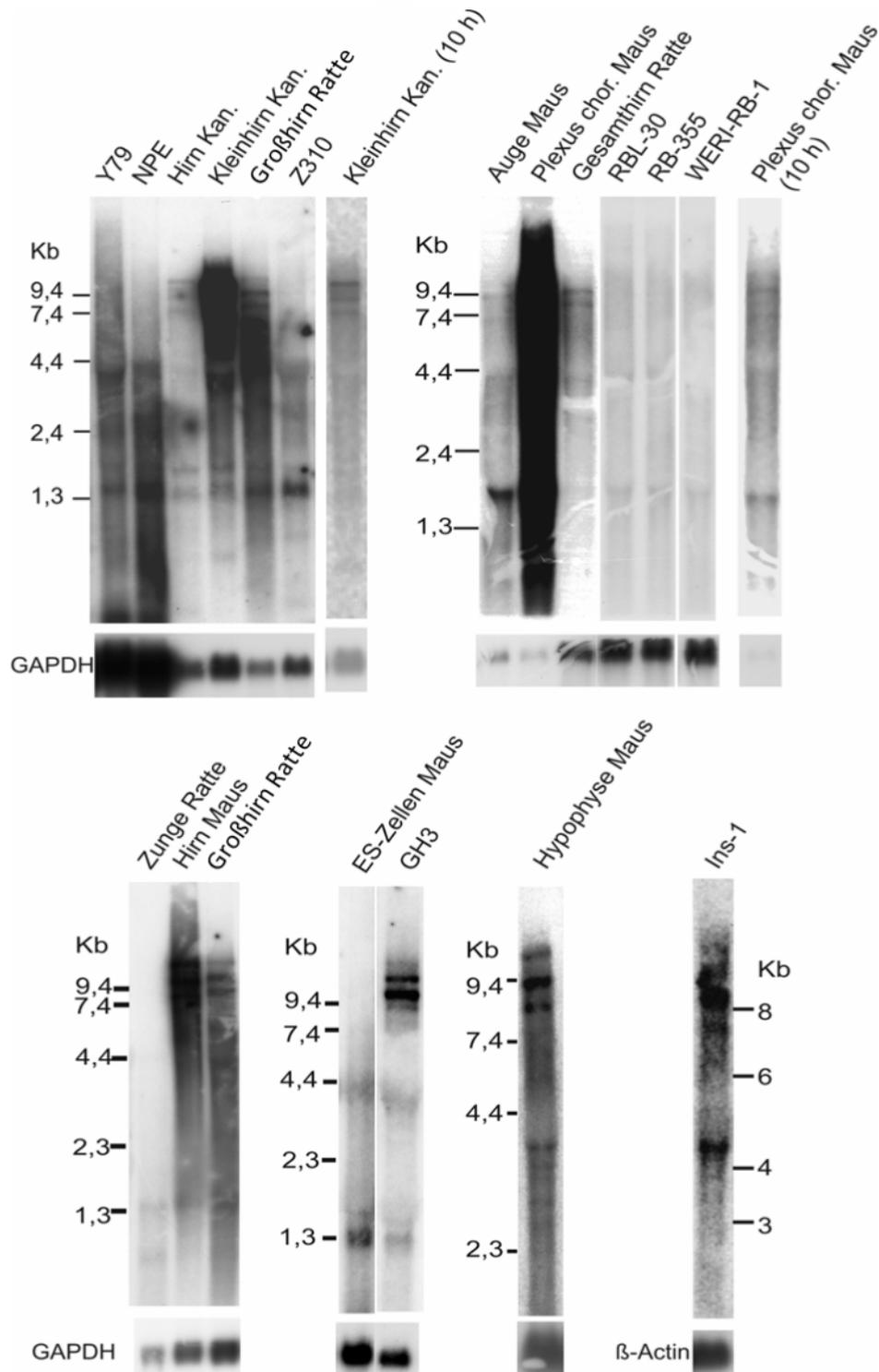


Abb. 11: Northernblot-Analysen der TRPM3-Expression

10 µg Poly(A)⁺-RNA (Y79, NPE, Hirn Kaninchen, Kleinhirn Kaninchen, Großhirn Ratte, Z310, Zunge Ratte, Hirn Maus) oder 20 µg Gesamt RNA (Auge Maus, Plexus choroideus Maus, RBL-30-, RB-355-, WERI-RB-1-, GH3-, Ins-1-, ES-Zellen, Hypophyse Maus) wurden gelelektrophoretisch getrennt (vgl. 3.6.3.6), auf eine Nylonmembran übertragen und mit TRPM3-Sonden hybridisiert. Nach 21 Tagen Exposition der Membran gegen einen Röntgenfilm wurden die Filter zur Kontrolle mit der cDNA der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder bei Ins-1-RNA mit der cDNA von β-Actin hybridisiert und 4-24 h gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Signale in Kleinhirn Kaninchen und Plexus chor. der Maus sind wegen der Signalsättigung zusätzlich nach kürzerer Exposition (10 h) gezeigt.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen vorangegangener Northernblot-Analysen (Oberwinkler et al., 2005; Lis, 2005) werden TRPM3-Transkripte auch im Auge der Maus exprimiert (Abb. 11). *In situ* Hybridisierungsexperimente zeigten, dass TRPM3-Transkripte im Auge insbesondere in der Retina und im Ziliarkörper vorkommen (Lis, 2005). Die aus der Retina stammende Zelllinie Y79 und die aus dem Ziliarkörper stammende Zelllinie NPE (non pigmented epithelial cells) zeigten, ähnlich wie Z310-Zellen, jedoch nur eine schwache TRPM3-Expression von überwiegend verkürzten Transkripten (Abb. 11). In allen Geweben und Zellen mit TRPM3-Expression hybridisierten die Sonden mit verschiedenen TRPM3-Transkripten unterschiedlicher Größen von ~1.8 kb bis >15 kb. Die Transkripte stellen vermutlich Produkte differentieller Expression des TRPM3-Gens dar. Weitere aus der Retina stammende Zelllinien RBL-30, RB-355 und WERI-RB-1, ebenso wie embryonale Stammzellen der Maus oder die Zunge der Ratte zeigten keine TRPM3-Expression (Abb. 11).

4.1.2 Untersuchung von TRPM3- und TRPM1-Transkripten in GH3- und Ins-1-Zellen mittels RT-PCR

Northernblot-Analysen zeigten eine deutliche Expression von TRPM3-Transkripten in GH3- und Ins-1-Zellen (vgl. Abb. 11). Um die Identität dieser Transkripte näher zu charakterisieren, wurden sie mit Hilfe der Ein-Schritt-RT-PCR untersucht (vgl. 3.6.4.2). Sowohl aus Gesamt-RNA von GH3- als auch Ins-1-Zellen wurden mit den Primer PH629 und PH380 357 bp große Fragmente der TRPM3-cDNA amplifiziert, die von Exon 23 und 24 codiert werden (Abb. 12, rechts). Mit Hilfe der Primer PH521 und PH635, welche den Porenbereich des Kanals codierende Fragmente (Exon 24 bis 25) amplifizieren, wurden im Hirn und Auge der Ratte Transkripte nachgewiesen, die in ihrer Länge sowohl der kurzen Porenvariante mit 187 bp, als auch der langen Porenvariante mit 223 bp entsprechen. Im Unterschied dazu wurden in GH3- und Ins-1-Zellen nur 187 bp-Fragmente amplifiziert. Die TRPM3-Varianten dieser Zellen entsprechen somit im Porenbereich der mTRPM3 α 2-Variante, die sich durch eine hohe Permeabilität für divalente Kationen auszeichnet (Oberwinkler et al., 2005). Das Vorkommen ausschließlich dieser verkürzten Porenregion deutet auf eine besondere Rolle von TRPM3-Kanälen beim Transport divalenter Kationen in endokrinen Zellen des Pankreas und der Hypophyse hin.

Für rekombinante TRPM3- und TRPM1-Proteine wurde gezeigt, dass sie miteinander in Wechselwirkung treten können (Philipp et al., 2006; Lis, 2005). In Zellen, die beide Proteine gleichzeitig exprimieren, wäre es daher vorstellbar, dass es zur Bildung von heterooligomeren Kanalkomplexen kommt. Ähnliches wurde auch für TRPV5 und TRPV6 (Hoenderop et al., 2003b) oder TRPV1- und TRPV3-Kanäle gezeigt (Cheng et al., 2007b).

Um herauszufinden, ob in GH3- oder Ins-1-Zellen neben TRPM3- auch TRPM1-Transkripte coexprimiert werden, wurden Ein-Schritt-RT-PCR-Experimente mit TRPM1-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 12, links). In GH3-Zellen, Ins-1-Zellen, sowie im Hirn und Auge der Ratte wurden mit der Primerkombination PH500/PH502 (Exon 22 bis 24) TRPM1-Fragmente einer Länge von 388 bp nachgewiesen. Offensichtlich werden also neben TRPM3-Kanälen auch TRPM1-Proteine nicht nur im Gehirn sondern auch insbesondere in spezifischen endokrinen Zelltypen aus Hypophyse und Pankreas exprimiert. Es ist daher denkbar, dass in diesen Zelltypen heterooligomere Kanalkomplexe, bestehend aus verschiedenen TRPM3- und TRPM1-Untereinheiten, exprimiert werden. Ähnlich wie für andere TRP-Kanäle gezeigt (Cheng et al., 2007b), könnten diese Kanäle biophysikalische Eigenschaften besitzen, die sich von homomultimeren Kanalkomplexen deutlich unterscheiden.

Die Primer PH559/PH501, welche von Sequenzabschnitten flankierend zum putativen Porenbereich von TRPM1 abgeleitet wurden, amplifizierten Fragmente der langen Porenvariante (TRPM1_{long}) als auch der kurzen Porenvariante (TRPM1_{Δ1066-1071}; Lis et al., 2005). Sowohl in Ins-1- als auch GH3-Zellen konnten Transkripte beider TRPM1-Varianten nachgewiesen werden. Ihr Vorkommen macht die Bildung unterschiedlicher TRPM1/TRPM3-Kanalkomplexe möglich.

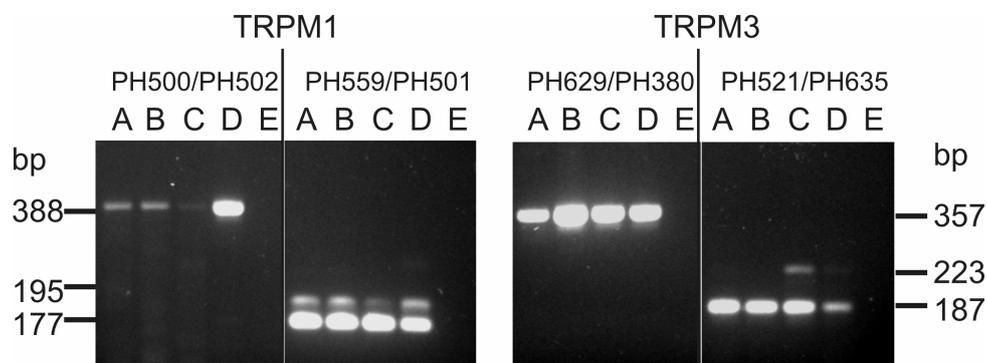


Abb. 12: Nachweis von TRPM1 und TRPM3-Produkten in GH3 und Ins-1-Zellen

Gelelektrophoretische Trennung der Ein-Schritt-RT-PCR-Produkte in einem 2% Agarosegel. A= Ins-1-Zellen, B= GH3-Zellen, C= Gehirn Ratte, D= Auge Ratte, E= Negativ-Kontrolle

4.1.3 Klonierung der TRPM3-cDNA aus GH3 und Ins1-Zellen sowie Rattenhirn

Alle bislang bekannten Varianten von TRPM3 wurden aus Geweben der Maus oder des Menschen kloniert (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Um herauszufinden, welche TRPM3-Varianten in der Ratte vorkommen, wurde RNA aus Rattenhirn und aus den Ratten-Zelllinien Ins-1 und GH3 mit Hilfe der RT-PCR untersucht (vgl. 3.6.4.1). Dazu wurde die cDNA-Sequenz der Maus mit genomischen Sequenzen der Ratte aus der Datenbank (Genebank) verglichen. Es zeigte sich, dass im Rattengenom auf

Chromosom 1 homologe Sequenzen vorkommen, die den aus der Maus bekannten 28 Exons entsprechen (vgl. Abb. 4). Auch die Intron/Exon-Struktur wies große Ähnlichkeiten auf. Zur Amplifikation vollständiger, d.h. einen abgeschlossenen TRPM3-Leserahmen umfassender cDNA-Fragmente aus der Ratte, wurde ein Primer PH552 abgeleitet, dessen Sequenz analog zu den Maus TRPM3 α -Varianten mit einem Startcodon, codiert von Exon 1, beginnt (Abb. 13). Die Sequenz des Primers PH553 entspricht - analog den Maus β -Varianten- der genomischen Sequenz von Exon 2, beginnend mit dem dort prognostizierten Startcodon. Diese beiden Primer sowie ein weiteres Oligodesoxyribonukleotid PH374 wurden in Kombination mit dem Primer PH554 in RT-PCR-Experimenten verwendet. Die Sequenz des Primers PH554 endet mit einem den Leserahmen abschließenden Stopcodon. Mit allen verwendeten Primerkombinationen konnten im Gehirn der Ratte Transkripte einer Länge von ~5,2 kb nachgewiesen werden (Abb. 13). Diese Produktlängen entsprechen den meisten aus der Maus bekannten TRPM3-Varianten. Dies und die nachfolgende Klonierung der erhaltenen PCR-Produkte (Abb. 14) zeigte, dass, ebenso wie in der Maus, in der Ratte verschiedene TRPM3-Varianten exprimiert werden, deren Aminoterminus entweder von Exon 1 (α -Varianten) oder von Exon 2 (β -Varianten) codiert wird (Abb. 14).

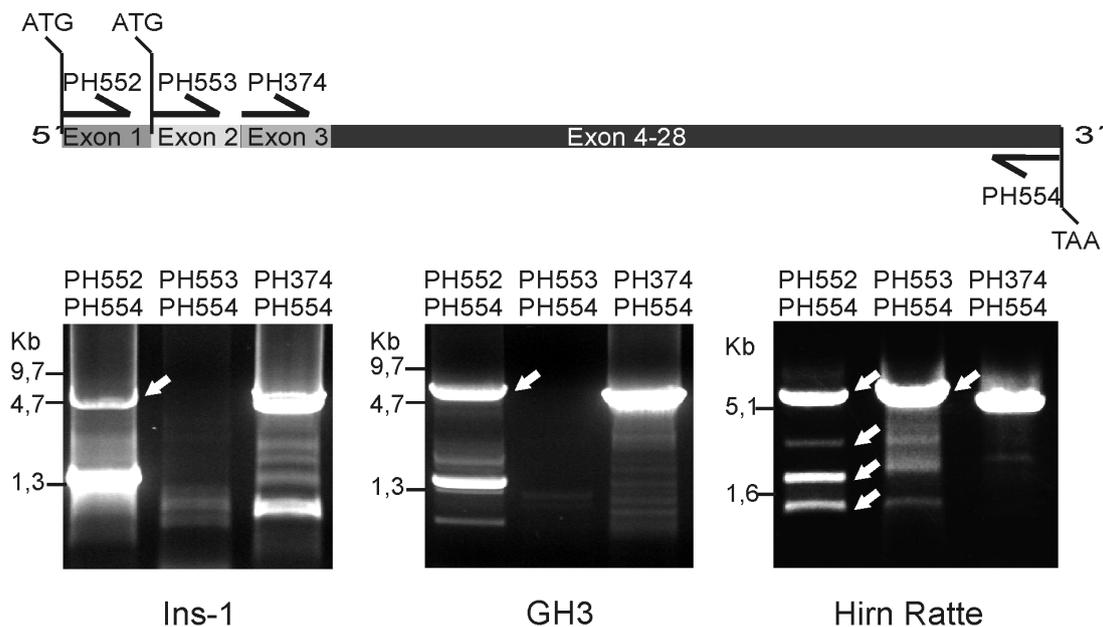


Abb. 13: Amplifizierung der TRPM3-cDNA aus Ins-1-, GH3-Zellen und Hirn Ratte

Oben: Schematische Darstellung der cDNA von TRPM3 mit der Lage der verwendeten Primer. Unten: PCR-Produkte, die mit den angezeigten Primerkombinationen von Ins-1-, GH3- und Rattenhirn-RNA amplifiziert wurden. Die weißen Pfeile markieren die Banden, die subkloniert wurden.

Auch in RNA von Ins-1- oder GH3-Zellen wurden 5,2 kb lange TRPM3-Transkripte identifiziert. Im Unterschied zum Hirn der Ratte gelang dies jedoch nur mit den Primerkombinationen PH552/PH554 und PH374/PH554. Es ist daher davon auszugehen, dass in Zellen dieser beiden Linien und möglicherweise auch in den entsprechenden

Primärzellen aus Hypophyse und Pankreas keine TRPM3 β -Varianten exprimiert werden. GH3- und Ins-1-Zellen exprimieren also nur TRPM3-Varianten deren Aminoterminus von Exon 1 codiert wird und die den in der Maus beschriebenen α -Varianten entsprechen (Oberwinkler et al., 2005).

Insgesamt 34 unabhängige cDNA-Klone wurden vollständig und doppelsträngig sequenziert. Auf diese Weise wurden im Rahmen dieser Arbeit 9 unterschiedliche TRPM3-Varianten erstmals identifiziert (Abb. 14).

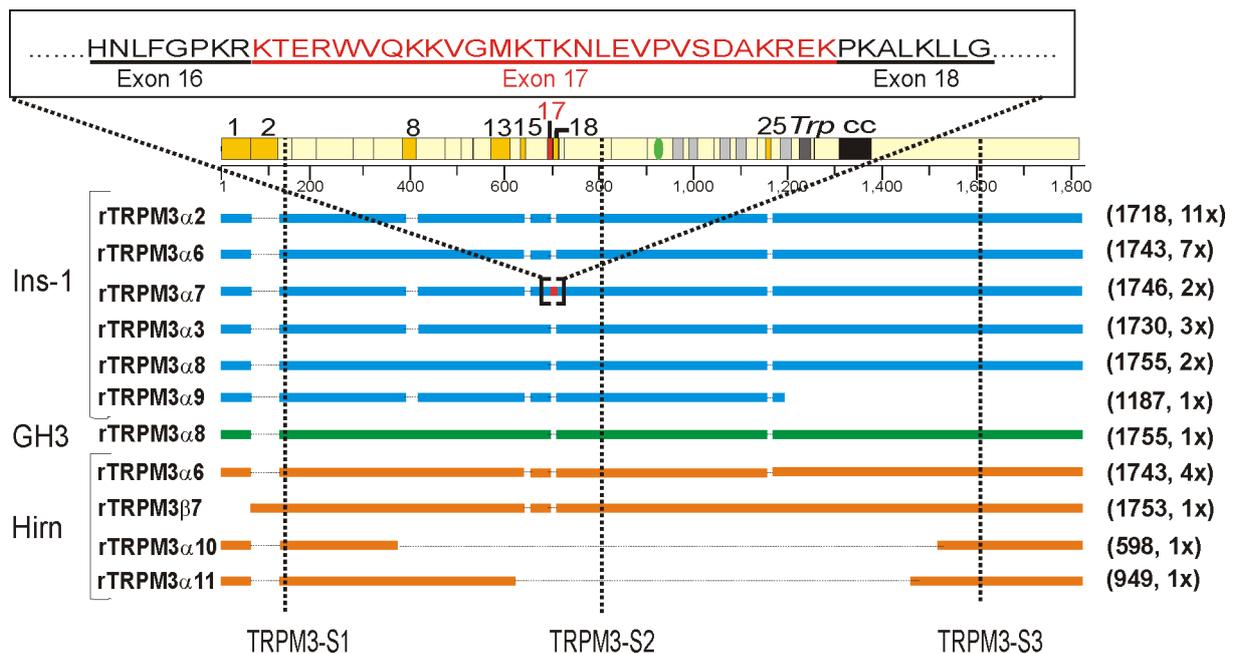


Abb. 14: TRPM3-Varianten aus der Ratte (Ins-1-, GH3-Zellen und Hirn)

Der gelbe Balken zeigt eine schematische Darstellung des TRPM3-Proteins. Die orangefarbenen Kästchen zeigen die Proteindomänen, die durch alternatives Spleissen fehlen können oder verändert werden. Die grauen Kästchen zeigen die Transmembrandomänen, das Dunkelgraue die Lage der Trp-Domäne und das Schwarze die Coiled-Coiled-Region. Die TRPM3-Varianten aus Ins-1-Zellen sind als blaue Balken, die aus GH3-Zellen als grüne Balken und die Varianten aus dem Hirn als orangefarbene Balken dargestellt. Durch alternatives Spleissen fehlende Bereiche sind als gepunktete Linie angezeigt. Der schwarz umrandete vergrößerte Bereich zeigt die Aminosäuresequenz des neu identifizierten Exons (rot) aus Ins-1-Zellen mit den angrenzenden Exons 16 und 17 (schwarz). Die senkrechten, gepunkteten Linien zeigen die Lokalisation der Zielsequenzen (TRPM3-S1/S2/S3) für die RNA-Interferenz-Experimente (vgl. 4.4.1). Eine grüne Ellipse zeigt die Lage des Epitops, gegen welches anti-TRPM3-Antikörper gerichtet wurden.

Alle 26 Klone, die aus Ins-1-Zellen stammen, tragen, festgelegt durch die Lage der Primer, den Aminoterminus der α -Varianten von TRPM3. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Ein-Schritt-RT-PCR-Experimenten (vgl. Abb. 12), tragen all diese Varianten eine um 12 Aminosäuren verkürzte Porenregion, die durch alternatives Spleissen in Exon 24 entsteht und entsprechen in diesem Abschnitt der mTRPM3 α 2-Variante aus der Maus (vgl. Abb. 4). Sie wurde in Ins-1-Zellen am häufigsten, nämlich in 11 von 26 Fällen, identifiziert. Allerdings

ist die rTRPM3 α 2-Variante aus der Ratte mit 1718 Aminosäuren Länge um 9 Aminosäuren länger als die α 2-Variante der Maus.

Einer weiteren Variante (1739 Aminosäuren), welche dreimal nachgewiesen wurde, fehlt die Sequenz, die von Exon 8 codiert wird. Sie entspricht TRPM3 α 3 aus der Maus (vgl. Abb. 4) und wird daher als rTRPM3 α 3 bezeichnet. Interessanterweise konnte in Transkripten aus Ins-1-Zellen ein neues Exon identifiziert werden: Eine Variante, welche durch zwei Klone repräsentiert wird, und als rTRPM3 α 7 bezeichnet wird, hat eine Länge von 1746 Aminosäuren (Abb. 14). Sie besitzt im Unterschied zur rTRPM3 α 2-Variante ein zusätzliches, 28 Aminosäuren codierendes Exon 17 (Abb. 14, schwarzes Kästchen). Homologe Sequenzabschnitte zu diesem neu identifizierten Exon im TRPM3-Gen der Ratte kommen auch im Genom der Maus vor. Die Expression einer Variante, welche die Sequenzinformation dieses Exons trägt, konnte jedoch in dieser und anderen Spezies nicht nachgewiesen werden. Das TRPM3-Gen der Ratte besteht also im Unterschied zur Maus nicht aus 28, sondern aus 29 Exons.

Darüberhinaus wurde sieben mal in Ins-1-Zellen und vier mal im Gehirn der Ratte eine weitere bislang unbekannte Variante einer Länge von 1743 Aminosäuren identifiziert. Eine homologe Variante konnte bislang weder in der Maus noch im Mensch nachgewiesen werden. Die artspezifische Expression dieser als rTRPM3 α 6 bezeichneten Variante und die Häufigkeit ihrer Transkripte in Rattengewebe, deutet auf eine besondere Bedeutung dieser TRPM3-Variante in der Ratte hin.

Weiterhin wurde eine 1755 Aminosäuren lange TRPM3-Variante identifiziert: sie wird als rTRPM3 α 8 bezeichnet, trägt nahezu die vollständige, genomisch codierte Aminosäuresequenzinformation des TRPM3-Gens und stellt die längste bislang identifizierte TRPM3-Variante dar. Lediglich der von Exon 2 codierte alternative Aminoterminus und 12 Aminosäuren der langen Pore, codiert von Exon 25 der Ratte, fehlen. Diese lange Form von TRPM3 konnte ebenfalls in GH3-Zellen identifiziert werden.

Ebenfalls interessant ist die Entdeckung einer verkürzten Spleissvariante (1187 Aminosäuren), der Exon 28 der Ratte fehlt. Diese Variante entspricht mit Ausnahme des Carboxyterminus der rTRPM3 α 2-Variante und wird als rTRPM3 α 9 bezeichnet. Durch das Fehlen von Exon 28 kommt es zu einem Leserastersprung und es wird nur ein verkürztes Protein gebildet, dem die Coiled-Coil-Region fehlt. Für andere Mitglieder der TRPM-Familie konnte gezeigt werden, dass die Coiled-Coil-Region wesentlich für Wechselwirkungen zwischen den TRPM-Proteinen und deren Kanalassoziation ist (Erler et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Das Vorkommen dieser verkürzten Form deutet darauf hin, dass die Coiled-Coil-Region nicht unabdingbare Voraussetzung für die Funktion(en) von TRPM3-Kanälen ist. Da diese Variante jedoch nur einmal identifiziert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Produkt von einmaligem Fehlspleissen handelt.

Anders als in GH3- und Ins-1-Zellen wurde im Rattenhirn auch eine Variante von TRPM3 identifiziert, die mit dem von Exon 2 codierten Aminoterminus beginnt und als rTRPM3 β 7 bezeichnet wird. Diese Variante unterscheidet sich zudem durch 12 zusätzliche Aminosäuren, codiert von Exon 25 der Ratte. In diesem Bereich entspricht rTRPM3 β 7 aus der Ratte dem Mausprotein mTRPM3 α 1 und besitzt eine lange Porenregion.

Im Rahmen meiner Untersuchungen habe ich im Hinblick auf ihre Identität auch verkürzte PCR-Produkte kloniert, die mit den Primern PH552/PH554 erhalten wurden (Abb. 13). Es zeigte sich, dass auch diese Fragmente Produkte des TRPM3-Gens darstellen. Es wurden zwei weitere TRPM3-Varianten identifiziert, die als rTRPM3 α 10 und rTRPM3 α 11 bezeichnet werden. Diese Varianten tragen Sequenzinformationen, codierend für weite Teile des Carboxy- und Aminoterminus. Ihnen fehlt jedoch die Sequenz, welche die Transmembrandomänen des Kanals codiert. Es ist daher anzunehmen, dass diese Varianten nicht zur ionenleitenden Pore von TRPM3-Kanalkomplexen beitragen, sondern u.U. regulatorische Funktionen ausüben.

4.1.4 Untersuchung von TRPM3-Proteinen in GH3- und Ins-1-Zellen

TRPM3-Transkripte werden in den Hypophysenzellen der Linie GH3 ebenso wie in pankreatischen Ins-1-Zellen exprimiert (vgl. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3). Zur Untersuchung von TRPM3-Proteinen in diesen Zellen wurden Westernblot-Analysen unter Verwendung polyklonaler TRPM3-Antikörper (AK695, vgl. Tab. 10, S. 26) durchgeführt. Dieses Antiserum richtet sich gegen ein Epitop, welches in den meisten bislang bekannten TRPM3-Spleissvarianten exprimiert wird (vgl. Abb. 14). Das Antiserum erkannte in TRPM3-transfizierten HEK293-Zellen Proteine der Größe ~240 kDa, welche in untransfizierten Zellen nicht vorkamen (Abb. 15). Dieses Ergebnis stimmt mit vorangegangenen Untersuchungen überein, die zeigten, dass in HEK293-Zellen das zelleigene TRPM3-Gen nicht exprimiert wird (Oberwinkler et al., 2005). Die Größe der detektierten TRPM3-Proteine ist größer, als das theoretisch anhand der TRPM3-cDNA kalkulierte Molekulargewicht, das nur 194,8 kDa beträgt. Womöglich werden TRPM3-Proteine z.B. durch Glycosylierung modifiziert. Proteine ähnlicher Größe von ~240 kDa werden auch in GH3- und Ins-1-Zellen exprimiert (Abb. 15). Daher ist es möglich, dass es zur Bildung ionenleitender TRPM3-Kanäle in GH3- und Ins-1-Zellen kommt.

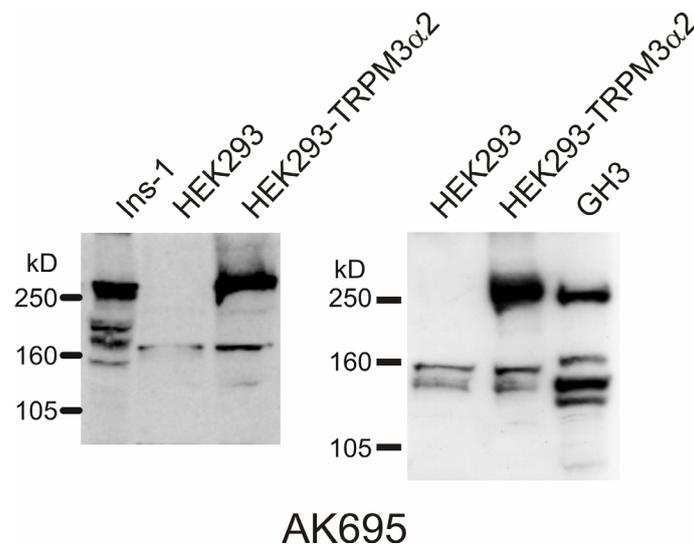


Abb. 15: GH3- und Ins-1-Zellen exprimieren TRPM3-Proteine

Westernblot-Analyse von Ins-1-Mikrosomen (100 µg), RIPA-Lysaten (50 µg, vgl. 3.7.1) von HEK293-Zellen und mTRPM3 α 2-transfizierten HEK293-Zellen, sowie einem GH3-Zelllysate, welches nach Lyse der Zellen eines konfluent gewachsenen Kulturschälchens mit 2 x Lämmli-Puffer erhalten wurde. Der Anti-TRPM3-Antikörper AK695 wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

In Lysaten beider Zelltypen erkannte der Antikörper auch zusätzliche kleinere Proteine mit Größen von ca. 140 kDa - 200 kDa. Es könnte sich dabei entweder um Abbauprodukte von TRPM3, oder vom Antiserum unspezifisch erkannte Proteine handeln. Möglicherweise stellen diese verkürzten Proteine aber auch unterschiedliche Spleissvarianten von TRPM3 dar. So wurden aus Zellen der Linien GH3 und Ins-1 mit Hilfe von RT-PCR neben den langen TRPM3-Varianten auch verkürzte cDNAs identifiziert (vgl. Abb. 14, S. 61) und auch im Northernblot wurden kurze TRPM3-Transkripte sichtbar (vgl. Abb. 11, S. 57).

4.2 Ca²⁺-Signale in TRPM3-exprimierenden Zellen

4.2.1 Untersuchung des Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstroms durch rekombinante TRPM-Kanäle

Zur Untersuchung der Funktion von TRPM3-Proteinen wurden Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit Hilfe des Ca²⁺-Indikatorfarbstoffes FURA-2 durchgeführt (vgl. 3.9). Dazu wurden HEK293-Zellen, welche selbst kein TRPM3-Protein exprimieren (vgl. Abb. 15; Oberwinkler et al., 2005), mit der cDNA von mTRPM3 α 2, mTRPM3 α 1 und zusätzlich TRPM1_{long} (Lis et al., 2005) transfiziert.

TRPM3 α 2-exprimierende Zellen zeigten nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat ein reversibles und deutliches Ca²⁺-Signal (Abb. 16). Dies stimmt mit Untersuchungen überein, welche zeigten, dass die TRPM3 α 2-Variante gut permeabel für Ca²⁺ ist (Oberwinkler et al., 2005) und durch das Steroid Pregnenolonsulfat aktiviert werden kann (Wagner et al., 2007a).

Im Gegensatz zu mTRPM3 α 2, zeigten TRPM3 α 1-exprimierende Zellen kein Ca²⁺-Signal nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die mTRPM3 α 1-Variante, welche einen im Vergleich zur mTRPM3 α 2-Variante 12 Aminosäuren längeren Porenbereich besitzt, wenig permeabel für divalente Kationen ist (Oberwinkler et al., 2005).

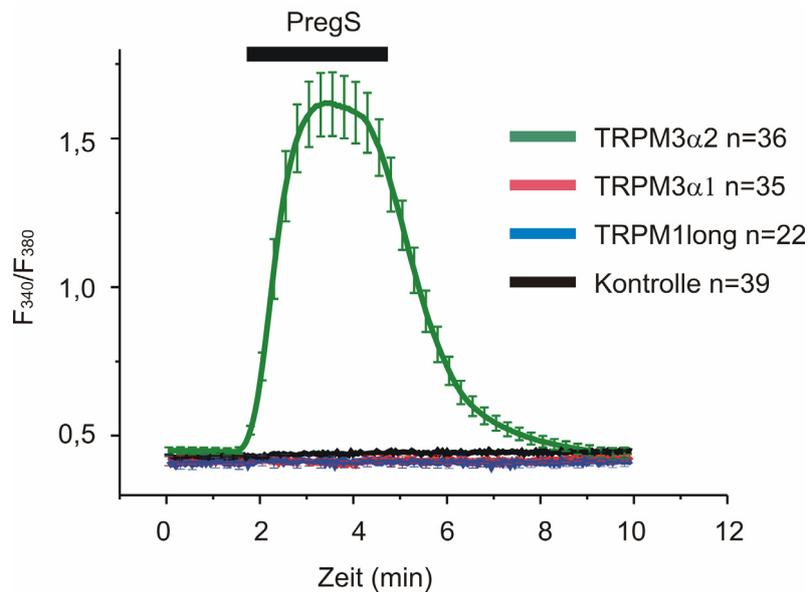


Abb. 16: Steroid-induzierte Ca²⁺-Signale in TRPM3 α 2-, TRPM3 α 1- und TRPM1-exprimierenden HEK293-Zellen

Untransfizierte HEK293-Zellen (Kontrolle), oder HEK293-Zellen 48 h nach Transfektion mit MycTRPM3 α 2-pCAGGSM2-IRES-GFP, MycTRPM3 α 1-pCAGGSM2-IRES-GFP oder MycTRPM1_{long}-pCAGGSM2-IRES-GFP wurden mit Puffer S/2Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS stimuliert (n wie angegeben).

Bislang gibt es keine veröffentlichten Untersuchungen der Funktionsweise von TRPM1_{long}. In meinen Untersuchungen zeigten TRPM1_{long}-exprimierende Zellen keine Steroid-induzierten Ca²⁺-Signale (Abb. 16). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die eingeschleuste cDNA nicht korrekt exprimiert wird oder, dass die gebildeten Proteine nicht zur Plasmamembran gelangen. In Analogie zur TRPM3 α 1-Variante wäre es aber auch denkbar, dass TRPM1_{long} funktionelle Kationenkanäle ausbildet, welche jedoch entweder für Ca²⁺ impermeabel oder durch Pregnenolonsulfat nicht aktivierbar sind.

4.2.2 Untersuchung von primären Epithelzellen des Plexus choroideus

Meine Ergebnisse von Northernblot-Analysen zeigen, dass TRPM3-Transkripte im Plexus choroideus sehr stark exprimiert werden (vgl. Abb. 11, S. 57). Deshalb wurden Epithelzellen aus dem Plexus choroideus der Maus isoliert und kultiviert (vgl. 3.5.2). Die so kultivierten Zellen sind bis zu acht Tagen lebensfähig. Sie zeigen Zellwachstum bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, jedoch keine Proliferation. Die Ca²⁺-Signale solcher Zellen wurden

mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikatorfarbstoffs FURA-2 in Gegenwart von 2 mM extrazellulärem Ca^{2+} (Puffer S/2Ca, vgl. 3.9) analysiert.

Nach Austausch der extrazellulären Lösung gegen eine Lösung, in welcher monovalente Kationen vollständig fehlen und als divalentes Kation einzig Ca^{2+} in einer Konzentration von 10 mM vorlag, wurde ein unmittelbarer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sichtbar. Dieser Anstieg war reduziert in gleichzeitiger Gegenwart von 135 mM Na^+ (Abb. 17). Dieses Verhalten ähnelt rekombinanten TRPM3 α 2-Kanälen, welche selbst für Ca^{2+} permeabel sind, jedoch durch extrazelluläre Kationen wie Na^+ gehemmt werden (Oberwinkler et al., 2005).

Im Unterschied zu TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen zeigten Plexus-Epithelzellen nach Zugabe von 30 μM Pregnenolonsulfat aber keine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

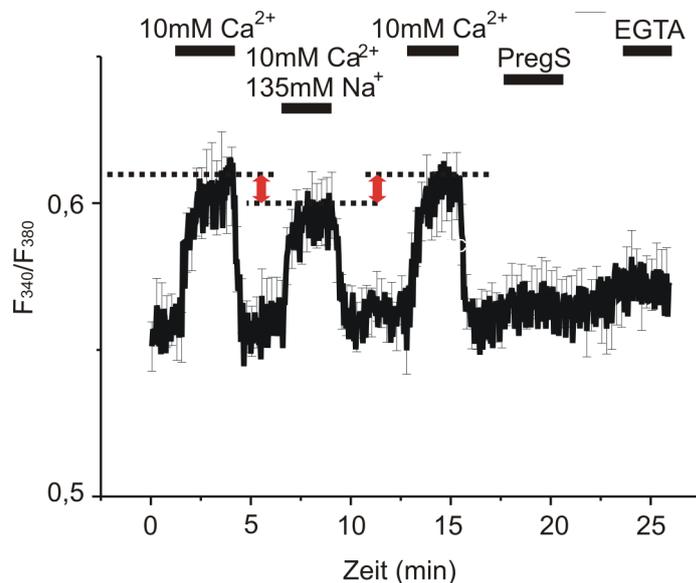


Abb. 17: Ca^{2+} -Signale in primären Epithelzellen aus Plexus choroideus in Gegenwart wechselnder extrazellulärer Ionenkonzentrationen

FURA-2-Messung von primären Epithelzellen aus dem Plexus choroideus der Maus. Puffer S/2Ca (Ringer) wurde gegen Puffer MVF (10 mM Ca^{2+} , Monovalent-frei), Puffer 135Na (10 mM Ca^{2+} +135 mM Na^+) oder Puffer S/EGTA (EGTA) ausgetauscht. Die Stimulation mit 30 μM PregS erfolgte in Puffer S/2Ca. Die Kurve zeigt die gemittelten Werte von 13 Zellen. Die Skalierung weicht von der sonst im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten ab und ist Ausdruck nur geringer Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in primären Plexus-Epithelzellen.

Möglicherweise handelt es sich bei den im Plexus choroideus exprimierten TRPM3-Kanälen um Steroid-insensitive Varianten des Kanals. Die Pregnenolon-sensitive Variante mTRPM3 α 2 wurde aus dem Gesamt-Hirn der Maus kloniert, jedoch konnten im Plexus choroideus der Maus keine α -Varianten von TRPM3 identifiziert werden (Lis, 2005), sondern es wurden nur β -Spleissvarianten identifiziert, welche mit dem von Exon 2 codierten Aminoterminus beginnen. Solche Isoformen zeigen nach Überexpression in HEK293-Zellen

nur in Einzelfällen einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat (persönliche Mitteilung S.Philipp). Es ist daher denkbar, dass die in Epithelzellen des Plexus choroideus exprimierten TRPM3-Varianten in ihrer Porenregion der Ca^{2+} -permeablen $\alpha 2$ -Variante ähneln und gleichzeitig aufgrund eines veränderten Aminoterminus nicht sensitiv für Pregnenolonsulfat sind.

4.2.3 Untersuchung der Ca^{2+} -Signale in Z310- und NPE-Zellen

Zellen der Linie Z310, welche aus dem Plexus choroideus der Ratte stammen (Zheng and Zhao, 2002), zeigen in Northernblot-Analysen eine schwache Expression von TRPM3-Transkripten (vgl. Abb. 11). Deshalb wurden auch in diesen Zellen Ca^{2+} -Messungen durchgeführt (Abb. 18). Ähnlich den primär-kultivierten Plexuszellen wurde keine Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat beobachtet und es handelt sich auch bei den in Z310-Zellen identifizierten TRPM3-Varianten um Pregnenolonsulfat insensitive TRPM3-Varianten.

Nach Stimulation mit 10 mM Ca^{2+} in einer Monovalent-freien Lösung (Puffer MVF) wurde, wie auch schon in primären Epithelzellen aus dem Plexus choroideus, ein geringes Ca^{2+} -Signal beobachtet (Abb. 18), das möglicherweise auf Ca^{2+} -permeable TRPM3-Kanäle zurückzuführen ist.

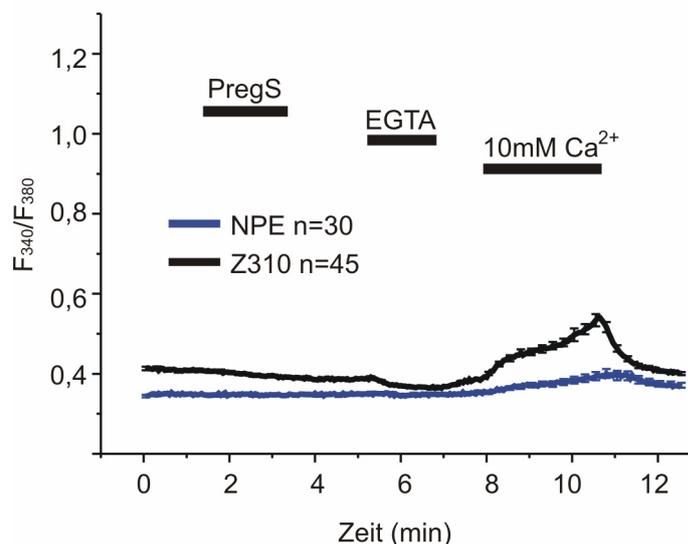


Abb. 18: Ca^{2+} -Signale in Z310- und NPE-Zellen

FURA-2-Messung von Z310- und NPE-Zellen nach Stimulation mit 30 μM PregS in Puffer S/2Ca, Perfusion mit 10 mM Ca^{2+} in Abwesenheit monovalenter Kationen (Puffer MVF) oder EGTA (Puffer S/EGTA). Die Kurven zeigen die gemittelten Werte aus 30 Z310- und 45 NPE-Zellen.

Zellen der Linie NPE zeigten weder eine Reaktion auf die Stimulation mit Pregnenolonsulfat noch auf die Exposition in Monovalent-freier 10 mM Ca^{2+} -Lösung. NPE-Zellen stammen aus dem nichtpigmentierten Epithel des Ziliarkörpers, in welchem TRPM3-Expression mit Hilfe

von *in situ* Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen werden konnte (Lis, 2005). Die in diesen Zellen exprimierten Varianten (vgl. auch Abb. 11, S. 57) weisen offensichtlich andere Eigenschaften als die bereits bekannten TRPM3 α 2-Varianten auf und ähneln u.U. TRPM3 α 1 (vgl. Abb. 16).

4.2.4 Untersuchung von Ca²⁺-Signalen in GH3- und Ins-1-Zellen

Zellen der Hypophysen-Zelllinie GH3 und der pankreatischen Zelllinie Ins-1 exprimieren TRPM3 (vgl. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4). GH3-Zellen zeigen überdies nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Bukusoglu and Sarlak, 1996). Daher wurden Ca²⁺-Signale in GH3- und Ins-1-Zellen mit Hilfe des Ca²⁺-Indikatorfarbstoffs FURA-2 untersucht. Zellen beider Linien zeigten nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat einen deutlichen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Abb. 19). Nach Wegnahme des Stimulus erreichte die Ca²⁺-Konzentration wieder ihren Basiswert; der Effekt war also reversibel. Die Gegenwart von TRPM3-Kanälen in diesen Zellen und die Ähnlichkeit der Reaktion der Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat mit TRPM3-transfizierten HEK293-Zellen machen es wahrscheinlich, dass TRPM3-Kanäle für den Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstrom in diesen Zellen verantwortlich sind.

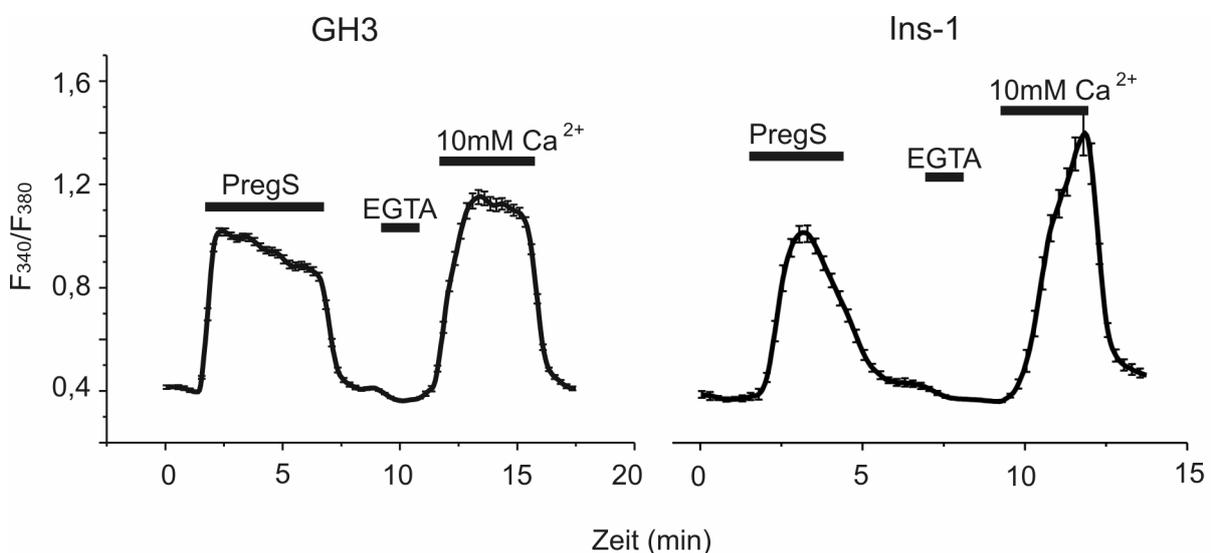


Abb. 19: Steroid-induzierte Ca²⁺-Signale in GH3- und Ins-1-Zellen

47 GH3- und 51 Ins-1-Zellen wurden mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS, 10 mM Ca²⁺ (Puffer MVF) oder EGTA (Puffer S/EGTA) stimuliert.

Die Kinetiken der Ca²⁺-Antworten in GH3- und Ins-1-Zellen unterschieden sich deutlich voneinander: In GH3-Zellen blieb die cytosolische Ca²⁺-Konzentration während der Dauer der Stimulation stabil auf einem hohen Niveau. In Ins-1-Zellen hingegen war ein transienter Ca²⁺-Anstieg zu beobachten. Nach Erreichen eines Maximums fiel die intrazelluläre Ca²⁺-

Konzentration auch in Gegenwart von Pregnenolonsulfat wieder langsam ab. Es wäre denkbar, dass es sich bei den beteiligten TRPM3-Kanälen um verschiedene Varianten handelt, welche möglicherweise unterschiedliche Inaktivierungseigenschaften aufweisen.

Die Größe der Einwärtsströme rekombinanter mTRPM3 α 2-Kanäle ist abhängig von der Konzentration extrazellulärer Calcium-Kationen (Oberwinkler et al., 2005). Auch die in GH3-Zellen durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Ca²⁺-Signale sind abhängig von der außerhalb der Zelle vorliegenden Ca²⁺-Konzentration: Abbildung 20 zeigt die auf den Wert bei 2 mM Ca²⁺ normierten maximalen Ca²⁺-Signale.

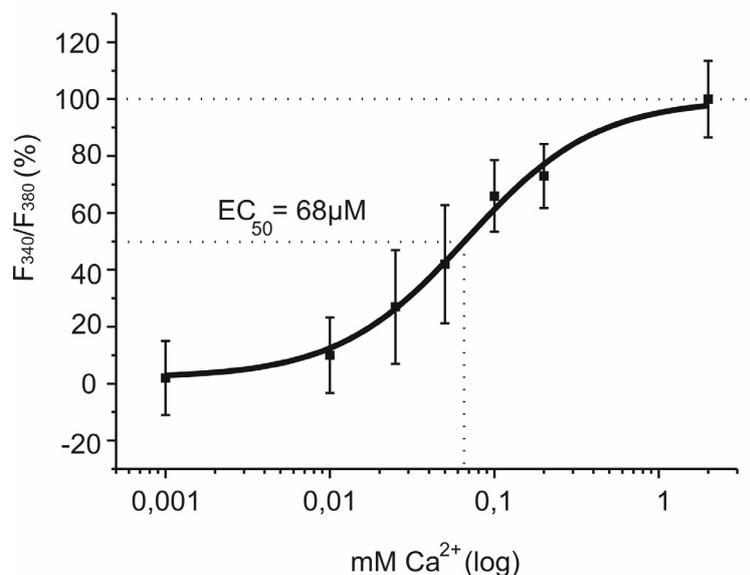


Abb. 20: Ca²⁺-Abhängigkeit Steroid-induzierter Ca²⁺-Signale in GH3-Zellen

Jeder Datenpunkt stellt ein unabhängiges FURA-2-Experiment dar, in welchem die Zellen mit dem Puffer S/0,001Ca; S/0,01Ca; S/0,025Ca; S/0,05Ca; S/0,1Ca; S/0,2Ca; oder S/2Ca perfundiert und mit 30 µM PregS stimuliert wurden. Gezeigt ist die aus > 40 Zellen gemittelte Maximalantwort F_{340/380} nach Stimulation, normiert auf die Antwort, die bei 2 mM Ca²⁺ erhalten wurde. Fehlerbalken = SE (Standard Error). Die Kurve wurde mit Hilfe der logistic-Funktion ($y=A^{2+}(A1-A2)/(1+(x/x_0)^p$) angepasst, wobei: A1= y-Anfangswert, A2= y-Endwert, X₀= Wendepunkt, p= Potenz), im Origin 7.0 Programm gefittet und halblogarithmisch aufgetragen.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine minimale Antwort bei 10 µM Ca²⁺ und eine halbmaximale Antwort bei 68 µM. Eine Sättigung scheint bei 2 mM Ca²⁺ erreicht. Die im Blutplasma vorliegende Ca²⁺-Konzentration von ca. 1,5 mM ist also nahezu ausreichend, um ein maximales TRPM3-vermitteltes, Steroid-induziertes Ca²⁺-Signal zuzulassen.

4.3 Untersuchung von Ca²⁺-Signalen nach Knock-down von TRPM3

Um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen den in Abschnitt 4.1 identifizierten TRPM3-Proteinen und den in Abschnitt 4.2 charakterisierten Ca²⁺-Signalen herzustellen, wurden RNA-Interferenz-Studien durchgeführt.

4.3.1 Strategie zur Hemmung der TRPM3-Expression

Zur Hemmung der TRPM3-Expression wurden zunächst drei unterschiedliche Zielsequenzen S1, S2 und S3 in der TRPM3-cDNA mit Hilfe computergestützter Algorithmen der Firma Genscript (Piscataway, New Jersey) ausgewählt (vgl. Abb. 14). Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Sequenzen in möglichst allen bekannten TRPM3-Spleissvarianten vorkommen. Darüber hinaus sollten die ausgewählten Sequenzabschnitte in Maus, Ratte und Mensch weitestgehend identisch sein, um später eine Anwendung in diesen verschiedenen Spezies zu ermöglichen. So ist die Zielsequenz S1 identisch in Ratte und Maus, S2 in Ratte, Maus und Mensch und S3 in Ratte und Mensch.

Abgeleitet von diesen Sequenzen wurden die Oligodesoxyribonukleotide TRPM3-oliS1, TRPM3-oliS2 und TRPM3-oliS3 synthetisiert (Abb. 21) und in BamHI/HindIII-Schnittstellen des Plasmids pRNAT-U6.1-EYFP (vgl. 3.2) inseriert.

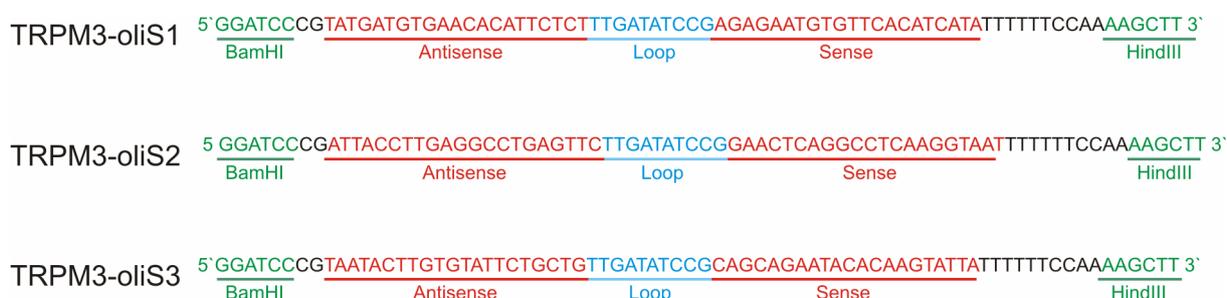


Abb. 21 Sequenz der Oligodesoxyribonukleotide TRPM3-oliS1, TRPM3-oliS2 und TRPM3-oliS3

Die Zielsequenzen in der TRPM3-cDNA in Antisense- und Sense-Orientierung sind rot hervorgehoben.

Auf diese Weise wurden die rekombinanten Plasmide pRNAT-TRPM3-S1-EYFP, pRNAT-TRPM3-S2-EYFP und pRNAT-TRPM3-S3-EYFP generiert. Sie enthielten die ausgewählten Zielsequenzen jeweils in Antisense- und Sense-Orientierung, die durch eine 11 nt lange Loop-Sequenz verbunden waren (Abb. 21). Ein Guanosinrest 5' von der Antisense-Sequenz gelegen diente als Startpunkt der Transkription durch die RNA-Polymerase III und 6 Thymidinreste im Anschluß an die Sense-Sequenz dienten als Terminationssignale. Die rekombinanten Plasmide wurden in TRPM3-exprimierende Zellen durch Transfektion (vgl. 3.5.3) eingeschleust und führten gesteuert von einem U6.1-Promotor zur Expression der TRPM3-shRNA TRPM3-sh1, TRPM3-sh2 und TRPM3-sh3. Transfizierte Zellen konnten anhand ihrer gelbgrünen EYFP-Fluoreszenz identifiziert werden.

4.3.2 Hemmung von rekombinanten TRPM3-Kanälen durch RNA-Interferenz

Die Funktionstüchtigkeit der oben beschriebenen Strategie wurde zunächst in HEK293-Zellen getestet, welche selbst keine eigenen TRPM3-Proteine exprimieren (vgl. Abb. 15, S.

64). Rekombinantes TRPM3-Protein wurde in diese Zellen eingeschleust und im Folgenden wurde analysiert, welche Auswirkungen die Expression von TRPM3-shRNA zum einen auf die Menge des exprimierten Proteins, zum anderen auf TRPM3-abhängige Ca^{2+} -Signale hat.

Westernblot-Analyse der TRPM3-RNA-Interferenz in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit MycTRPM3 α 2-pCAGGSM2-IRES-GFP und entweder pRNAT-TRPM3-S1-EYFP, pRNAT-TRPM3-S2-EYFP, pRNAT-TRPM3-S3-EYFP oder pRNAT-U6.1-EYFP als Kontrolle cotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden RIPA-Lysate hergestellt und nach Quantifizierung der Proteinkonzentration im Westernblot analysiert (Abb. 22 A, B).

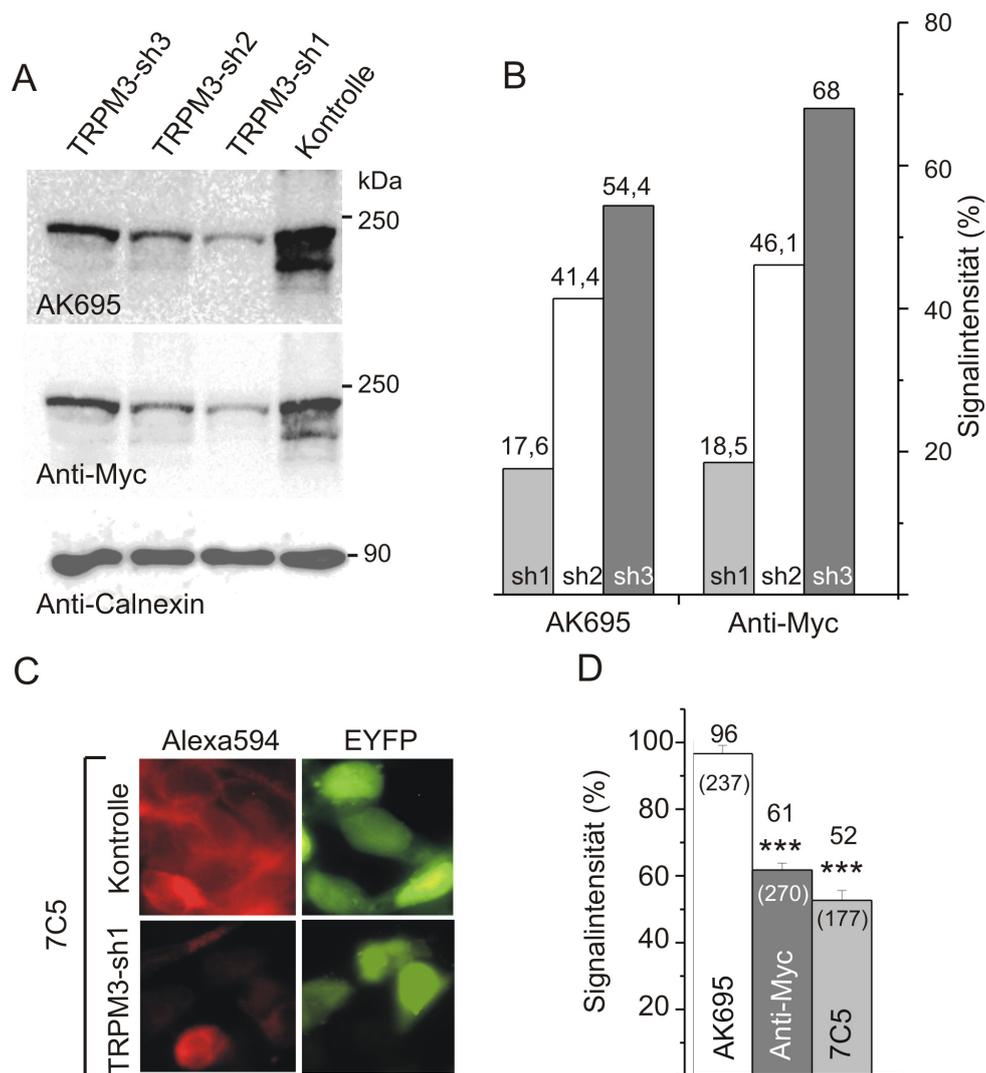


Abb. 22: Hemmung der Expression von rekombinanten TRPM3-Proteinen durch RNA-Interferenz

A: Westernblot von HEK293-Zelllysaten (je 55 μg), 48 h nach Cotransfektion von je 2 μg MycTRPM3 α 2-pCAGGSM2-IRES-GFP und entweder pRNAT-TRPM3-S1-EYFP, pRNAT-TRPM3-S2-EYFP, pRNAT-TRPM3-S3-EYFP oder pRNAT-U6.1-EYFP als Kontrolle. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde der Blot zunächst mit einem Anti-Calnexin-Antiserum inkubiert. **B:** Densitometrische Analyse der in **A** gezeigten TRPM3-Signale im Westernblot. Die Signale wurden in Bezug zu den mit dem Anti-Calnexin-Antikörper erhaltenen Signalen gesetzt und dann auf die

Kontrolle (pRNAT-U6.1-EYFP = 100%) normiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einem weiteren, unabhängigen Experiment erhalten. **C:** Immuncytochemische Analyse der TRPM3-RNA-Interferenz in MycTRPM3 α 2-exprimierenden HEK293-Zellen 4 Tage nach Transfektion mit pRNAT-U6.1-EYFP (Kontrolle) oder pRNAT-TRPM3-S1-EYFP (TRPM3-sh1). Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzemission bei 594 nm (Alexa594) und 495 nm (EYFP) nach Färbung mit einem monoklonalen TRPM3-Antiserum 7C5. **D:** Densitometrische Analyse der in **C** gezeigten Alexa594-Fluoreszenzintensität in gelbgrünen, TRPM3-sh1-exprimierenden Zellen, normiert auf gelbgrüne Kontrollzellen. *** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrollzellen. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

Sowohl mit Hilfe von Anti-Myc-Antikörpern, welche ein Myc-Tag des rekombinant-exprimierten Proteins erkennen, als auch mit Hilfe eines affinitätsgereinigten, polyklonalen Anti-TRPM3-Antiserums AK695 (vgl. Tab. 10) konnte nach densitometrischer Auswertung der erhaltenen Signale eine deutliche Verminderung des TRPM3-Proteins in TRPM3-shRNA-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Kontrollzellen, welche nur mit dem pRNAT-U6.1-Vektor transfiziert waren, führte die Expression von TRPM3-sh3 zu einer Reduktion der Proteinmenge um 45,6 (32,0)%, von TRPM3-sh2 um 58,6 (53,9)% und von TRPM3-sh1 sogar um 82,4 (81,5)%.

Immuncytochemischer Nachweis der TRPM3-RNA-Interferenz in HEK293-Zellen

Als alternative Methode zur Untersuchung der TRPM3-Proteinmenge nach Hemmung der Expression durch RNA-Interferenz wurden immuncytochemische Färbungen von TRPM3 durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen, welche MycTRPM3 α 2 *stabil* exprimieren (HEK293-TRPM3 α 2), mit pRNAT-TRPM3-S1-EYFP oder als Kontrolle mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert. Die Färbung des TRPM3-Proteins mit Hilfe spezifischer Erstantikörper und rot-fluoreszierender Zweitantikörper (Alexa594) erfolgte nach Fixierung direkt in den Zellen. Diese Methode lässt zwar keine Aussage über die Größe des nachgewiesenen Proteins zu, sie erlaubt jedoch den direkten Vergleich von transfizierten, gelbgrünen mit nicht transfizierten, nicht gelbgrünen Zellen. Abbildung 22 C, D zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung. Gelbgrüne, TRPM3-sh1-exprimierende Zellen zeigten eine deutliche Verminderung des TRPM3-Proteins im Vergleich zu sowohl gelbgrün-fluoreszierenden Kontrollzellen als auch zu nichtfluoreszierenden, benachbarten Zellen: Mit dem Anti-Myc-Antiserum wurde eine Reduktion um 39% bestimmt. Hingegen konnte mit dem Anti-TRPM3-Antikörper AK695 kein Unterschied detektiert werden. Dieser polyklonale Antikörper interagiert auch unspezifisch mit anderen in HEK293-Zellen exprimierten Proteinen, wie Abbildung 15 (S. 64) zeigt. Die dadurch verursachten Signale überlagern möglicherweise die Reduktion des TRPM3-Proteins nach Einschleusung des Interferenzplasmids. Deshalb wurde die Untersuchung zusätzlich mit einem monoklonalen Anti-TRPM3-Antikörper 7C5 durchgeführt. Mit diesem Antiserum wurde ebenso wie mit Anti-Myc-Antikörpern eine signifikante Reduktion um 48% beobachtet. Das Ergebnis zeigt, dass der Anti-TRPM3-Antikörper 7C5 zur immuncytochemischen Analyse von TRPM3 geeignet ist.

Reduktion TRPM3-abhängiger Ca^{2+} -Signale durch RNA-Interferenz in HEK293-Zellen

Veränderungen Steroid-induzierter Ca^{2+} -Signale nach Einschleusung von TRPM3-shRNA in HEK293-Zellen wurden mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikatorfarbstoffs FURA-2 untersucht und mit verschiedenen Kontrollzellen verglichen. Dazu wurden stabil MycTRPM3 α 2-exprimierende HEK293-Zellen (HEK293-TRPM3 α 2) mit pRNAT-TRPM3-S1-EYFP oder mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert und vier Tage später untersucht (Abb. 23).

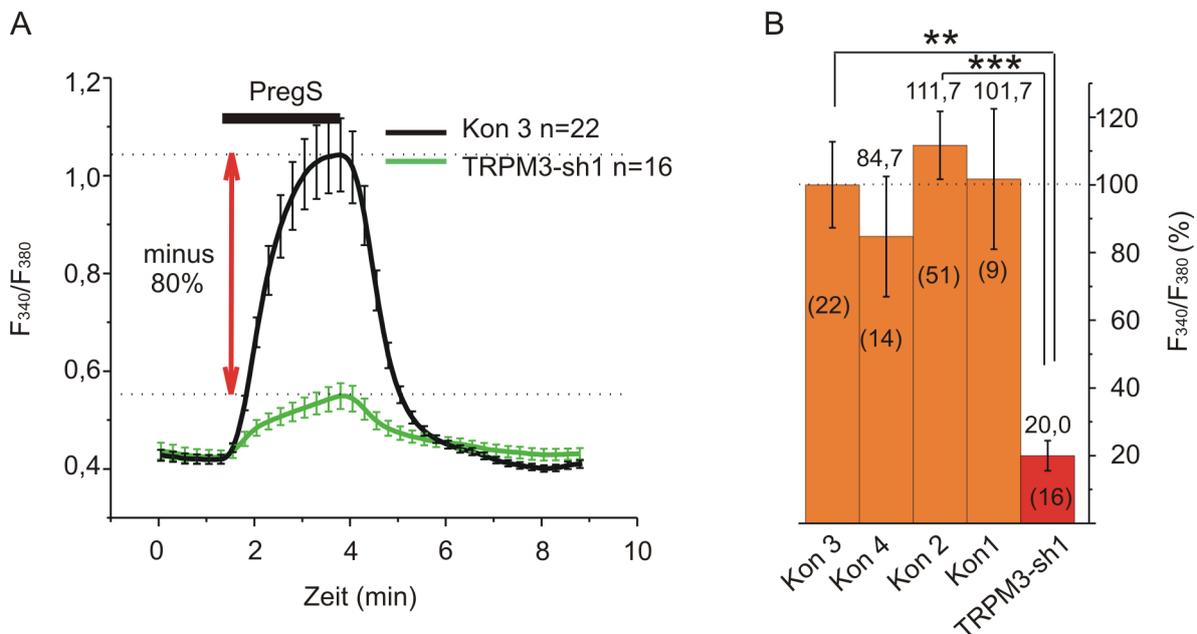


Abb. 23: Knock-down von rekombinanten TRPM3-Kanälen reduziert das Steroid-induzierte Ca^{2+} -Signal in HEK293-Zellen

A: Stabil TRPM3 α 2-exprimierenden HEK293-Zellen wurden 4 d nach Transfektion mit pRNAT-TRPM3-S1-EYFP (n=16) oder pRNAT-U6.1-EYFP (n=22) mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μM PregS stimuliert. Als Kontrolle dienten i.) benachbarte, nicht transfizierte Zellen (Kon 1), ii.) Zellen, die nicht mit Lipofectamin 2000 behandelt wurden (Kon 2), iii.) gelbgrüne Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden (Kon 3) und iv.) Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden aber nicht gelbgrün waren (Kon 4). **B:** Statistische Zusammenfassung der unterschiedlichen Messungen, normiert auf gelbgrün-fluoreszierende pRNAT-U6.1-EYFP-transfizierte Zellen (Kon 3). (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

Im Vergleich zu den verschiedenen Kontrollzellen zeigten TRPM3 sh1-exprimierende Zellen eine deutliche Reduktion des Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Signals um 80%. Die Blockade der TRPM3-Expression führt also nicht nur zu einer Reduktion des TRPM3-Proteins, sondern in ihrer ursächlichen Konsequenz auch zur Abnahme des Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Signals.

4.3.3 Hemmung der TRPM3-Expression in primären Epithelzellen aus Plexus choroideus durch RNA-Interferenz

Im Plexus choroideus der Maus werden TRPM3-Transkripte stark exprimiert (vgl. Abb. 11, S. 57). Jedoch zeigen diese Zellen in FURA-2-Messungen keinen Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstrom (vgl. Abb. 17, S. 66), weil sie möglicherweise eine Steroid-insensitive Variante von TRPM3 exprimieren. Die Einschleusung von TRPM3-sh1 führte auch in diesen Zellen zu einer deutlichen Verminderung der TRPM3-Proteinmenge, wie nachfolgendes Experiment zeigt (Abb. 24).

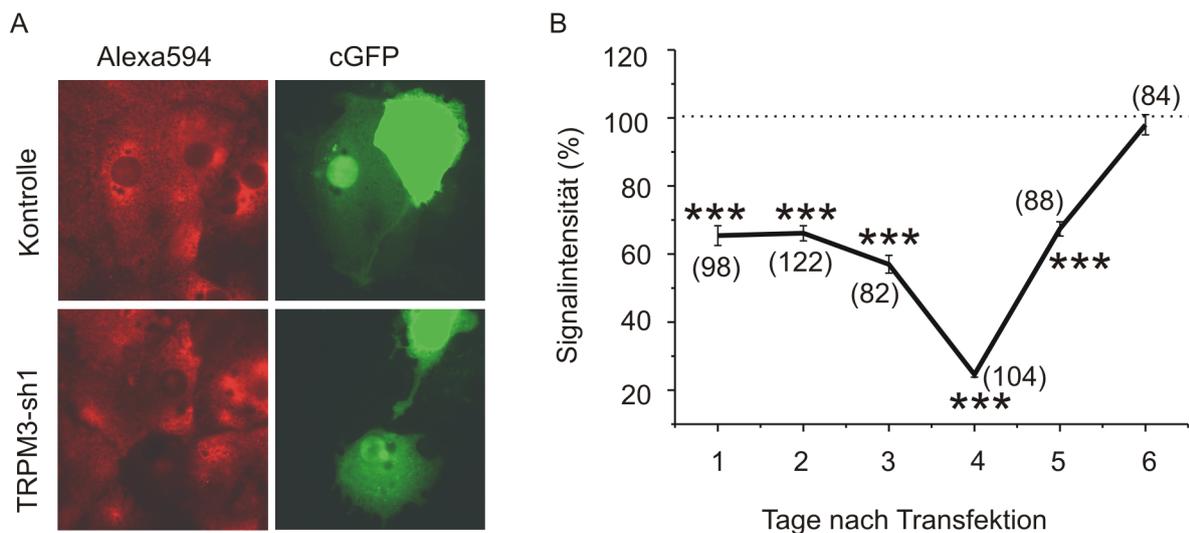


Abb. 24: Knock-down von TRPM3-Proteinen in primären Epithelzellen aus Plexus choroideus durch RNA-Interferenz

A: Immunocytochemische Analyse der TRPM3-RNA-Interferenz in Epithelzellen aus dem Plexus choroideus 4 Tage nach Transfektion mit pRNAT-U6.1-hygro (Kontrolle) oder pRNAT-TRPM3-S1-cGFP (TRPM3-sh1). Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzemission bei 594 nm (Alexa594) und 480 nm (cGFP) nach Färbung mit einem polyklonalen TRPM3-Antiserum AK695. **B:** Densitometrische Analyse der Alexa594-Fluoreszenzintensität in grünen, TRPM3-sh1-exprimierenden Zellen, normiert auf grüne Kontrollzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. *** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrollzellen. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

Im zeitlichen Verlauf (Abb. 24 B) wird erkennbar, dass bereits einen Tag nach Transfektion die Zahl der TRPM3-Proteine in shRNA-exprimierende Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erniedrigt war. Nach vier Tagen waren nur noch ~20% von TRPM3 vorhanden und nach sechs Tagen war die Reduktion vermutlich durch verstärkte Expression des zelleigenen TRPM3-Gens vollständig kompensiert. Die Daten zeigen, dass mit Hilfe der gewählten RNA-Interferenz-Strategie die zelleigene Expression von TRPM3 auch in primären Epithelzellen aus dem Plexus choroideus gehemmt werden kann.

4.3.4 Knock-down von TRPM3-Kanälen in GH3-Zellen durch RNA-Interferenz

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass Zellen der Linie GH3 sowohl TRPM3-Transkripte als auch TRPM3-Proteine exprimieren (vgl. 4.1). Außerdem kann in GH3-Zellen, ähnlich wie in TRPM3 α 2-exprimierenden HEK293-Zellen, durch das Steroid Pregnenolonsulfat eine Ca²⁺-Antwort induziert werden (vgl. Abb. 19, S. 68). Um die Bedeutung von TRPM3 für den Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstrom in GH3-Zellen ursächlich zu untersuchen, wurden die in den Vorversuchen getesteten RNA-Interferenzplasmide (vgl. 4.3.2) in diese Zellen eingeschleust. Abbildung 25 zeigt, dass TRPM3-sh1-exprimierende Zellen (gelbgrüne EYFP-Fluoreszenz) im Vergleich zu Kontrollzellen drei Tage nach Transfektion deutlich weniger TRPM3-Protein aufwiesen.

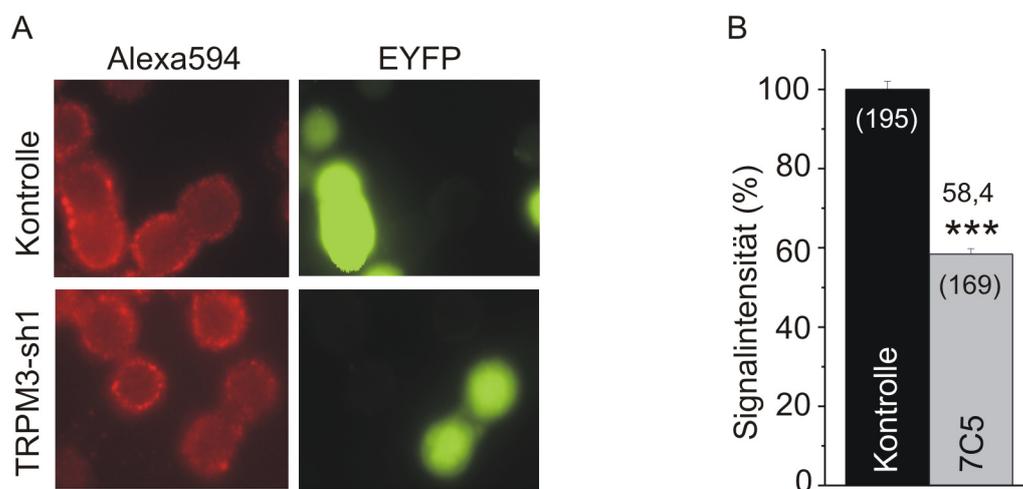


Abb. 25: Reduktion der TRPM3-Proteinmenge in GH3-Zellen durch TRPM3-RNA-Interferenz

A: Immuncytochemische Analyse der TRPM3-RNA-Interferenz in GH3-Zellen 3 Tage nach Transfektion mit pRNAT-U6.1-EYFP (Kontrolle) oder pRNAT-TRPM3-S1-EYFP (TRPM3-sh1). Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzemission bei 594 nm (Alexa594) und 495 nm (EYFP) nach Färbung mit einem monoklonalen TRPM3-Antiserum 7C5. **B:** Densitometrische Analyse der Alexa594-Fluoreszenzintensität in gelbgrünen, TRPM3-sh1-exprimierenden Zellen, normiert auf gelbgrüne Kontrollzellen. *** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrollzellen. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

Die Reduktion betrug 41,6% ($p < 0,001$). Die Zahl der TRPM3-Proteine in GH3-Zellen wurde also durch TRPM3-RNA-Interferenz um ca. die Hälfte vermindert. Dies ging mit einer deutlichen Abnahme des Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstroms einher (Abb. 26): Dieser war ebenfalls drei Tage nach Transfektion sowohl in Gegenwart von TRPM3-sh1 als auch TRPM3-sh2 am stärksten vermindert und zwar um 37,4% bzw 30,9%.

Die gezeigten Knock-down-Experimente zeigen, dass nach Reduktion der Anzahl von TRPM3-Kanälen ein signifikanter Rückgang der Pregnenolonsulfat-induzierten Ca²⁺-Antwort in Zellen der Linie GH3 zu beobachten ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass TRPM3-Kanäle dem Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstrom zu Grunde liegen. Eine ähnliche Funktion nehmen sie vermutlich auch in der Adenohypophyse wahr, wo die von ihnen vermittelten Ca²⁺-Signale die Freisetzung von Hormonen steuern könnten.

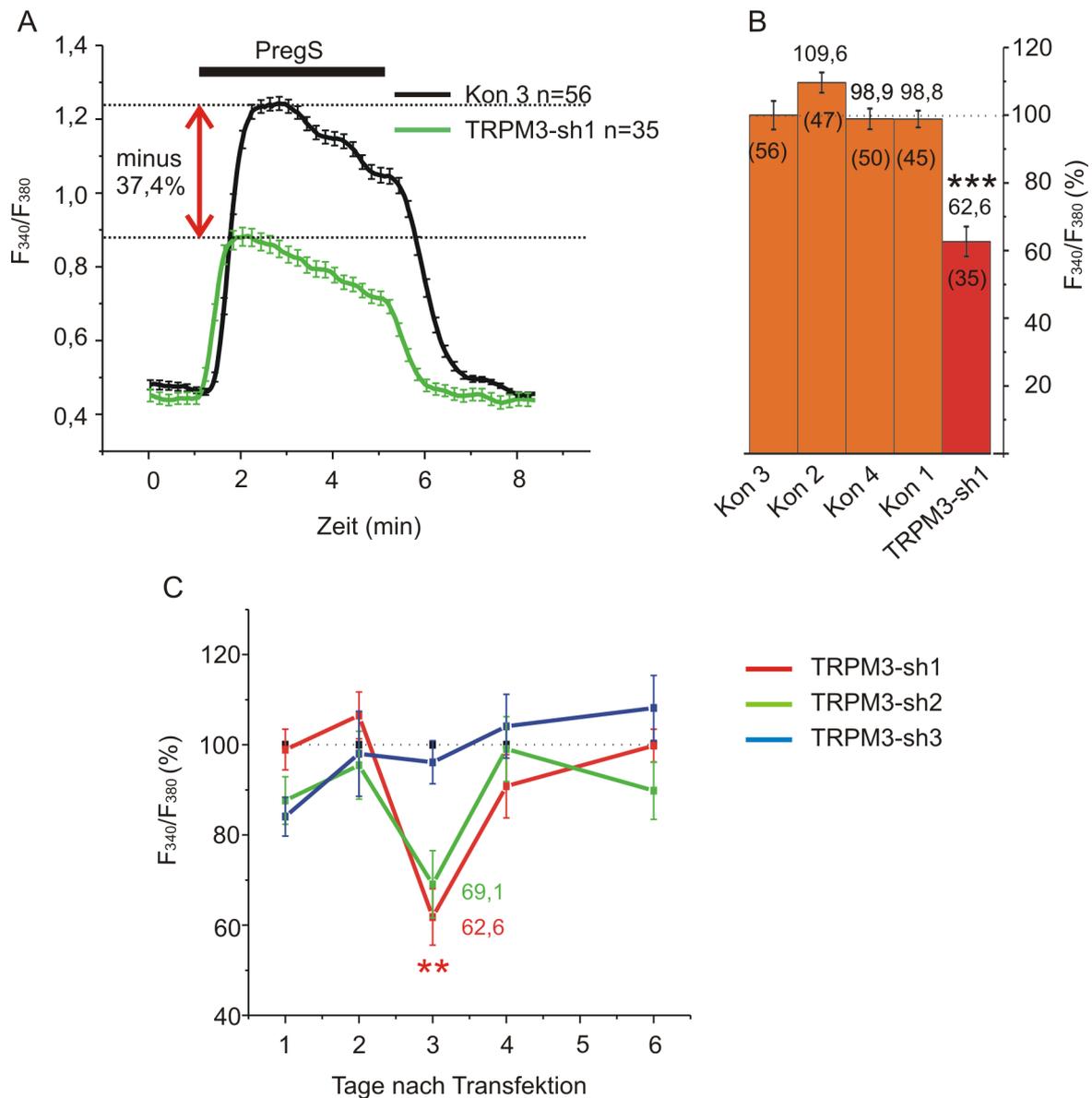


Abb. 26: Knock-down von TRPM3-Kanälen reduziert Steroid-induzierte Ca²⁺-Signale in GH3-Zellen

A: FURA-2 Messung an pRNAT-TRPM3-S1-EYFP transfizierten, gelbgrünen GH3-Zellen im Vergleich zu gelbgrünen, pRNAT-U6.1-EYFP-transfizierten GH3-Zellen, 4 Tage nach Transfektion. Perfundiert wurde mit Puffer S/1Ca und stimuliert wurde mit 30 μ M PregS. Als Kontrolle dienten i.) benachbarte, nicht transfizierte Zellen (Kon 1), ii.) Zellen, die nicht mit Lipofectamin 2000 behandelt wurden (Kon 2), iii.) gelbgrüne Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden (Kon 3) und iv.) Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden aber nicht gelbgrün waren (Kon 4). **B:** Statistische Zusammenfassung der unterschiedlichen Messungen, normiert auf gelbgrün-fluoreszierende, pRNAT-U6.1-EYFP-transfizierte Zellen (Kon 3) (** $p < 0,001$). Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben. **C:** Die oben beschriebenen verschiedenen Messungen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion durchgeführt und wie in **B** ausgewertet (** $p < 0,01$).

4.3.5 Knock-down von TRPM3-Kanälen in Ins-1-Zellen durch RNA-Interferenz

Im Rahmen dieser Dissertation habe ich gezeigt, dass pankreatische Zellen der Linie Ins-1 TRPM3-Transkripte und Proteine exprimieren (vgl. 4.1) und dass in diesen Zellen durch Stimulation mit Pregnenolonsulfat ebenso wie in GH3-Zellen Ca^{2+} -Signale induziert werden, die denen von rekombinanten mTRPM3 α 2-Kanälen ähneln (vgl. Abb. 19, S. 68). Um zu zeigen, dass TRPM3-Kanäle für diesen Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sind, wurde analog zu den in GH3-Zellen durchgeführten Experimenten (vgl. 4.3.4) auch in pankreatischen Ins-1-Zellen die Expression von TRPM3-Kanälen mit Hilfe von RNA-Interferenz blockiert. Die immunocytochemische Färbung in Abbildung 27 zeigt, dass gelbgrüne, TRPM3-sh1-exprimierende Ins-1-Zellen eine um 48,6% verminderte TRPM3-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Durch TRPM3-RNA-Interferenz kann also die Zahl der TRPM3-Kanäle auch in Ins-1-Zellen halbiert werden.

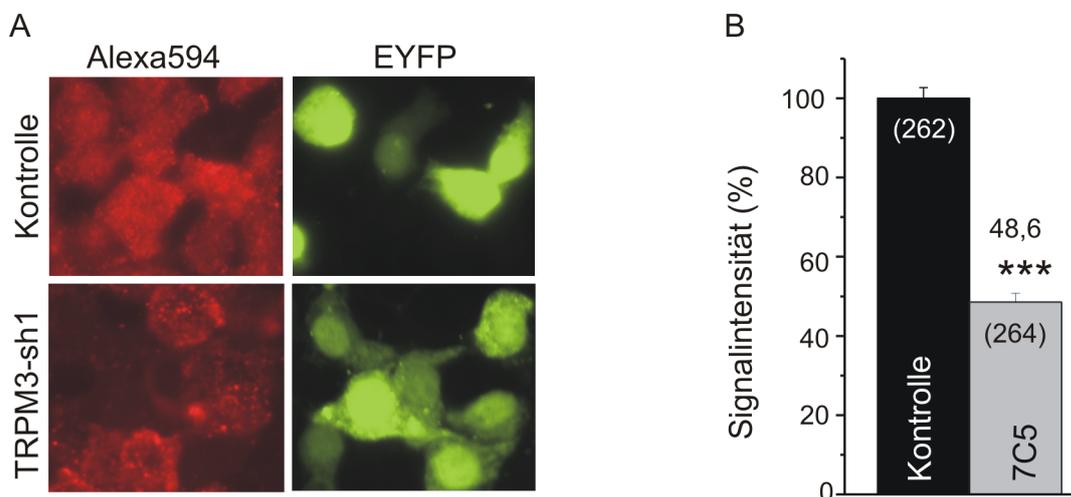


Abb. 27: Reduktion der TRPM3-Proteinmenge in Ins-1-Zellen durch TRPM3-RNA-Interferenz

A: Immunocytochemische Analyse der TRPM3-RNA-Interferenz in Ins-1-Zellen 4 Tage nach Transfektion mit pRNAT-U6.1-EYFP (Kontrolle) oder pRNAT-TRPM3-S1-EYFP (TRPM3-sh1). Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzemission bei 594 nm (Alexa594) und 495 nm (EYFP) nach Färbung mit einem monoklonalen TRPM3-Antiserum 7C5. **B:** Densitometrische Analyse der Alexa594-Fluoreszenzintensität aus **A** in gelbgrünen, TRPM3-sh1-exprimierenden Zellen, normiert auf gelbgrüne Kontrollzellen (***) $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrollzellen). Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

Diese Verringerung der TRPM3-Proteinmenge hatte eine deutliche Reduktion Pregnenolonsulfat-induzierter Ca^{2+} -Signale in Ins-1-Zellen zur Folge (Abb. 28). TRPM3-sh1-exprimierenden Ins-1-Zellen wiesen einen um 51,8% geringeren Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstrom auf als Kontrollzellen.

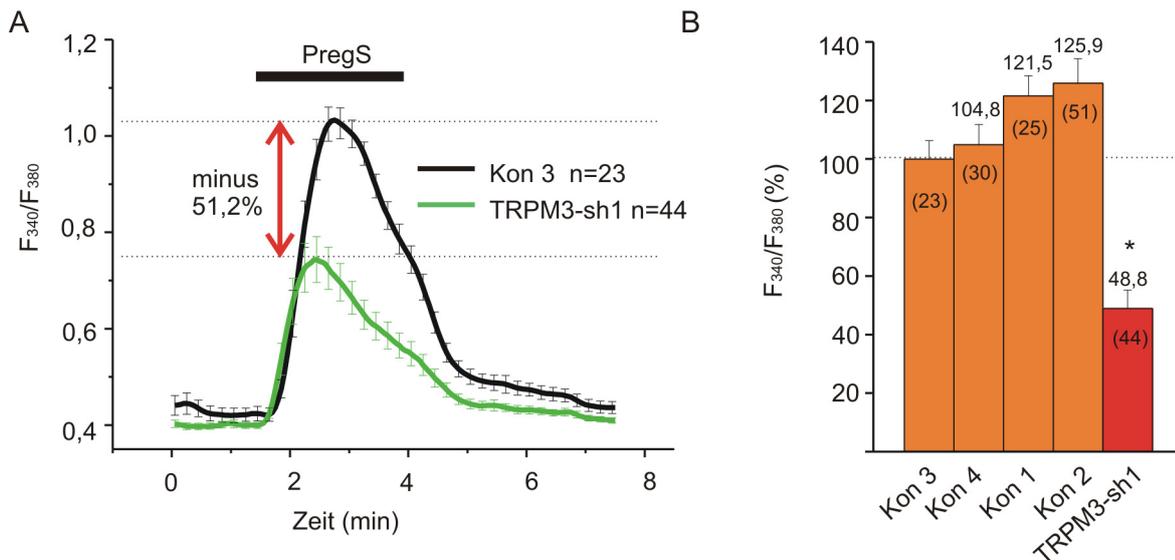


Abb. 28: Knock-down von TRPM3-Kanälen führt zu einer Reduktion des Steroid-induzierten Ca²⁺-Signals in Ins-1-Zellen

A: Gelbgrüne, pRNAT-TRPM3-S1-EYFP- und gelbgrüne, pRNAT-U6.1-EYFP- transfizierte Ins-1-Zellen, wurden 4 Tage nach Transfektion mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS stimuliert. Als Kontrolle dienten i.) benachbarte, nicht transfizierte Zellen (Kon 1), ii.) Zellen, die nicht mit Lipofectamin 2000 behandelt wurden (Kon 2), iii.) gelbgrüne Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden (Kon 3) und iv.) Zellen, die mit pRNAT-U6.1-EYFP transfiziert wurden aber nicht gelbgrün waren (Kon 4). **B:** Statistische Zusammenfassung der unterschiedlichen Messungen. Die Konfidenzintervalle beziehen sich auf gelbe pRNAT-U6.1-EYFP-transfizierte Zellen, auf die auch normiert wurde (Kon 4). Die Zahlen in Klammern zeigen die Anzahl der analysierten Zellen (* $p < 0,05$).

Die Experimente unterstützen die Idee, dass, ebenso wie in GH3-Zellen, TRPM3-Kanäle in Ins-1-Zellen Steroid-gesteuerte Rezeptor-Ionenkanäle bilden. Es ist daher anzunehmen, dass TRPM3-Proteine möglicherweise auch die Insulinfreisetzung beeinflussen und damit u.U. eine bislang unbekannt Funktion im Zuckerstoffwechsel wahrnehmen. Neueste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen dazu übereinstimmend, dass eine Stimulation mit Pregnenolonsulfat zu einer verstärkten Insulinfreisetzung aus primären β -Zellen der Maus führt (Wagner et al., 2007b).

4.4 Modulation zelleigener Steroid-abhängiger Ca²⁺-Signale in endokrinen Zellen

TRPM-Proteine treten *in vitro* in direkte molekulare Wechselwirkung: Coimmunopräzipitations-Experimente mit TRPM3 α 1-Proteinen zeigten eine Copräzipitation von TRPM3 α 1, TRPM3 α 2 und auch von TRPM1_{long}, nicht jedoch eines weiter entfernten Proteins TRPM4 (Philipp et al., 2006). Diese Daten korrespondieren mit Ergebnissen der Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den oben erwähnten Proteinen und bestätigen das aktuelle Modell von TRP-Kanalkomplexen, die sich aus vier TRP-Proteinuntereinheiten zusammensetzen.

Nach Einschleusung in HEK293-Zellen bilden - im Unterschied zu TRPM3 α 2 - weder TRPM3 α 1 noch TRPM1 Steroid-aktivierbare Ca²⁺-Kanäle (vgl. Abb. 16, S. 65). In endokrinen Zellen der Linien GH3 und Ins-1 bilden zelleigene TRPM3-Proteine hingegen Steroid-gesteuerte Rezeptor-Ionenkanäle (vgl. 4.3.4, 4.3.5). Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss die Einschleusung von TRPM3 α 1 und TRPM1 auf Pregnenolonsulfat aktivierte Ca²⁺-Signale in GH3- oder Ins-1-Zellen hat.

4.4.1 Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstroms in GH3-Zellen durch Einschleusung von TRPM3 α 1

Hypophysenzellen der Linie GH3 wurden mit der TRPM3 α 1-cDNA transfiziert. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tage nach Transfektion wurden transfizierte Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz des coexprimierten GFP identifiziert und in FURA-2-Messungen mit nicht grünen, benachbarten Kontrollzellen verglichen. Die in Abbildung 29 dargestellten Experimente zeigen, dass die Einschleusung von TRPM3 α 1 bereits nach 24 h zu einer deutlichen Reduktion des durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Ca²⁺-Signals führte.

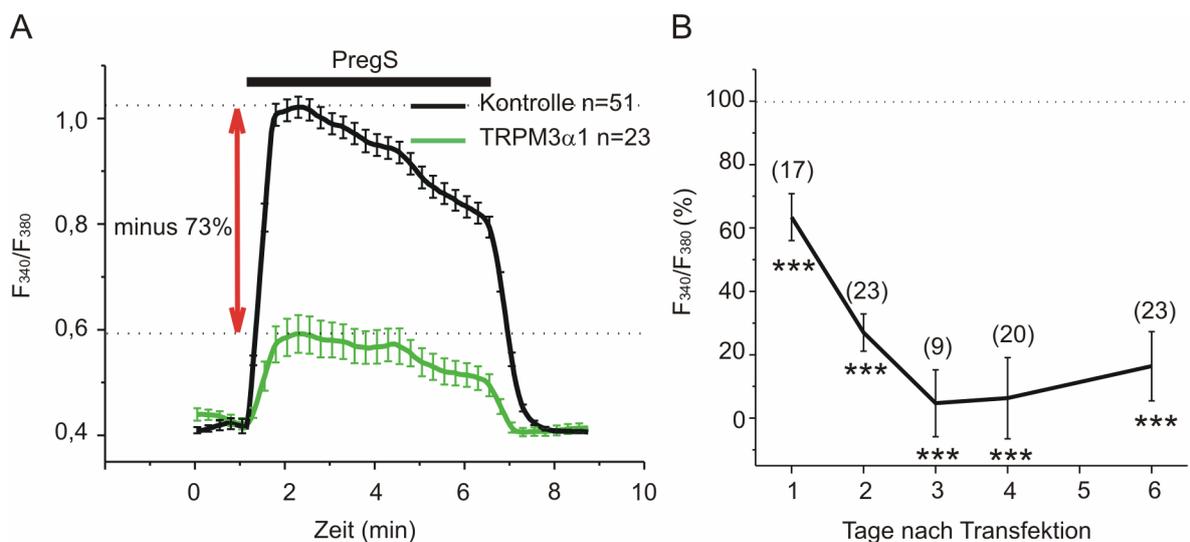


Abb. 29: Reduktion des Steroid-induzierten Ca²⁺-Signals in GH3-Zellen durch Einführen von TRPM3 α 1

A: GH3-Zellen, 48 h nach Transfektion mit MycTRPM3 α 1-pCAGGSM2-IRES-GFP (n=23) und benachbarte untransfizierte Zellen (Kontrolle, n=51) wurden mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS stimuliert. **B:** Reduktion der maximalen Ca²⁺-Signale gemessen von Tag 1 bis Tag 6 nach Transfektion, normiert auf Kontrollzellen desselben Messtages. Die Zahl der analysierten Zellen steht in Klammern über den Datenpunkten (***)p<0,001).

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten deutet dieses Ergebnis auf eine direkte Wechselwirkung eingeschleuster TRPM3 α 1-Proteine mit zelleigenen TRPM3-

Kanälen in GH3-Zellen hin. Offensichtlich führt diese Wechselwirkung zu einer Verminderung des Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstroms durch TRPM3-Kanäle, möglicherweise deshalb, weil die durch $\alpha 1$ -Untereinheiten modifizierten Kanalkomplexe keine oder eine wesentlich geringere Permeabilität für Ca^{2+} aufweisen.

Im weiteren zeitlichen Verlauf nahmen Pregnenolonsulfat-abhängige Signale weiter ab und zwar mit einem Minimum 96-120 h nach Transfektion (Abb. 29 B). Vermutlich liegt der beobachteten Signalverminderung ein zunehmender Ersatz zelleigener Ca^{2+} -permeabler TRPM3-Untereinheiten durch Ca^{2+} -impermeable TRPM3 $\alpha 1$ -Proteine im Kanalkomplex zu Grunde.

Im Folgenden habe ich untersucht, inwiefern die durch TRPM3 $\alpha 1$ -bedingte Reduktion Steroid-induzierter Ca^{2+} -Signale abhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist (Abb. 30):

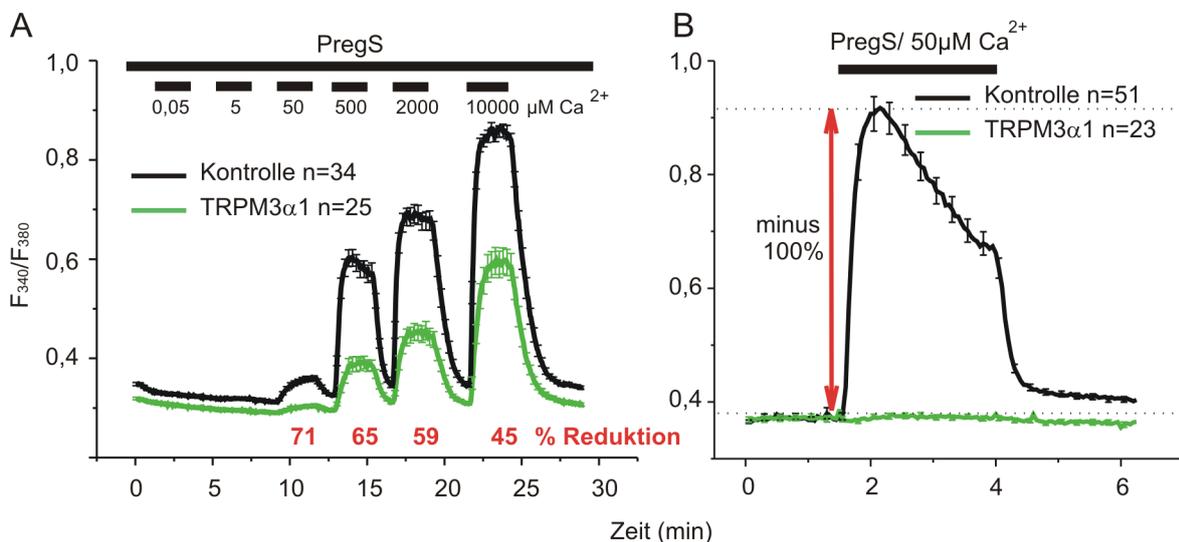


Abb. 30: Verringerung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steigert den hemmenden Effekte von TRPM3 $\alpha 1$ auf das endogene Ca^{2+} -Signal in GH3-Zellen

A: Stimulation der Zellen (TRPM3 $\alpha 1$ n=25, Kontrolle n=34) mit 30 μM PregS und verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen (Puffer S/0,0005Ca; S/0,005Ca; S/0,05Ca; S/0,5Ca; S/2Ca; S/10Ca). Zwischen den Stimulationsschritten wurde mit nominell 0 Ca^{2+} (Puffer S/0Ca) + PregS gespült. **B:** GH3-Zellen (n=23) und benachbarte untransfizierte Zellen (Kontrolle, n=51) wurden 3 Tage nach Transfektion mit MycTRPM3 $\alpha 1$ -pCAGGSM2-IRES-GFP mit Puffer S/0,05Ca perfundiert und mit 30 μM PregS stimuliert.

In Abwesenheit extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen (nominell 0 Ca^{2+} , ~20 nM freies Ca^{2+}) veränderte die Zugabe von 30 μM Pregnenolonsulfat die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht, was zeigt, dass das Steroid-induzierte Ca^{2+} -Signal durch den Einstrom von Ca^{2+} von außen in die Zelle und nicht durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern ausgelöst wurde. Eine Erhöhung des extrazellulären Calciums auf 500 nM bzw. 5 μM zeigte nach vorausgehender und andauernder Stimulation der Zellen mit Pregnenolonsulfat keine Wirkung; die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration blieb unverändert. Erst durch Zugabe von 50

$\mu\text{M Ca}^{2+}$ in die Badlösung, was ca. einem 5000-fachen Überschuss extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen entspricht, zeigten Kontrollzellen eine deutliche, TRPM3 α 1-transfizierte Zellen hingegen nur eine marginale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Kontrollzellen reagierten auf eine weitere Erhöhung extrazellulären Calciums mit einer weiteren Zunahme der Ca^{2+} -Antwort. Die Ca^{2+} -Antwort in TRPM3 α 1-transfizierten Zellen blieb im Vergleich reduziert. Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Reduktion mit steigender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration vermindert war. Während in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ die Ca^{2+} -Signale in TRPM3 α 1-transfizierten Zellen um 71% reduziert waren, lag die Reduktion in Gegenwart von 10 mM Ca^{2+} nur noch bei 45%. Möglicherweise ist die Zahl Ca^{2+} -permeabler TRPM3-Kanäle in TRPM3 α 1-transfizierten Zellen vermindert, jedoch kann in Gegenwart hoher Ca^{2+} -Konzentrationen das Fehlen solcher Kanäle durch vermehrte Aktivität verbleibender, funktionstüchtiger Kanäle besser kompensiert werden, als unter Ca^{2+} -Mangelbedingungen.

In einem weiteren Experiment wurde die TRPM3 α 1-abhängige Reduktion Steroid-induzierter Ca^{2+} -Signale in GH3-Zellen in Gegenwart von $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($\text{EC}_{50} = 68 \mu\text{M}$, vgl. 4.2.4), also bei ungefähr halbmaximaler Effektivdosis, diesmal aber ohne Vorstimulation mit Pregnenolonsulfat untersucht (Abb. 30 B). Unter diesen Bedingungen löste die Zugabe von Pregnenolonsulfat in Kontrollzellen im Vergleich einen deutlich stärkeren Ca^{2+} -Einstrom aus (vgl. Abb. 30 A), was darauf hindeutet, dass TRPM3-Steroidrezeptor-Ionenkanäle durch Dauerstimulation desensibilisiert werden. In diesem unabhängigen Experiment konnte in benachbarten, TRPM3 α 1-transfizierten Zellen kein Ca^{2+} -Einstrom detektiert werden. Die durch TRPM3 α 1-Einschleusung ausgelöste Reduktion der Steroid-induzierten Ca^{2+} -Signale lag bei 100%. Dieses Beispiel zeigt besonders deutlich, dass TRPM3 α 1-Proteine einen starken dominant-negativen Einfluss auf zelleigene Pregnenolonsulfat-stimulierbare Ca^{2+} -Kanäle ausüben.

4.4.2 Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in Ins-1-Zellen durch Einschleusung von TRPM3 α 1

Die in GH3-Zellen charakterisierten dominant-negativen Effekte von TRPM3 α 1 auf zelleigene, Steroid-aktivierbare Ca^{2+} -Kanäle zeigten sich auch in pankreatischen β -Zellen der Linie Ins-1 (Abb. 31): Nach Einschleusung von TRPM3 α 1 war auch hier das Ca^{2+} -Signal in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Transfektion der Zellen um bis zu 94% reduziert. Vermutlich verändert auch in diesen Zellen eine direkte Assoziation von TRPM3 α 1 mit zelleigenen TRPM3-Untereinheiten die Permeabilität von TRPM3-Kanalkomplexen für Ca^{2+} -Ionen und moduliert auf diese Weise den durch Steroide ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom.

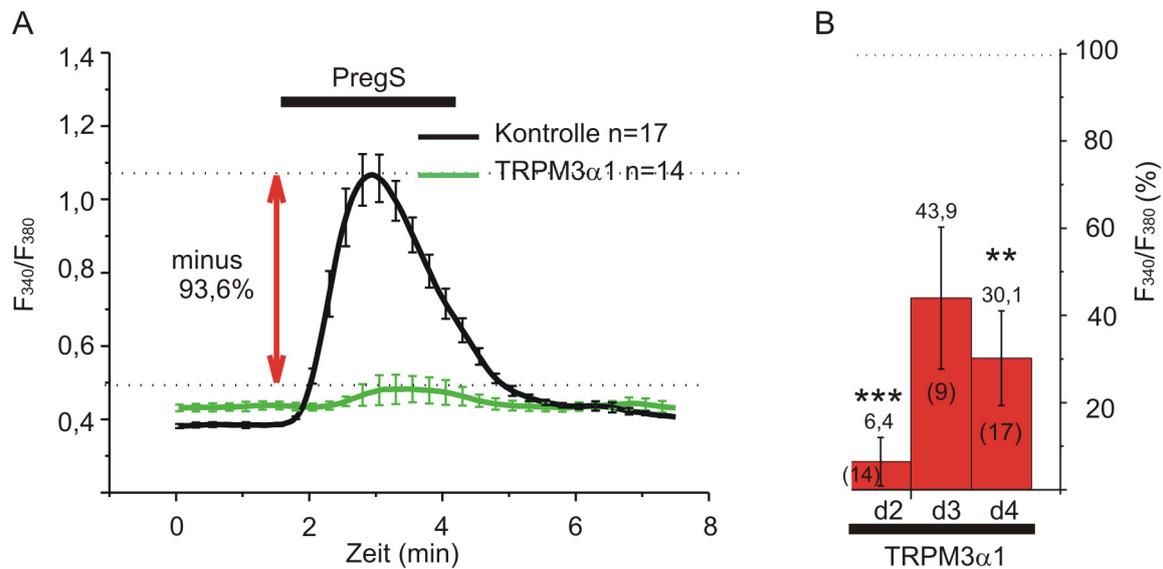


Abb. 31: Die Einschleusung von TRPM3 α 1 reduziert das Pregnenolonsulfat-induzierte Ca²⁺-Signal in Ins-1-Zellen

Ins-1-Zellen wurden mit MycTRPM3 α 1-pCAGGSM2-IRES-GFP transfiziert, mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS stimuliert. **A:** Die Kurven zeigen die gemittelten Werte aus 14 TRPM3 α 1-exprimierenden Zellen und 17 benachbarten, untransfizierten Zellen (Kontrolle) 48 h nach Transfektion. **B:** Statistische Darstellung von FURA-2 Messungen (wie **A**) an Ins-1-Zellen, 2, 3 und 4 Tage nach Transfektion. Dargestellt sind die Maximalantworten $F_{340/380}$ in TRPM3 α 1-exprimierenden Zellen, normiert auf die benachbarten Kontrollzellen des jeweiligen Messtages. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die in Abbildung 12 (S. 59) dargestellten Ergebnisse einer RT-PCR-Analyse der Expression von TRPM3 weisen aber darauf hin, dass eine im Porenbereich TRPM3 α 1-identische Variante in GH3- und Ins-1-Zellen nicht exprimiert wird. Es ist daher offen, inwiefern dominant-negative Effekte von TRPM3 α 1 auf Pregnenolonsulfat-aktivierbare Ca²⁺-Kanäle auch *in vivo* eine Rolle spielen.

4.4.3 Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstroms in GH3-Zellen durch Einschleusung von TRPM1

Während TRPM3 α 1-Kanäle nach Überexpression in HEK293-Zellen konstitutiv aktive Kationenkanäle bilden, die aber kaum für Ca²⁺-Ionen permeabel sind (Oberwinkler et al., 2005), konnte für TRPM1_{long} keinerlei Kanalaktivität nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung S. Philipp). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch TRPM1-Proteine in direkte molekulare Wechselwirkung mit TRPM3-Kanalkomplexen treten können (Philipp et al., 2006), und die in Abbildung 12 (S. 59) gezeigten Daten weisen auf eine Coexistenz von TRPM3- und TRPM1-Proteinen sowohl in GH3- als auch Ins-1-Zellen hin. Die Auswirkung der Einschleusung von TRPM1_{long} in GH3-Zellen ist in Abbildung 32 dargestellt.

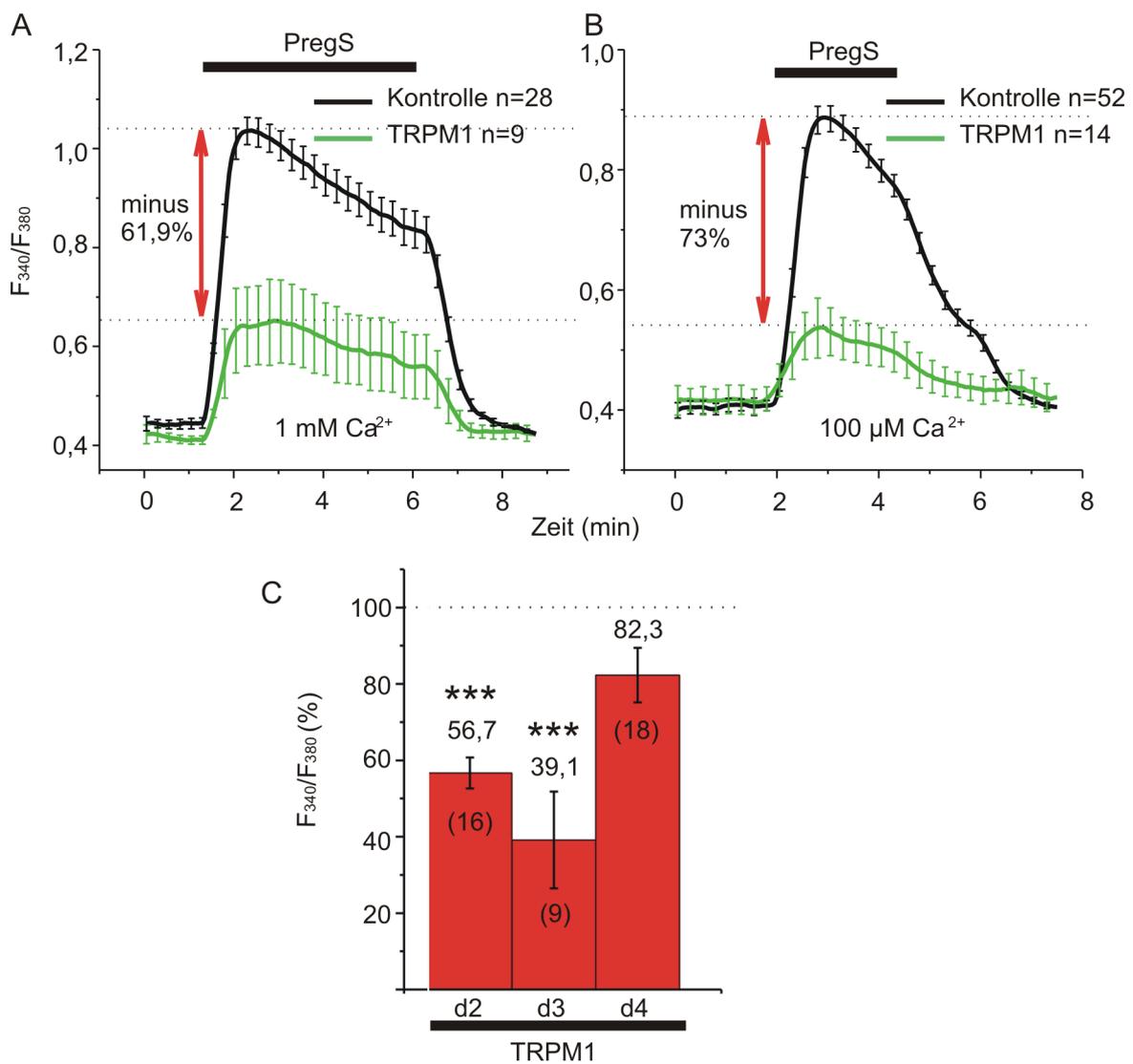


Abb. 32: Reduktion des Steroid-induzierten Ca²⁺-Signals in GH3-Zellen durch Einschleusen einer TRPM1_{long}-cDNA

GH3-Zellen wurden mit MycTRPM1_{long}-pCAGGSM2-IRES-GFP transfiziert, 72 h nach Transfektion mit Puffer S/1Ca (**A**) oder S/0,1Ca (**B**) perfundiert und mit 30 μM PregS stimuliert. Die Kurven zeigen die gemittelten Werte aus 9 (14) TRPM1-exprimierenden Zellen und 28 (52) benachbarten, untransfizierten Zellen (Kontrolle) 3 Tage nach Transfektion. **C**: Statistische Darstellung von FURA-2 Messungen (wie **A**), 2, 3 und 4 Tage nach Transfektion. Aufgetragen sind die Maximalantworten F_{340/380} in transfizierten Zellen, normiert auf Kontrollzellen des jeweiligen Messtages. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben (***)p<0,001 bezogen auf Kontrollzellen).

Ebenso wie TRPM3α1 führte TRPM1_{long} zu einer signifikanten Reduktion Pregnenolonsulfat-induzierter Ca²⁺-Signale. Dabei war die Verminderung 72 h nach Transfektion mit 61% am größten. Offensichtlich ist auch TRPM1 in der Lage Steroid-abhängige Ca²⁺-Signale in GH3-Zellen in ähnlicher Weise wie TRPM3α1 dominant-negativ zu beeinflussen. Ebenso wie im Falle von TRPM3α1 stellte sich der dominant-negative Effekt von TRPM1_{long} in Gegenwart geringer extrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen noch deutlicher dar (Abb. 32 B). Die

Beeinflussung durch TRPM1_{long} erscheint im Vergleich zu TRPM3 α 1 geringer, jedoch macht die gleichzeitige Präsenz von TRPM3- und TRPM1-Transkripten in GH3- und Ins-1-Zellen eine direkte Wechselwirkung der codierten Proteine und damit eine Modulation Steroid-abhängiger Ca²⁺-Signale auch *in vivo* wahrscheinlich.

4.4.4 Beeinflussung des Steroid-induzierten Ca²⁺-Einstroms in Ins-1-Zellen durch Einschleusung von TRPM1

Diese Hypothese wird auch durch die Untersuchung von Pregnenolonsulfat-induzierten Ca²⁺-Signalen in pankreatischen β -Zellen der Linie Ins-1 unterstützt. Auch hier führte die Einschleusung von TRPM1_{long} zu einer signifikanten Verminderung des Ca²⁺-Signals in Abhängigkeit von der Dauer der Transfektion (Abb. 33).

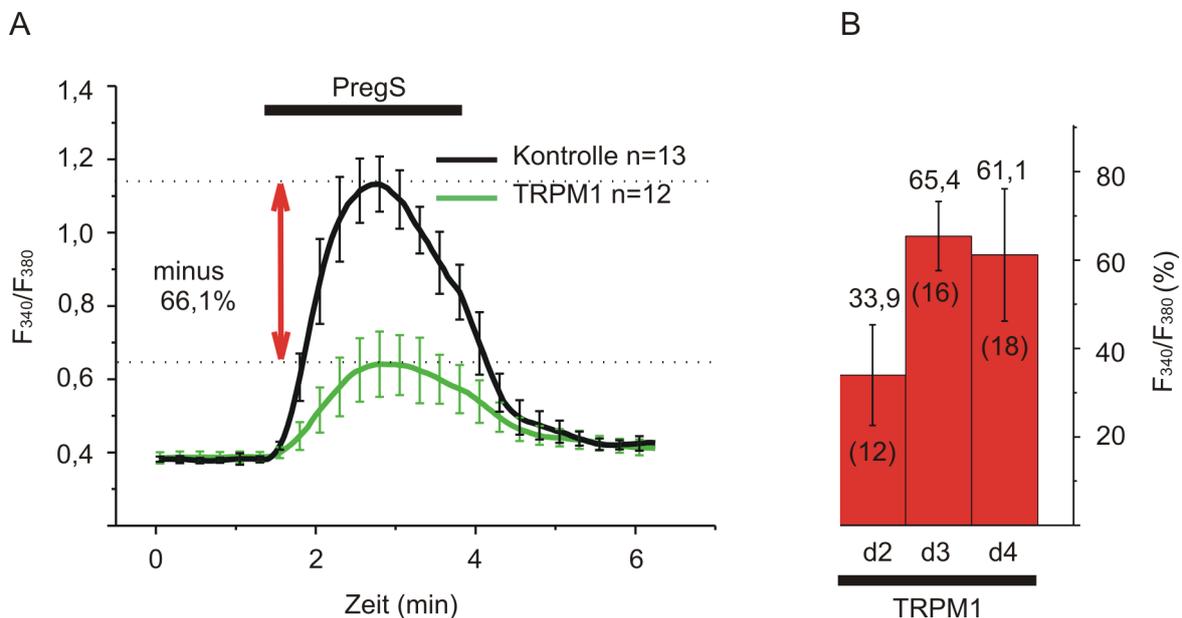


Abb. 33: Verringerung des Steroid-induzierten Ca²⁺-Signals in Ins-1-Zellen durch Einführung von TRPM1_{long}

A: Ins-1-Zellen wurden mit MycTRPM1_{long}-pCAGGSM2-IRES-GFP transfiziert, mit Puffer S/1Ca perfundiert und mit 30 μ M PregS stimuliert. Die Kurven zeigen die gemittelten Werte aus 12 TRPM1-exprimierenden Zellen und 13 benachbarten untransfizierten Zellen (Kontrolle) 48 h nach Transfektion. **B:** Statistische Darstellung von FURA-2 Messungen (wie **A**) an Ins-1-Zellen, 2, 3 und 4 Tage nach Transfektion. Aufgetragen sind die Maximalantworten F_{340/380} in grünen Zellen (TRPM1), normiert auf die nicht grünen benachbarten Zellen des jeweiligen Messtages. Die Zahl der analysierten Zellen ist in Klammern angegeben.

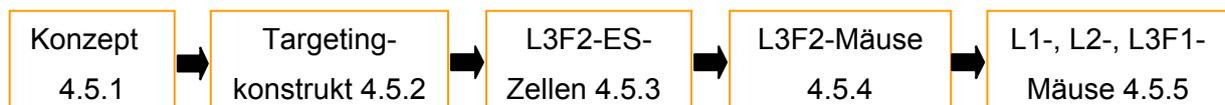
4.5 Inaktivierung des TRPM3-Gens in der Maus

Sowohl mit Hilfe von RNA-Interferenz als auch durch Untersuchung dominant-negativer Effekte konnte die molekulare Identität von Steroid-gesteuerten Rezeptor-Ionenkanälen in pankreatischen Zellen der Linie Ins-1 und Zellen der Linie GH3 aus der Adenohypophyse aufgeklärt werden: TRPM3-Proteine vermitteln dort Pregnenolonsulfat aktivierte Ca^{2+} -Signale. Im Hinblick auf die Bedeutung und die Funktion von TRPM3 im Gesamtorganismus war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, das TRPM3-Gen in der Maus zu inaktivieren.

4.5.1 Konzept zur Inaktivierung des TRPM3-Gens in der Maus

Das in den nachfolgenden Abschnitten beschriebene Konzept zur Inaktivierung des TRPM3-Gens sollte verschiedenen Anforderungen gerecht werden: Durch die Zerstörung einer geeigneten Genregion sollte die Bildung eines funktionstüchtigen TRPM3-Proteins unmöglich gemacht werden (4.5.1.1). Zweitens sollte durch Einschleusung *nur eines* Gentargetingkonstruktes in den TRPM3-Locus ein modifiziertes TRPM3-Allel generiert werden (L3F2-Allel), sodass ausgehend von diesem Allel die Herstellung verschiedener Maus-Allele ermöglicht wird (L1, L2, L3F1; 4.5.1.2): Neben der Zerstörung des TRPM3-Gens im Gesamtorganismus (klassischer Knock-out) sollte die Voraussetzung für eine zeitliche und gewebespezifische Inaktivierung geschaffen werden (konditionierter Knock-out). Schließlich sollte durch Knock-in der cDNA des grün-fluoreszierenden Proteins in den TRPM3-Locus zusätzlich die Expression des TRPM3-Gens mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Drittens sollte in dem gewählten Konzept berücksichtigt werden, dass die generierten Genotypen sowohl in rekombinanten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) als auch in rekombinanten Mäusen mit Hilfe von Southernblot und Polymerasekettenreaktion unterscheidbar sind (4.5.1.3).

Zur Umsetzung des beschriebenen Konzeptes (4.5.1) wurde ein Targetingkonstrukt hergestellt (4.5.2), dieses in ES-Zellen transfiziert und rekombinante ES-Zellklone wurden durch Southernblot genotypisiert (4.5.3). Ausgewählte Klone wurden in Blastozysten injiziert und nach Verpaarung chimärer Nachkommen wurden Mäuse mit L3F2-Allel mit Hilfe von PCR identifiziert (4.5.4). Durch Verpaarung dieser Tiere mit Mausstämmen, die als Transgen eine Cre- oder eine Flp-Rekombinase exprimieren, wurden schließlich die verschiedenen Maus-Allele hergestellt (4.5.5).



4.5.1.1 Wahl des zu deletierenden Bereiches im TRPM3-Gen

Eine Möglichkeit um die Expression eines Proteins auszuschalten, ist die Entfernung des Translationsstarts. Alternativ kann durch Zerstörung eines Exons eine Verschiebung des Leserahmens hervorgerufen werden, sodass verkürzte und somit funktionslose Proteine gebildet werden. Dabei sollte das zur Deletion vorgesehene Exon einen funktionell essentiellen Teil des Proteins codieren. Das TRPM3-Gen codiert in Exon 1 und Exon 2 zwei unterschiedliche Translationsstartpunkte, welche zur Bildung von α - bzw. β -Varianten führen. Zwischen Exon 1 und Exon 2 liegt ein 309 kb langes Intron. Da die Länge des Bereiches, der durch homologe Rekombination ersetzt werden kann, begrenzt ist, ist eine gleichzeitige Deletion beider Exons und somit eine Zerstörung beider Translationsstartpunkte erschwert. Die Deletion von Exons, welche den Aminoterminus von TRPM3 codieren, führt im Falle des TRPM3-Gens nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens. Ausserdem werden mindestens fünf Exons alternativ gespleisst (Philipp et al., 2006), sodass deren Fehlen nicht automatisch zum Fehlen eines funktionstüchtigen TRPM3-Proteins führen muss. Ein funktionell bedeutender Teil von TRPM3 ist die von Exon 24 codierte Porenregion (Oberwinkler et al., 2005). Deshalb sollte Exon 24 durch homologe Rekombination entfernt werden. Zusätzlich führt der Verlust von Exon 24 zu einer Verschiebung des Leserahmens, sodass es nach 29 veränderten Aminosäuren zu einem Stopcodon kommt und das Protein hier endet (Abb. 34).

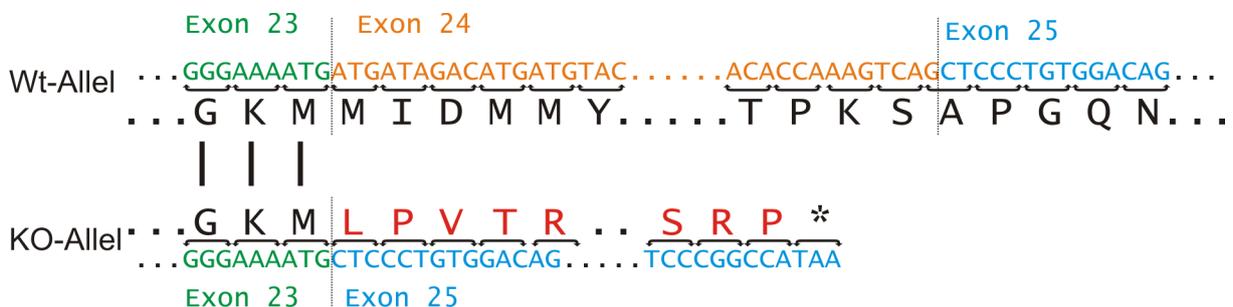


Abb. 34: Deletion von Exon 24 im TRPM3-Gen führt zu einem Leserasterschub und zur Verkürzung der gebildeten Proteine

Vergleich der TRPM3-cDNA-Sequenz und der codierten Aminosäuresequenzen im Wildtyp (Wt)- und Knock-out (KO)-Allel. Im KO-Allel fehlt Exon 24, wodurch Exon 25 an Exon 23 gespleisst wird, und es zu einem Leserasterschub kommt. Nach 29 Aminosäuren kommt es dadurch zu einem vorzeitigen Stop (*).

4.5.1.2 Aufbau des Targetingkonstruktes und Strategie zur Herstellung unterschiedlicher Genotypen

Zur Inaktivierung des TRPM3-Gens sollte das nachfolgend beschriebene Targetingkonstrukt hergestellt werden (Abb. 35). Circa 2000 bp lange, 5'- und 3'- zu Exon 24 flankierende genomische Sequenzen sollten in den Vektor eingeführt werden, um eine homologe Rekombination mit genomischer DNA zu ermöglichen. Um eine konditionierte Inaktivierung des TRPM3-Gens zu ermöglichen, sollten loxP-Sequenzen inseriert werden.

Sequenzabschnitte, die von diesen loxP-Sequenzen flankiert werden, können später mit Hilfe der Aktivität einer Cre-Rekombinase selektiv entfernt werden.

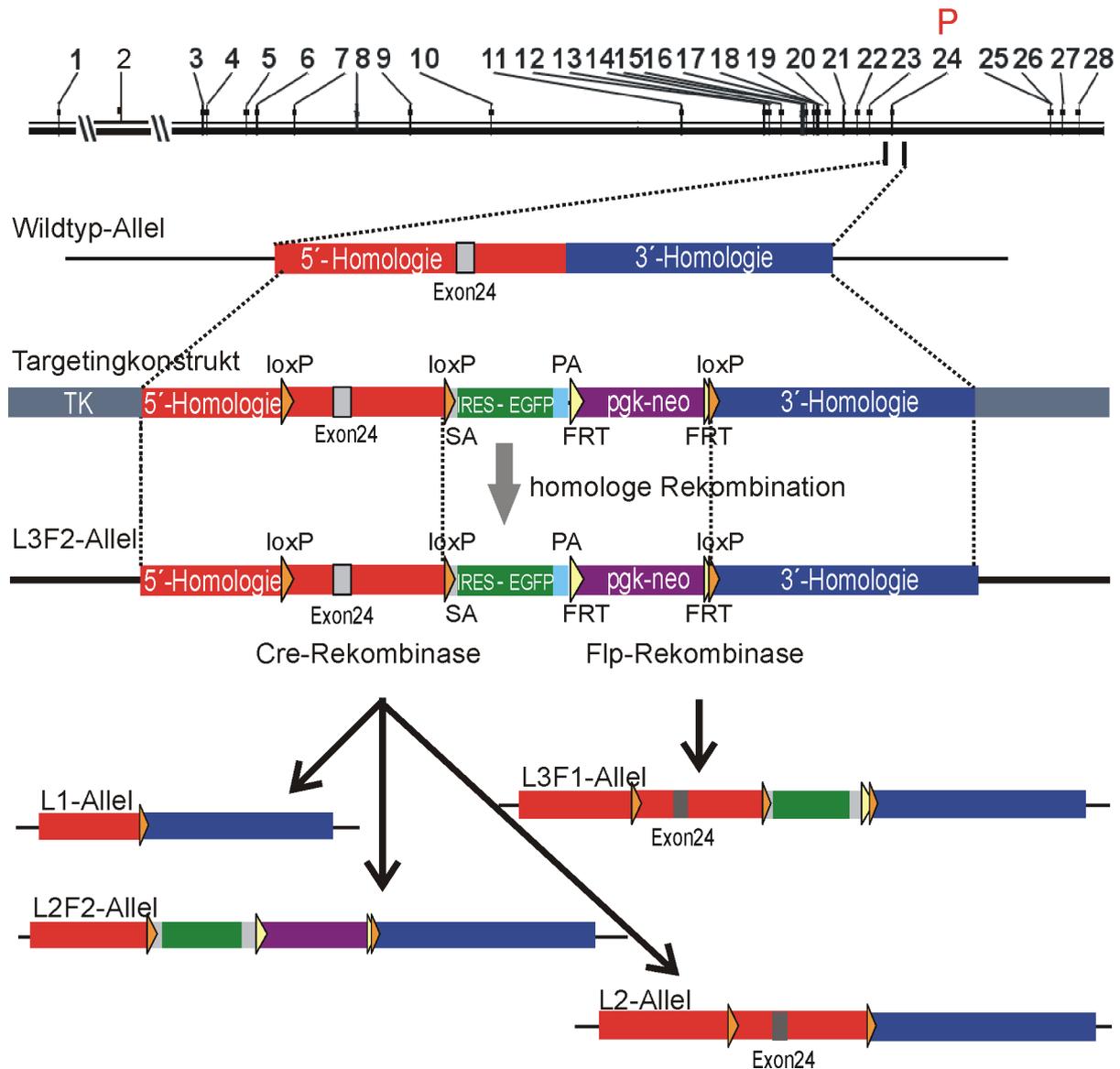


Abb. 35: TRPM3-Knock-out-Strategie

Oben ist die genomische Struktur des TRPM3-Gens mit der Porenregion (P) in Exon 24 dargestellt. Darunter die Vergrößerung des Porenbereiches im Wildtyp-Allel. Das Targetingkonstrukt besitzt zwei flankierende Thymidinkinasekassetten (TK), die 5'-Homologie mit gefloxtem Exon 24 und angrenzenden Intronbereichen, die 3'-Homologie, eine Spleissakzeptorsequenz (SA), eine IRES-EGFP-Kassette, eine pgk-neo-Kassette und ein Polyadenylierungssignal (PA). Die Lage der loxP-Sequenzen (orangefarbene Dreiecke) und FRT-Sequenzen (gelbe Dreiecke) ist eingezeichnet. Durch homologe Rekombination des Targetingkonstruktes mit dem Wildtyp-Allel entsteht das L3F2-Allel. Durch Aktivität der Cre-Rekombinase können das L1-, das L2F2- oder das L2-Allel entstehen. Durch Aktivität einer Flp-Rekombinase kann aus dem L3F2- ein L3F1-Allel gebildet werden.

Zur Positivselektion wurde eine pgk-neo-Kassette vorgesehen. Das eingefügte Neomycinresistenz-Gen (pgk-neo) vermittelt in Zellen eine Resistenz gegen Neomycin (G418) und steht unter der Kontrolle eines Polyglyceratkinase-Promotors (pgk, Abb. 35). Die Polyglyceratkinase zählt zu den sogenannten Haushaltsgenen, die in nahezu jeder Zelle

exprimiert werden. Die Nutzung des Promotors dieses Gens gewährleistet daher eine Expression des Neomycinresistenz-Gens auch in ES-Zellen.

Es gibt Hinweise darauf, dass das Neomycinresistenz-Gen die Expression von Genen, in welche es inseriert ist, hemmen kann (Kwan, 2002; Xu et al., 2001a; Nagy et al., 1998; Meyers et al., 1998). Um eine Fehlinterpretation des Phänotyps mutierter TRPM3-Mäuse zu vermeiden, muss nach erfolgreicher Positivselektion die cDNA des Resistenz-Gens aus dem Genom entfernt werden. Dies sollte durch Einschleusung sogenannter FRT-Sequenzen gewährleistet werden, die als Erkennungssequenzen der Flp-Rekombinase die pgk-neo-Kassette flankieren (Abb. 35). Im Targetingkonstrukt wurden ausserdem zwei Thymidinkinasekassetten vorgesehen. Sie liegen ausserhalb der TRPM3-homologen Abschnitte und werden bei erfolgreicher Rekombination des TRPM3-Targetingkonstruktes mit dem TRPM3-Gen entfernt. Nur bei zufälliger, nichthomologer Rekombination gelangt das Thymidinkinase-Gen ins Mausgenom und solche Zellen können durch Zugabe von Ganciclovir eliminiert werden (Negativselektion). Es wurden zwei flankierende Thymidinkinasekassetten vorgesehen, um mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass das Konstrukt bruchstückhaft unter Verlust von Thymidinkinase-Sequenzabschnitten ins Genom integriert. Schließlich sollte das Targetingkonstrukt die cDNA des grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP) mit einer Spleiss-Akzeptor-Stelle (SA), einer internal ribosomal entry site (IRES) und einem Polyadenylierungssignal (PA) enthalten. Die Spleiss-Akzeptor-Stelle ermöglicht, dass die EGFP-cDNA an Exon 24 gespleisst wird. Die IRES-Sequenz stellt eine zweite (interne) Ribosomenbindungsstelle dar und ermöglicht die Translation der strangabwärts gelegenen GFP-cDNA. Durch gleichzeitige Translation von TRPM3 und GFP von demselben Transkript wird die Expression von TRPM3 mit Hilfe der grünen Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins optisch sichtbar. Das Polyadenylierungssignal führt zur Anheftung eines Poly(A)-Schwanzes an die mRNA und soll auf diesem Wege zur Stabilisierung des Transkripts beitragen. Die Rekombination des oben beschriebenen Targetingkonstruktes führt zur Bildung des gewünschten L3F2-Allels, als Ausgangsbasis für die Herstellung der vorgesehenen Genotypen durch Verpaarung (Abb. 47).

Durch Verpaarung von Mäusen mit einem L3F2-Allel mit Tieren, die stabil die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren, kommt es zur Bildung eines L1-Allels, auch klassischer Knock-out oder Minus-Allel genannt, indem der gesamte Bereich zwischen der ersten und der dritten loxP-Sequenz, einschließlich Exon 24, deletiert wird (Abb. 35). Das Fehlen von Exon 24 sollte zum Fehlen der Kanalpore führen, sodass im rekombinanten Organismus keine TRPM3-abhängigen Ionenströme nachweisbar sind.

Für eine konditionierte Inaktivierung von TRPM3 werden Tiere gebraucht, deren Exon 24 von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird (L2- oder Flox-Allel). Um Tiere mit einem L2-Allel zu

erhalten, werden Mäuse mit einem L3F2-Allel mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des E1a-Promotors exprimieren (Abb. 35). Durch die schwache Aktivität dieses Promotors und der damit verbundenen geringen Expression der Cre-Rekombinase kommt es zur Bildung unterschiedlicher Allele. Neben dem L1-Allel wird auch das hier gewünschte L2-Allel und ein im Rahmen dieser Untersuchungen unerwünschtes L2F2-Allel gebildet. Tiere, die ein L2-Allel besitzen, können dann mit Mäusen verpaart werden, in welchen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors oder eines zeitlich-steuerbaren Promotors aktiv ist. Danach kommt es zur Bildung eines L1-Allels, nur in dem Gewebe, in dem der Promotor der Rekombinase aktiv ist, oder erst dann, wenn die Rekombinase durch Gabe eines Induktors aktiviert wurde.

Durch Einführen einer EGFP-cDNA in das TRPM3-Gen, einem sogenannten Knock-in, sollten TRPM3-exprimierende Zellen mit Hilfe der grünen Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. So sollte es möglich werden, die lückenhaften Informationen über das Expressionsmuster von TRPM3-Kanälen zu vervollständigen. Im L3F1-Allel wird die EGFP-cDNA an Exon 24 gepleisst, sodass der endogene TRPM3-Promotor die gleichzeitige Expression von TRPM3 und der EGFP-cDNA steuert (Abb. 35). Ein L3F1-Allel entsteht durch Kreuzen der $TRPM3^{+/L3F2}$ -Tiere mit Mäusen, welche stabil eine Flp-Rekombinase exprimieren. Durch deren Aktivität wird das Neomycinresistenz-Gen nach Rekombination zwischen den beiden FRT-Sequenzen aus dem Genom entfernt (Abb. 35). Tiere mit einem L3F2- oder L2F2-Allel könnten ebenfalls für solche Expressionsstudien verwendet werden. Allerdings besitzen sie noch die Neomycinresistenz-Kassette, welche möglicherweise hemmend auf die Promotoraktivität des Ziel-Gens wirkt (Kwan, 2002). Deshalb sollten für TRPM3-Expressionsstudien nur L3F1-Tiere, ohne pgk-neo-Kassette, verwendet werden.

Bedingt durch ihre Herkunft sind die TRPM3-Mäuse eine Mischung des genetischen Materials von 129/SvJ- und C57Bl/6-Mäusen. Da die verschiedenen Mausrassen phänotypische Unterschiede aufweisen, werden TRPM3-defiziente Mäuse und später auch $TRPM3^{L3F1/L3F1}$ -Mäuse auf den genetischen Hintergrund von 129/SvJ-Mäusen, von denen die ES-Zellen stammen („in bred“), und auf den genetischen Hintergrund von C57Bl/6N-Mäusen, von denen die Blastozysten stammen („out bred“), zurückgekreuzt. Das dauert ca. zehn Generationen (Hickman-Davis, 2001). Danach können Untersuchungen des veränderter TRPM3-Phänotyps durchgeführt werden.

4.5.1.3 Strategien zur Genotypisierung

Durch Positiv- und Negativselektionskassetten im Targetingkonstrukt werden zwar homolog rekombinante ES-Zellklone angereichert, trotzdem ist das Targetingkonstrukt nicht in allen selektierten ES-Zellen auch wirklich korrekt inseriert. Möglicherweise integriert das Neomycinresistenz-Gen auch zufällig ins Genom und das TRPM3-Allel bleibt unverändert oder das Targetingkonstrukt integriert unvollständig in den TRPM3-Locus. Um gewünschte von ungewünschten Allelen zu unterscheiden, müssen die überlebenden ES-Zellklone mit Hilfe von Southernblot-Analysen genotypisiert werden (Abb. 36). Mit Hilfe des Targetingkonstruktes werden zusätzliche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme ins Genom eingebracht. Sie ermöglichen es, die nach Hydrolyse entstandenen Restriktionsfragmente im Southernblot zu unterscheiden (Abb. 36, Tab. 14). Durch Verwendung von zwei Sonden 1 und 3 sollte sichergestellt werden, dass das gesamte Konstrukt in den TRPM3-Locus integriert und das L3F2-Allel gebildet wurde.

Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass das Targetingkonstrukt noch **zusätzlich** an anderer Stelle integriert wurde. Deswegen sollten homolog-rekombinante Klone zusätzlich mit einer internen Neo-Sonde, welche mit der cDNA des Neomycinresistenz-Gens hybridisiert, untersucht werden (Abb. 36): Bei korrekter, nur einmaliger Integration des Konstruktes und korrekter Bildung des L3F2-Allels, werden nach Spaltung der DNA mit BglII oder AvrII Fragmente nur jeweils **einer** Größe erwartet (Tab. 14). Eine Rekombination innerhalb des L3F2-Allels durch die Cre- oder Flp-Rekombinase sollte ebenfalls mit Hilfe von Southernblot-Analysen nachgewiesen werden. Dazu kann genomische DNA mit SphI oder NheI hydrolysiert und mit Sonde 2 untersucht werden. Zur Unterscheidung des L2-Allels vom Wildtyp-Allel sollte zusätzlich mit XbaI hydrolysiert und mit Sonde 3 hybridisiert werden (Abb. 36, Tab. 14).

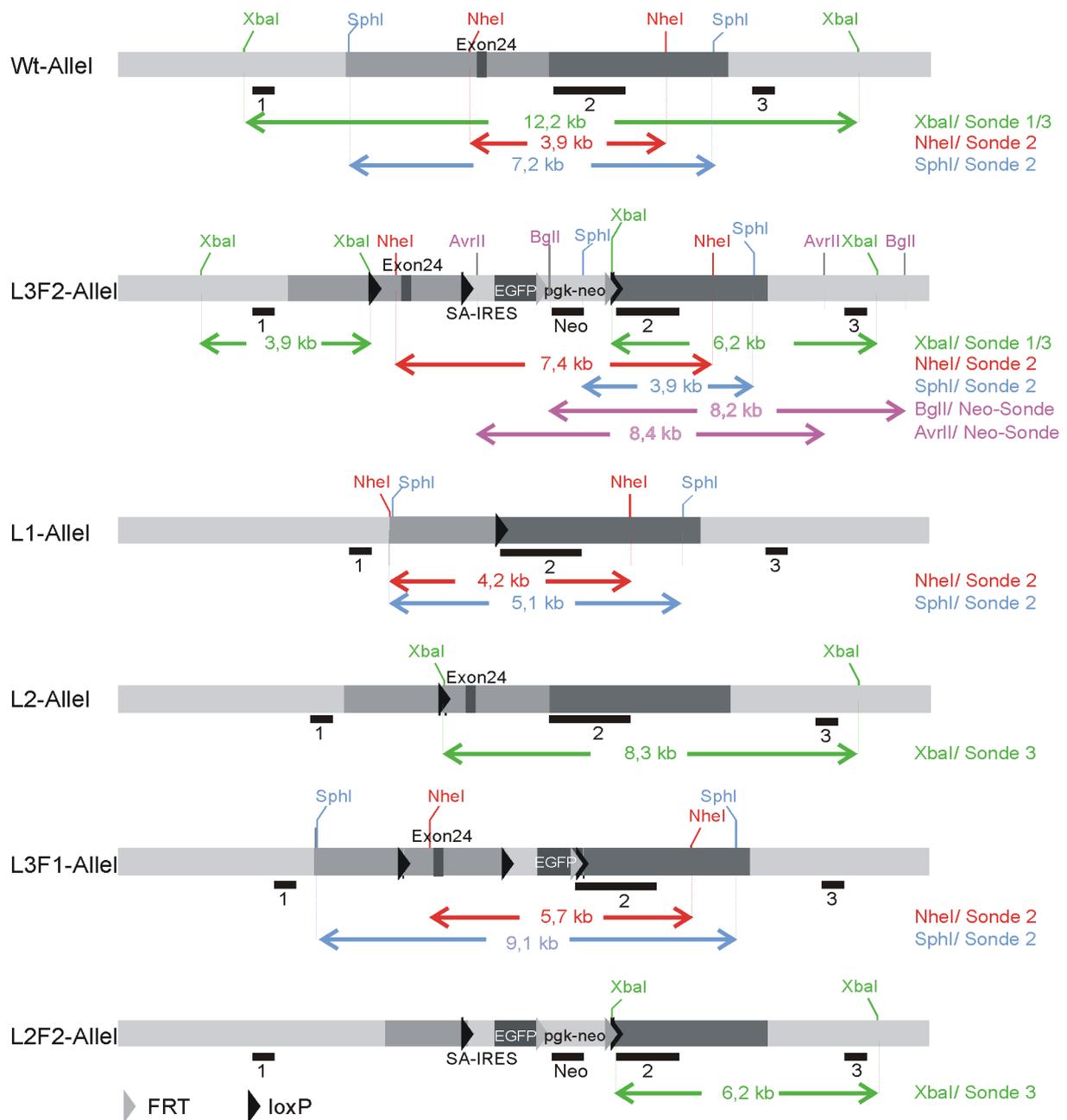


Abb. 36: Southernblot-Strategie zur Genotypisierung

Die verschiedenen TRPM3-Allele, die nach Rekombination entstehen können, sind im Bereich von Exon 24 dargestellt. Die farbigen Pfeile geben die Größen der Fragmente wieder, die nach Hydrolyse mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen entstehen. Nur solche Restriktionsschnittstellen sind wiedergegeben, die zur Bildung von Fragmenten führen, die mit den angegebenen DNA-Sonden nachgewiesen werden. Schwarze Balken zeigen die Bereiche an, in welchen die Sonden 1, 2 und 3 und die Neo-Sonde (Neo) hybridisieren.

Tab. 14: Größen im Southernblot nachweisbarer DNA-Fragmente nach Hydrolyse unterschiedlicher Allele

Enzym	Sonde	Wt	L3F2	L3F1	L1	L2F2	L2
XbaI	Sonde 1	12,2	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
XbaI	Sonde 3	12,2	6,2	6,2	6,2	6,2	8,2
NheI	Sonde 2	3,9	7,4	5,7	4,2	7,7	3,9
SphI	Sonde 2	7,2	3,9	9,1	5,1	3,9	7,2
BglI	Neo-Sonde	-	8,2	-	-	6,4	-
AvrII	Neo-Sonde	-	8,4	-	-	6,6	-

Eine Alternative zur Genotypisierung durch Southernblot ist die Polymerasekettenreaktion. Ihr Vorteil ist, dass sie deutlich schneller Ergebnisse zeigt, ihr Nachteil, dass sie fehleranfälliger ist. Abbildung 37 zeigt die Lokalisation der für die PCR vorgesehenen Primer und Tabelle 15 die erwarteten Größen der allelytischen Amplifikationsprodukte.

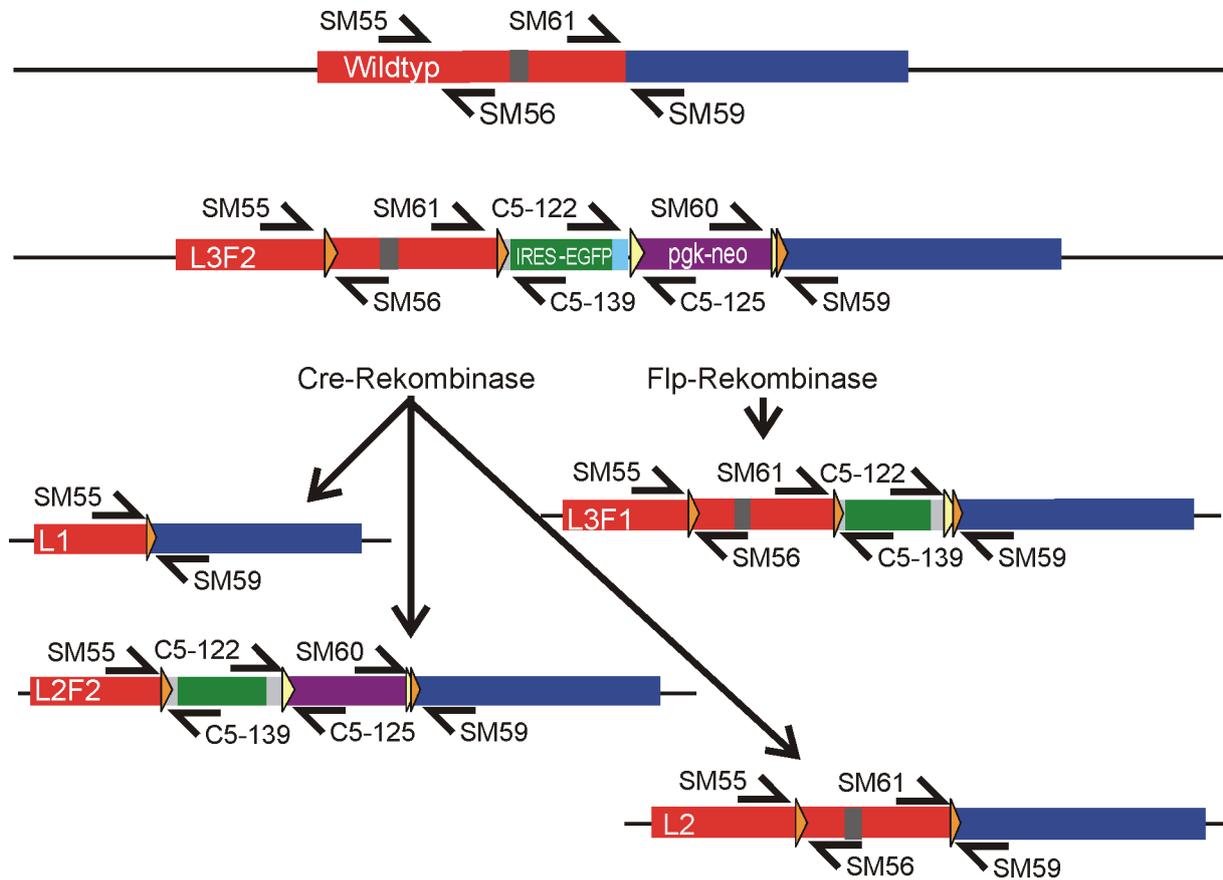


Abb. 37: PCR-Strategie zur Genotypisierung

Name, Lage und Orientierung der Primer sind für jedes Allel als Halbpeile dargestellt.

Tab. 15: Primerkombinationen und erwartete Fragmentgrößen für die PCR-Genotypisierung

Primerkombination	Fragmentgrößen (bp)					
	Wt	L3F2	L1	L2	L2F2	L3F1
SM55/SM56	327	385	-	385		385
SM55/C5-139	-	2484	-	-	354	2484
SM55/C5-125	-	4086	-	-	1989	-
SM55/SM59	2371	5919	235	2487	3789	4148
SM61/C5-139	-	307	-	-	-	307
SM61/C5-125	-	1909	-	-	-	-
SM61/SM59	161	3742	-	221	-	1971
C5-122/C5-125	-	332	-	-	332	-
C5-122/SM59	-	2165	-	-	2165	377
SM60/SM59	-	396	-	-	396	-

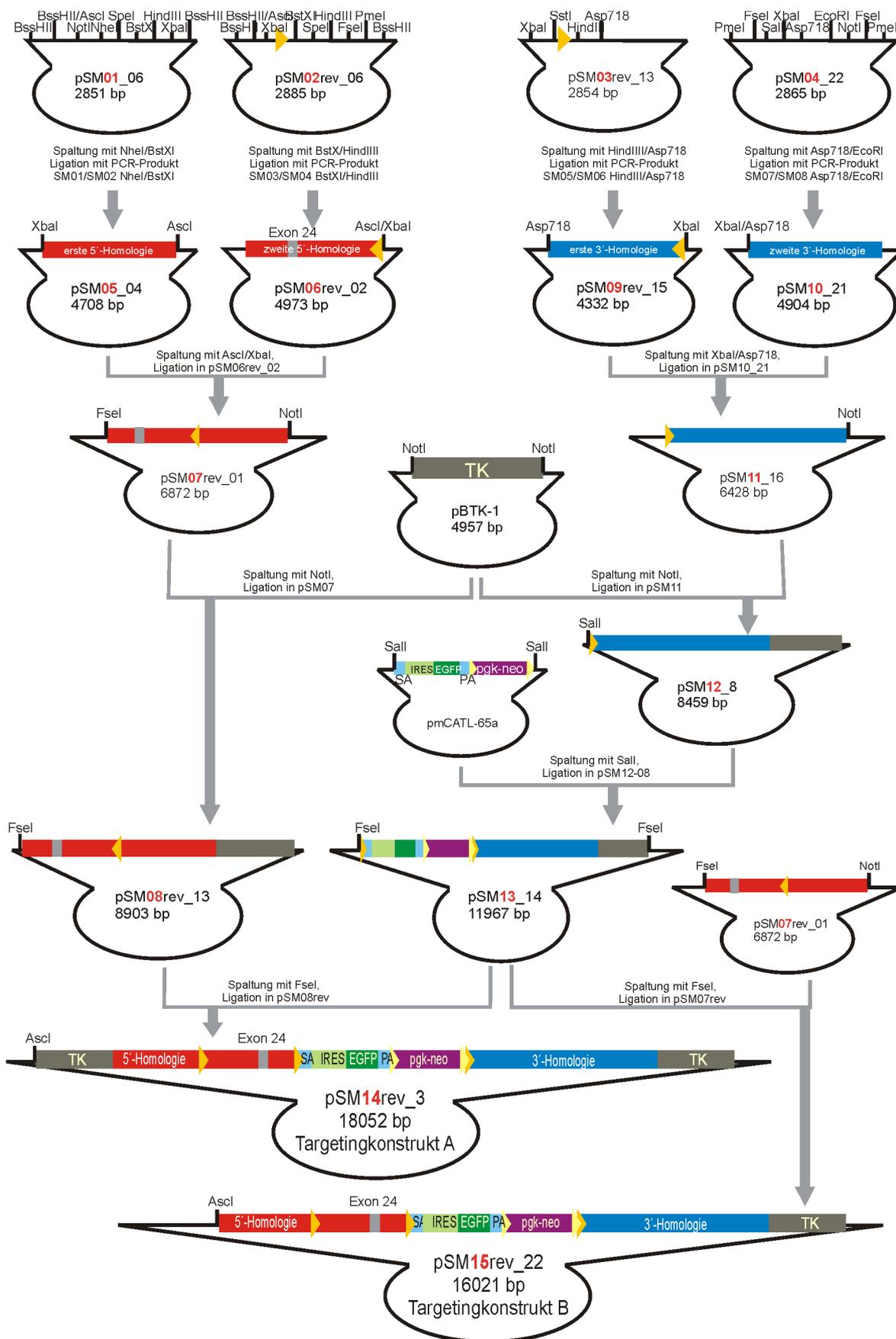
4.5.2 Klonierung des Targetingkonstruktes

Abbildung 38 zeigt die Vorgehensweise zur Herstellung der Targetingkonstrukte A und B. Zunächst wurden zwei flankierende Thymidinkinasekassetten vorgesehen (Targetingkonstrukt A), um mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass das Konstrukt zufällig ins Genom integriert. Dieses Vorgehen erbrachte jedoch keine rekombinanten ES-Zellklone hervor (vgl. 4.5.3). Daher wurde ein zweites Targetingkonstrukt B hergestellt, dem die 5'-terminale Thymidinkinasekassette fehlt (Abb. 38).

Durch Hybridisierung der Oligodesoxyribonukleotidkombinationen SM43/SM44, SM45/SM46, SM47/SM48 und SM49/SM50 und Ligation in den BssIII-geschnittenen Vektor pBluescript KS- wurden vier Gerüstvektoren pSM01_06, pSM02rev_06, pSM03rev_13 und pSM04_22 hergestellt. Diese Gerüstvektoren tragen alle Restriktionsschnittstellen in der für die Klonierung notwendigen Reihenfolge. Ausserdem wurden auf diesem Weg zwei loxP-Sequenzabschnitte eingeführt. Die für die homologe Rekombination mit dem TRPM3-Ziel-Gen notwendigen 5'- und 3'-terminalen Sequenzabschnitte (5'- bzw. 3'-Homologie) wurden mittels PCR in jeweils zwei Teilstücken (Abb. 38) einer Länge von 2000- 2400 bp aus genomischer ES-Zell-DNA mit Hilfe der Phusion-Polymerase amplifiziert (Abb. 39), kloniert und dann in den Vektoren pSM07rev_1 und pSM11_16 zusammengeführt. Eine Genkassette der Länge 3508 bp, welche eine weitere loxP-Sequenz, eine Spleiss-Akzeptor-Stelle (SA), eine IRES-Sequenz, die cDNA des grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP), ein Polyadenylierungssignal (PA) und ein Neomycinresistenz-Gen (pgk-neo) enthält, stammte aus dem Plasmid pmCATL-65a (Olausson, 2005). Das Thymidinkinase-Gen aus dem Plasmid pBTK-1-Plasmid (Olausson, 2005) wurde zweimal ins Targetingkonstrukt A und einmal ins Targetingkonstrukt B eingefügt. Die Targetingkonstrukte wurden endotoxinfrei präpariert (vgl. 3.6.2.3) und zur Kontrolle doppelsträngig sequenziert.

Abb. 38 (nächste Seite): Klonierung der Targetingkonstrukte A und B

Gezeigt sind 5'-Homologie (rot), 3'-Homologie (blau), eine IRES-EGFP-Kassette, die Spleiss-Akzeptor-Stelle (SA), das Polyadenylierungssignal (PA), die Thymidinkinasekassette (TK), die loxP-Sequenzen (orangefarbene Dreiecke), die FRT-Sequenzen (gelbe Dreiecke) und die Polyglyceratpromotor-Neomycinresistenz-Kassette (pgk-neo, violett). In den Gerüstvektoren pSM01_6, pSM02rev_06, pSM03rev_13 und pSM04_22 sind alle für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. In den anderen Vektoren sind nur die für den jeweiligen Klonierungsschritt notwendigen Restriktionserkennungssequenzen angegeben. Die AscI-Schnittstelle in den finalen Konstrukten pSM14rev_3 (Targetingkonstrukt A) und pSM15rev_22 (Targetingkonstrukt B) dient zur Linearisierung der Targetingkonstrukte.



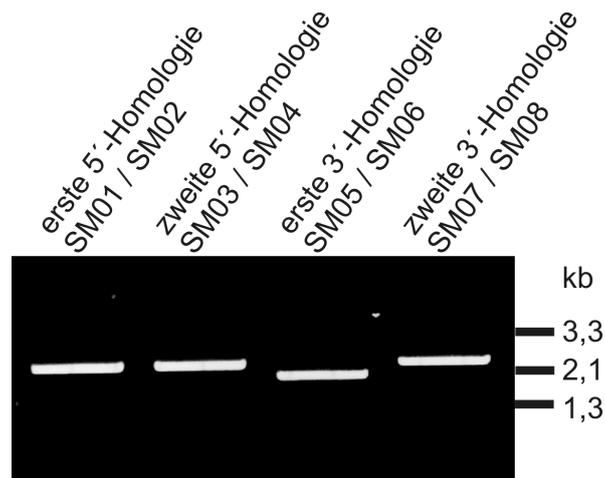


Abb. 39: Amplifikation genomischer TRPM3-DNA-Fragmente

Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 0,8% Agarosegel getrennt. Die verwendeten Primer zur Amplifikation der ersten und zweiten 5'- bzw. 3'-Homologie und die Fragmentgrößen eines Längenstandards sind angegeben.

4.5.3 Einschleusung des Targetingkonstruktes ins TRPM3-Gen von ES-Zellen

Zur homologen Rekombination mit dem TRPM3-Genlocus wurde das Targetingkonstrukt A zunächst durch Restriktion mit *Ascl* linearisiert (Abb. 38) und durch Elektroporation (vgl. 3.8.6) in ES-Zellen eingeschleust. Es wurden zwei parallele Experimente mit je 40 µg Targetingkonstrukt und jeweils $1,2 \times 10^7$ ES-Zellen der ESR1-Linie (Passagenzahl 17) durchgeführt. Nach Selektion mit G418 und Ganciclovir wurden 621 ES-Zellklone isoliert und in 96-Lochplatten transferiert (vgl. 3.8.7). 313 dieser Klone proliferierten und konnten im Southernblot analysiert werden (Abb. 40). Zur Herstellung der DNA-Sonden für die Southernblot-Analysen wurden mittels PCR und der Primer SM09/SM10 1839 bp Fragmente (5'-Sondenbereich) aus genomischer ES-Zell-DNA amplifiziert und in die *Sma*I-Stelle des Vektors pUC18 kloniert (Abb. 40 A). In ähnlicher Weise wurden 2478 bp Fragmente mit den Primern SM11/SM12 amplifiziert (3'-Sondenbereich) und kloniert. Die beiden Sondenbereiche wurden durch Restriktion in jeweils drei Fragmente gespalten, die als Sonden für die Southernblot-Hybridisierung zunächst mit genomischer Wildtyp-ES-Zell-DNA getestet wurden. Ein 639 bp *Sph*I-Fragment aus dem 5'-Sondenbereich (Sonde 1) und ein 848 bp *Xho*I/*Asp*718-Fragment aus dem 3'-Sondenbereich (Sonde 3) zeigten dabei die deutlichsten Signale und wurden fortan zur Southernblot-Analyse der ES-Zellklone verwendet.

Abbildung 40 B zeigt exemplarisch einen von elf Southernblots mit 35 der 313 untersuchten ES-Zellklone.

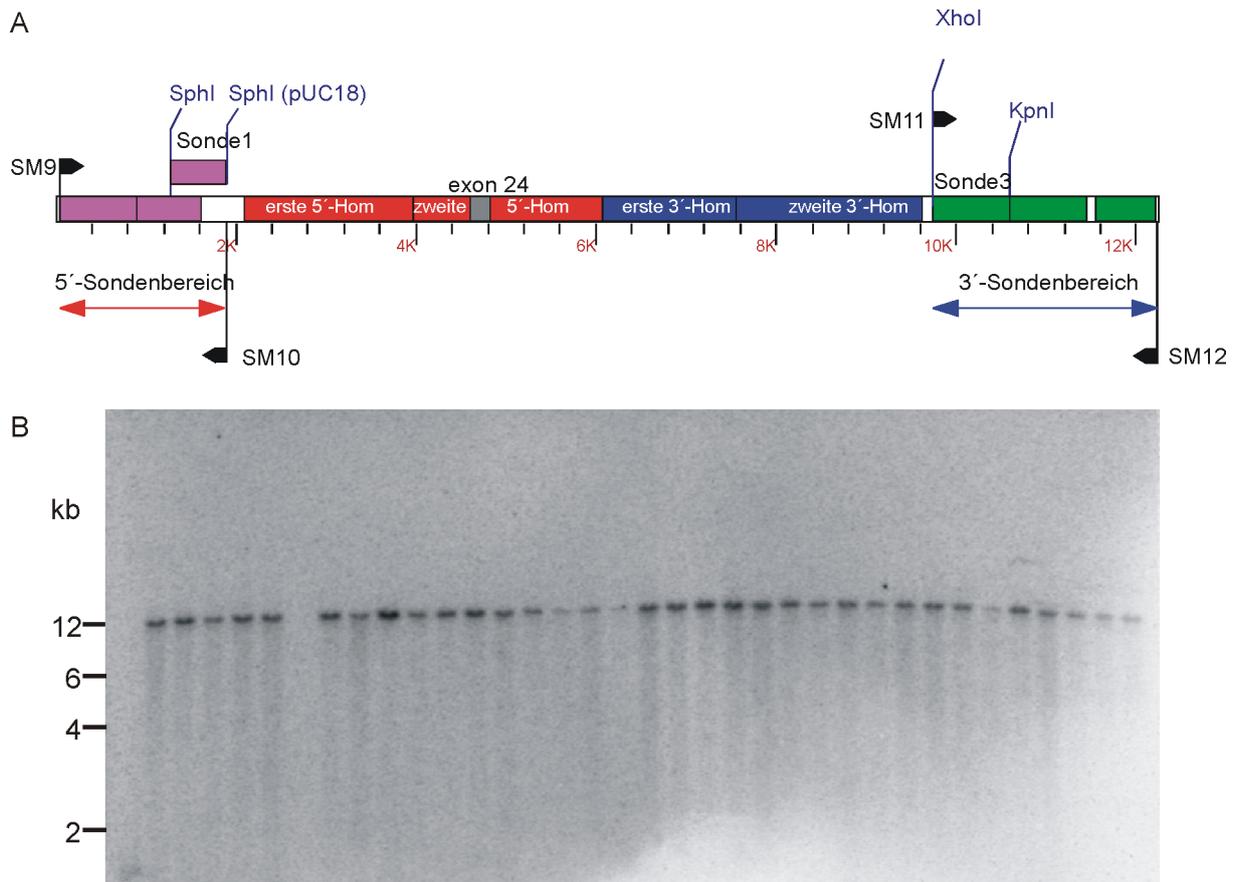


Abb. 40: Southernblot-Analyse von ES-Zellklonen nach Einschleusung des Targetingkonstruktes A

A: Klonierung genomischer DNA zur Herstellung von DNA-Sonden. Name, Lage und Orientierung der Primer zur Amplifikation der 5'- und 3'-Sondenbereiche sind dargestellt. Restriktionsschnittstellen zur Präparation von Sonde 1 und Sonde 3 sind angegeben. **B:** Repräsentativer Southernblot genomischer DNA von 35 ES-Zellklonen nach Hybridisierung mit Sonde 1. Die Fragmentgrößen eines DNA-Längenstandards sind angegeben.

Nach XbaI-Hydrolyse der DNA und Hybridisierung mit Sonde 1 wurden bei jedem Klon nur Wildtyp-Fragmente einer Größe von 12155 bp nachgewiesen, nicht jedoch L3F2-Allel typische 3932 bp Fragmente (Abb. 36, Tab. 14). Somit war bei keinem der 313 analysierten Klone das Targetingkonstrukt homolog in den TRPM3-Genlocus integriert. Möglicherweise treten die beiden 5' und 3' im Targetingkonstrukt gelegenen, identischen Thymidinkinasesequenzen in direkte Wechselwirkung miteinander und verhindern auf diese Weise die homologe Rekombination des Vektors mit dem Ziel-Gen. Ausserdem gibt es Hinweise, dass Zellen welche die Thymidinkinase exprimieren auch benachbarte (Thymidinkinase-freie Zellen) schädigen (Hoganson et al., 1996). Es wurde ein modifiziertes Targetingkonstrukt B hergestellt, dem die 5'-terminale Thymidinkinase-Genkassette fehlt (Abb. 38). 35 µg bzw. 44 µg dieses Konstruktes wurden in jeweils 10^7 ES-Zellen durch Elektroporation transfiziert von denen 645 Klone mit Sonde 1 im Southernblot analysiert wurden (Abb. 41).

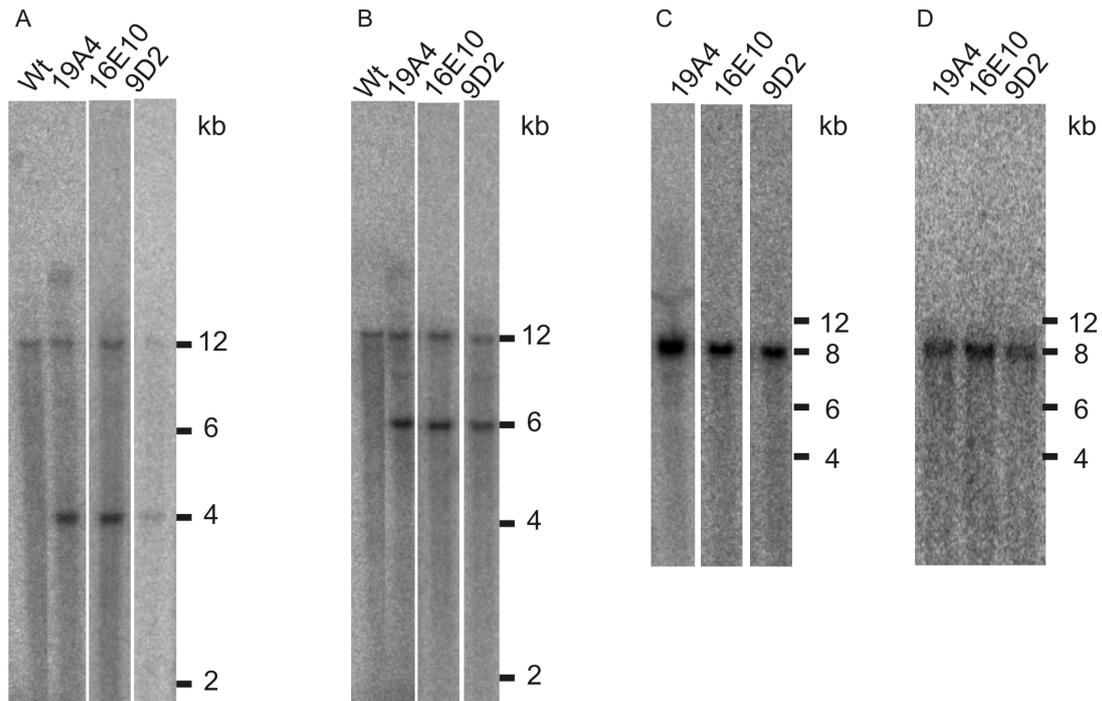


Abb. 41: Southernblot-Analyse von ES-Zellklonen nach Einschleusung des Targetingkonstruktes B

Genomische DNA von Wildtyp (Wt) und den Klonen 19A4, 16E10 und 9D2 wurde nach Spaltung mit XbaI (A, B) und BglII (C) bzw. AvrII (D) mit Sonde 1 (A), Sonde 3 (B) und der Neo-Sonde (C, D) hybridisiert. Die Fragmentgrößen eines DNA-Längenstandards sind jeweils angegeben.

Es konnten drei Klone mit der Bezeichnung 19A4, 16E10 und 9D2 identifiziert werden, die heterozygot für das homolog rekombinierte L3F2-Allel ($TRPM3^{+/L3F2}$) waren (Abb. 41 A): Deren genomische DNA zeigte nach Hybridisierung mit Sonde 1 neben den Wildtyp-Fragmenten (12155 bp) auch die vom rekombinanten L3F2-Allel stammenden XbaI-Fragmente einer Länge von 3931 bp (vgl. Tab. 14). Nach Expansion dieser drei Klone, wurde erneut genomische DNA isoliert und mit Sonde 3 und der Neo-Sonde analysiert (Abb. 41 B, C, D). Die Hybridisierung mit Sonde 3 zeigte DNA-Fragmente einer Länge von 12155 bp und 6178 bp (Abb. 41 B, Tab. 14) und bestätigte die vollständige und homologe Integration des Targetingkonstruktes in den TRPM3-Locus. Mit der Neo-Sonde wurden nach BglII- bzw. AvrII-Spaltung der DNA nur Fragmente der Länge 8,4 (8,2) kb (Abb. 41 C, D; Tab. 14) nachgewiesen, sodass eine zusätzliche, nichthomologe Integration des Targetingkonstruktes unwahrscheinlich ist.

4.5.4 Herstellung von Mäusen mit L3F2-Allel durch Blastozysteninjektion von ES-Zellen

Zur Mikroinjektion in Blastozysten wurden die Klone 9D2 und 16E10 ausgewählt, da sie als klar abgegrenzte, rundliche Kolonien ohne Anzeichen einer Differenzierung wuchsen (Abb. 42).

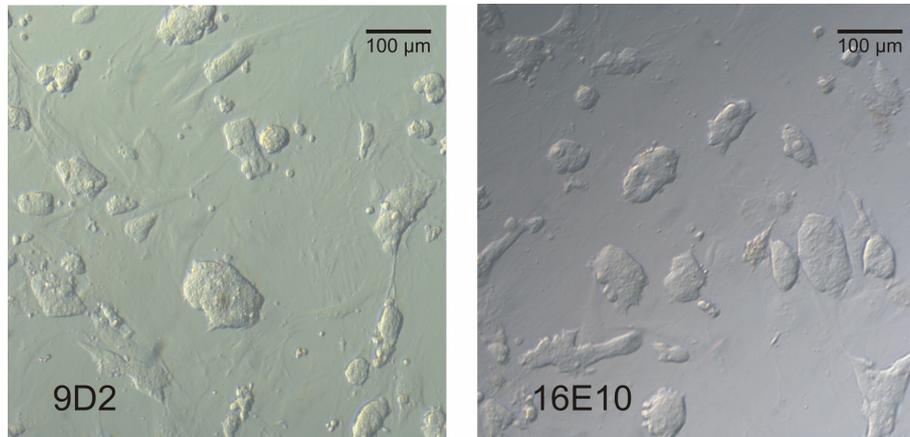


Abb. 42: Morphologie der ES-Zellklone 9D2 und 16E10

Die Kolonien sind kugelförmig und grenzen sich scharf vom Untergrund ab. Eine beginnende Differenzierung der Zellen würde sich z.B. durch Abflachen der Kolonien bemerkbar machen.

Am ZMBH in Heidelberg wurden von Frank Zimmermann je 12-14 ES-Zellen des Klons 9D2 (Passagenzahl 27) in 21 Blastozysten von C57Bl/6N-Mäusen injiziert und diese wurden in 2 Ammenmäuse implantiert. Von Klon 16E10 waren es 31 Blastozysten, die auf drei Ammenmäuse verteilt wurden. Nach drei Wochen wurden chimäre Mäuse geboren, die ein Mosaik aus Wildtyp-Zellen und L3F2-heterozygoten Zellen bildeten. Nach ca. vier Wochen konnte anhand ihrer Fellfarbe der Grad des Chimärismus abgeschätzt werden (Abb. 43), da die eingeführten ES-Zellen (ESR1) von Mäusen mit brauner Fellfarbe (129/Sv x 129/SvJ) und die Blastozysten von schwarzen C57Bl/N6-Mäusen stammten.

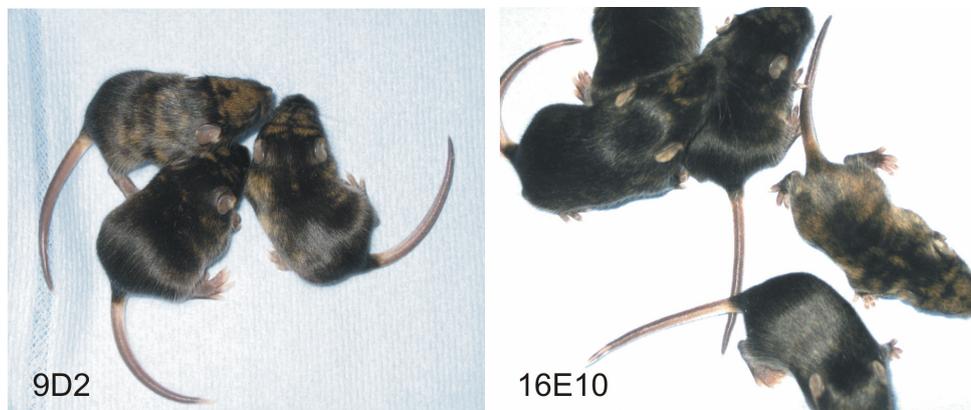


Abb. 43: Chimäre Mäuse, die aus einer Blastozysteninjektion der Klone 9D2 und 16E10 hervorgegangen sind

Es wurden nur niederchimäre Mäuse geboren: Aus Klon 9D2 entstanden drei 15-25 % chimäre Mäuse und aus Klon 16E10 acht Mäuse, mit einmal 50%-, sechsmal 10-15%- und einmal < 10% Chimärismus (Abb. 43).

Um herauszufinden, ob in einer der Chimären die Mutation keimbahngängig war, wurden 8 Mäuse mit 129/SvJ-Wildtyp-Mäusen verpaart und deren Nachkommen mit Hilfe von PCR und den Primern SM55/SM56 genotypisiert (Tab. 15, S. 92). Insgesamt wurden 167 Tiere aus 26 Würfen analysiert. Abbildung 44 zeigt repräsentativ die Untersuchung von 9 Mäusen: Es wurden jeweils nur Wildtyp-spezifische Fragmente einer Länge von 327 bp amplifiziert, jedoch keine zusätzlichen 385 bp Fragmente des L3F2-Allels. Die Verpaarungen wurden daher eingestellt.

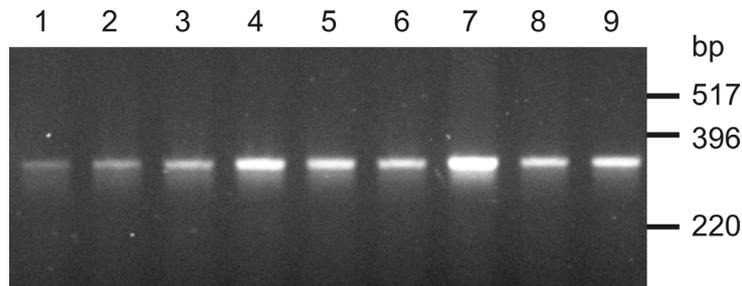


Abb. 44: PCR-Genotypisierung der Nachkommenschaft chimärer Mäuse

Repräsentative Untersuchung von 9 Nachkommen chimärer Mäuse nach Verpaarung mit 129/SvJ-Mäusen. Die Fragmentgrößen eines Längenstandards sind angegeben.

In einem zweiten Versuch wurden die ES-Zellklone 16E10 und nun auch 19A4 in je 30 Blastozysten injiziert und diese in jeweils drei scheinchwangere Ammenmäuse implantiert. Klon 16E10 brachte wiederum nur niederchimäre Tiere hervor, die fast völlig schwarz waren (Abb. 45, oben links).

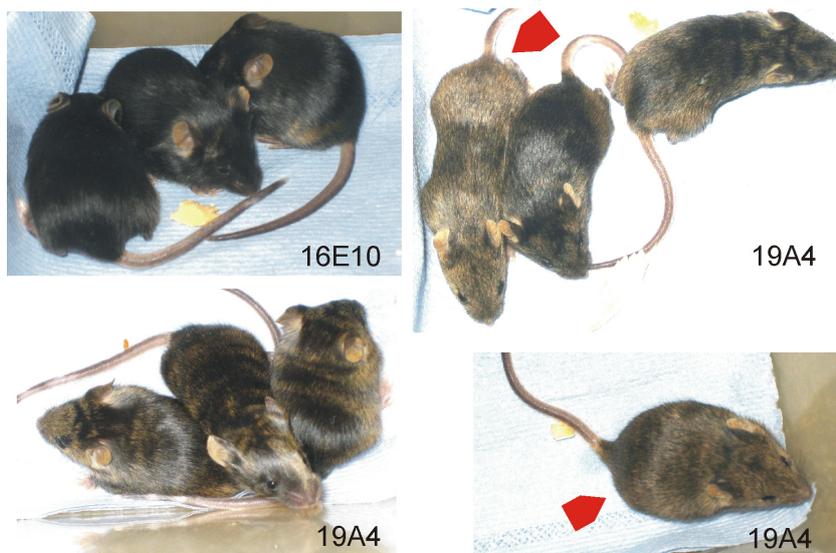


Abb. 45: Chimäre Mäuse, die aus einer Blastozysteninjektion der Klone 16E10 und 19A4 hervorgegangen sind

Die roten Pfeile kennzeichnen hochchimäre Tiere.

Aus Klon 19A4 gingen hingegen insgesamt acht chimäre Mäuse hervor, von denen zwei einen Chimärismus von 80-90% zeigten. Diese Mäuse sind in Abbildung 45 mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Beide hochchimären und ein weniger chimäres Tier wurden mit 129/SvJ-Mäusen gekreuzt und die Nachkommen mit der Primerkombination SM55/SM56 analysiert. Abbildung 46 A zeigt, dass vier der zehn Nachkommen eines Wurfes das L3F2-Allel tragen: zusätzlich zum 327 bp Wildtyp-Fragment wurde ein 385 bp Fragment amplifiziert.

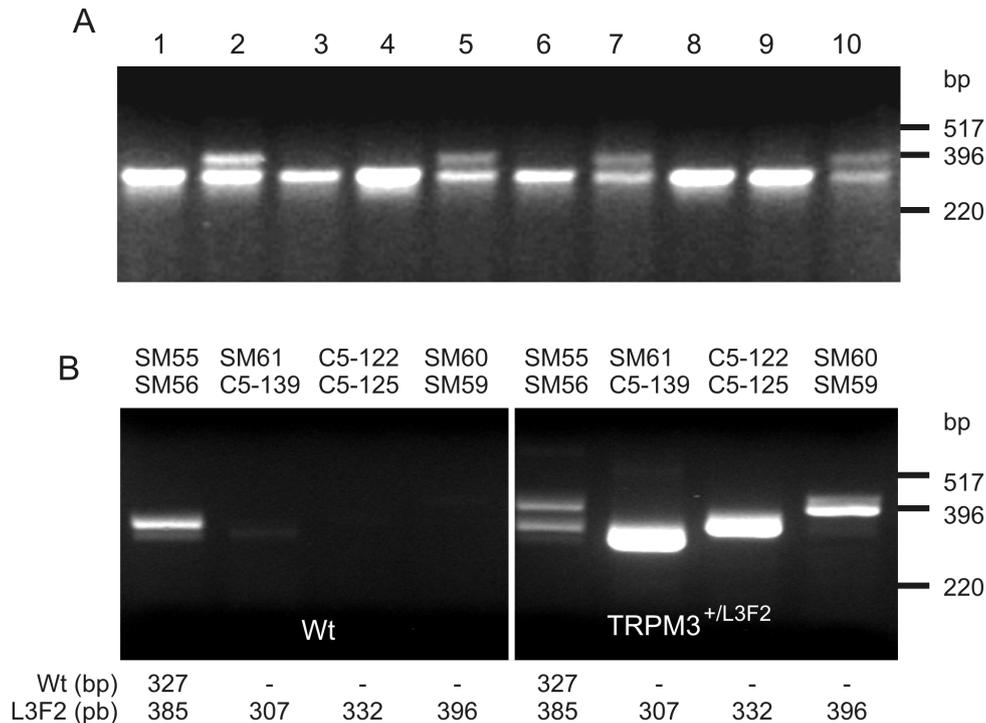


Abb. 46: PCR-Genotypisierung der Nachkommenschaft chimärer Mäuse

A PCR-Genotypisierung von 10 Nachkommen chimärer Mäuse nach Blastozysteninjektion von Klon 19A4 und Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen. **B:** PCR-Genotypisierung eines $TRPM3^{+/L3F2}$ -Tieres, im Vergleich zum Wildtyp (Wt). Die erwarteten Fragmentgrößen für Wildtyp- und L3F2-Allel und die Fragmentgrößen eines Längenstandards sind angegeben.

Auch die Verpaarungen der anderen Chimären brachten heterozygote Tiere mit dem Genotyp $TRPM3^{+/L3F2}$ hervor: insgesamt 48 Tiere. Um sicherzustellen, dass das Konstrukt vollständig inseriert war, wurden alle L3F2-heterozygoten Tiere zusätzlich mit den Primerkombinationen SM61/C5-139, C5-122/C5-125 und SM59/SM60 genotypisiert (Abb. 46 B). Wie exemplarisch in Abbildung 46 B für eines der Tiere gezeigt, konnten in genomischer DNA aller Mäuse die L3F2-typischen Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden.

4.5.5 Herstellung von Mäusen mit L1-, L2- oder L3F1-Allel durch Verpaarung von L3F2-Tieren

Durch zielgerichtete Verpaarung von L3F2-Tieren wurden verschiedene Mauslinien hergestellt (Abb. 47).

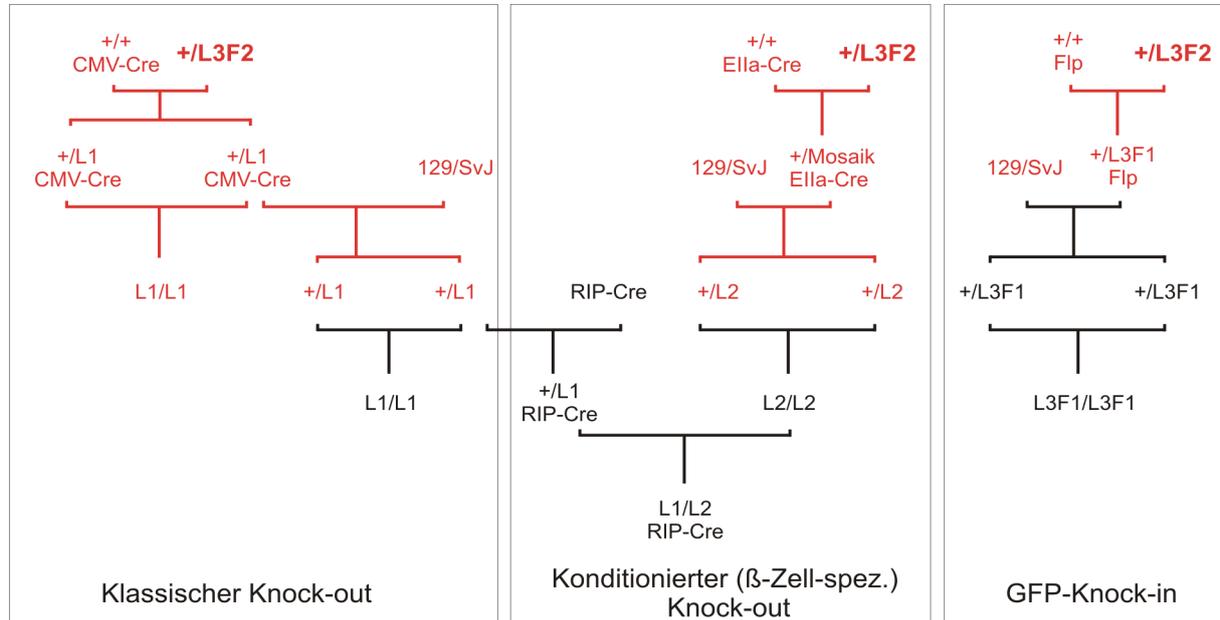


Abb. 47: Verpaarungsschemata zur Herstellung unterschiedlicher Genotypen:

Nur Nachkommen, welche in weiteren Verpaarungen verwendet wurden, sind dargestellt. Durch Verpaarung von $+/L3F2$ -Tieren kann das TRPM3-Gen im Gesamtorganismus (Klassischer Knock-out) oder gewebespezifisch (Konditionierter Knock-out) inaktiviert werden. Das Schema zeigt auch eine geplante, gewebespezifische Inaktivierung in β -Zellen des Pankreas durch Verpaarung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten-Insulina-Promotors (RIP) exprimieren (Ray et al., 1999). Im L3F2-Allel ist die EGFP-cDNA eingeschleust (Knock-in). Durch Verpaarung mit Flp-Mäusen kann die pgk-neo-Kassette entfernt und ein L3F1-Allel generiert werden. Verpaarungen, aus denen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit bereits Tiere hervorgegangen sind, sind in rot dargestellt.

4.5.5.1 L1-Mäuse

$TRPM3^{+/L3F2}$ -Tiere wurden mit Cre-Deleter Mäusen verpaart (CMV-Cre, Abb. 47). In deren Nachkommenschaft wurde durch die Aktivität der Cre-Rekombinase der gesamte Bereich zwischen der ersten und der letzten loxP-Sequenz entfernt und ein L1-Allel gebildet (Abb. 48). Abbildung 48 A zeigt repräsentativ eine PCR-Analyse des TRPM3-Locus und des Cre-Gens eines einzelnen Individuums, welches heterozygot das L1-Allel ($TRPM3^{+/L1}$) und das Cre-Transgen trägt (Cre-positiv). Solche Tiere wurden untereinander verpaart (Abb. 47), um homozygot TRPM3-defiziente ($TRPM3^{L1/L1}$) Tiere zu erhalten, welche zudem das Cre-Transgen verloren haben. Abbildung 48 B zeigt die Genotypisierung der Nachkommenschaft einer solchen Verpaarung. Sowohl hetero- als auch homozygote L1-Tiere, mit oder ohne Cre-Gen, wurden identifiziert. Alternativ wurden durch Kreuzung der heterozygoten Tiere mit 129/SvJ-Mäusen zunächst $TRPM3^{+/L1}$ -Tiere generiert, die das Cre-Gen nicht mehr tragen

3,9 kb/NheI) zeigten heterozygote Tiere weitere Fragmente einer Größe von 5,1 kb (SphI) oder 4,2 kb (NheI). In homozygoten TRPM3-L1-Tieren fehlten hingegen die Wildtyp-spezifischen Fragmente.

TRPM3-defiziente Tiere werden lebend geboren und sind fertil, wie weitere Verpaarungen mit diesen Tieren zeigen (Abb. 48 D). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit haben TRPM3-Knock-out Tiere bereits ein Alter von 15 Wochen erreicht.

4.5.5.2 L2-Mäuse

Zur Herstellung von Mäusen, deren Exon 24 von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird (L2- oder Flox-Allel), wurden Mäuse mit L3F2-Allel zunächst mit Mäusen gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des E1a-Promotors exprimieren (Abb. 47). Durch die geringe Aktivität des Promotors wird die Cre-Rekombinase nur schwach exprimiert und drei unterschiedliche Rekombinationsereignisse zwischen den einzelnen loxP-Sequenzen wurden in den verschiedenen Zellen eines Tieres möglich (vgl. Abb. 35, S. 87). Ich erhielt in der ersten Generation Tiere, welche ein Mosaik aus Wildtyp-Zellen und Zellen darstellen, die heterozygot für das L1-, L2- oder L2F2-Allel sind (Abb. 49).

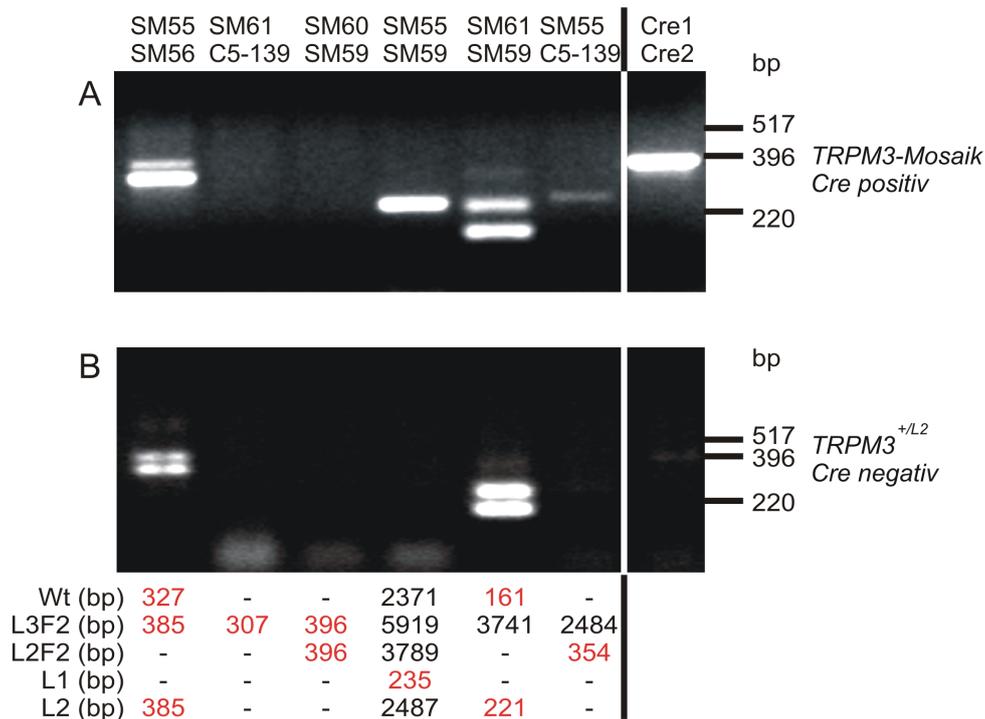


Abb. 49: PCR-Genotypisierung von Mäusen mit L2-Allel

A, B: PCR-Analytik des TRPM3-Locus und des Cre-Gens. Die erwarteten und im 2% Agarosegel nachweisbaren Fragmentlängen für die verschiedenen Allele sind rot dargestellt. Die Fragmentgrößen eines Längenstandards sind seitlich angegeben. Ein 347 bp Fragment nach Amplifikation mit den Primern Cre1/Cre2 zeigt die Gegenwart des Cre-Transgens an. Die durch PCR definierten Genotypen sind in kursiver Schreibweise angegeben. Die wie in **A** identifizierten TRPM3-Mosaik-Mäuse wurden mit 129/SvJ-Wildtyp-Tieren gekreuzt. Die Analytik eines Nachkommens ist exemplarisch in **B** dargestellt.

Abbildung 49 A zeigt die PCR-Analytik des TRPM3- und des Cre-Gens in genomischer DNA aus dem Schwanz einer solchen Maus. Es wurden PCR-Produkte nachweisbar, die spezifisch für die unterschiedlichen Allele sind: zum Beispiel zeigte ein 235 bp Fragment, welches mit den Primern SM55/SM59 amplifiziert wurde, die Gegenwart von Zellen mit L1-Allel an. Mit Hilfe der Primer SM61/SM59 konnte aber auch ein 221 bp langes, L2-Allel-spezifisches Fragment nachgewiesen werden. Erst in der nächsten Generation etablierte sich der Genotyp, der in den Keimzellen vorherrschte, da von den Mosaik-Tieren nur ein einzelnes TRPM3-Allel an die F2-Generation weitergegeben wurde. Nach Verpaarung von Mosaik-Tieren mit 129/SvJ-Tieren wurden heterozygote Nachkommen geboren, die neben dem Wildtyp-Allel nur eines der drei Mosaik-Allele enthielten. Abbildung 49 B zeigt die Genotypisierung einer Maus, bei der das L2-Allel weitergegeben wurde. Zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Dissertation war eine Maus mit TRPM3^{+L2}-Genotyp geboren. Aus Verpaarungen dieses Tieres mit 129/SvJ-Mäusen stammen weitere acht TRPM3^{+L2}-Tiere.

4.5.5.3 L3F1-Mäuse

Die GFP-Expression sollte in Mäusen untersucht werden, welche homozygot das L3F1-Allel (TRPM3^{L3F1/L3F1}) tragen. Diesen Mäusen fehlt im Unterschied zu Mäusen mit L3F2-Allel die pgk-neo-Kassette. Die Expression der dort codierten Phosphotransferase hemmt unter Umständen in unerwünschter Weise die Expression von TRPM3-IRES-EGFP-Transkripten. Um die von FRT-Sequenzen flankierte pgk-neo-Kassette aus dem Genom von TRPM3^{+L3F2}-Mäusen zu entfernen, wurden die Tiere mit Mäusen verpaart, welche stabil eine Flp-Rekombinase exprimieren (Abb. 47). Aus diesen Verpaarungen gingen Flp-positive Tiere mit einem L3F1-Allel (TRPM3^{+L3F1}) hervor, wie das Ergebnis einer PCR-Genotypisierung in Abbildung 50 A und einer Southernblot-Analyse in Abbildung 50 B zeigt. Mit der Primerkombination C5-122/SM59 wird in PCR-Analysen nur dann ein 377 bp Fragment amplifiziert, wenn es zu einer Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen gekommen ist (Abb. 50 A) und im Southernblot wurden nach Hydrolyse genomischer DNA und Hybridisierung mit Sonde 2 9,1 kb Fragmente sichtbar (Abb. 50 B, vgl. auch Tab. 14).

Um homozygote TRPM3^{L3F1/L3F1}-Tiere ohne Flp-Transgen zu erhalten, werden zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation heterozygote TRPM3^{+L3F1}/Flp positive Tiere mit 129/SvJ-Wildtyp-Mäusen verpaart, deren Nachkommenschaft nachfolgend untereinander verpaart werden soll (Abb. 47).

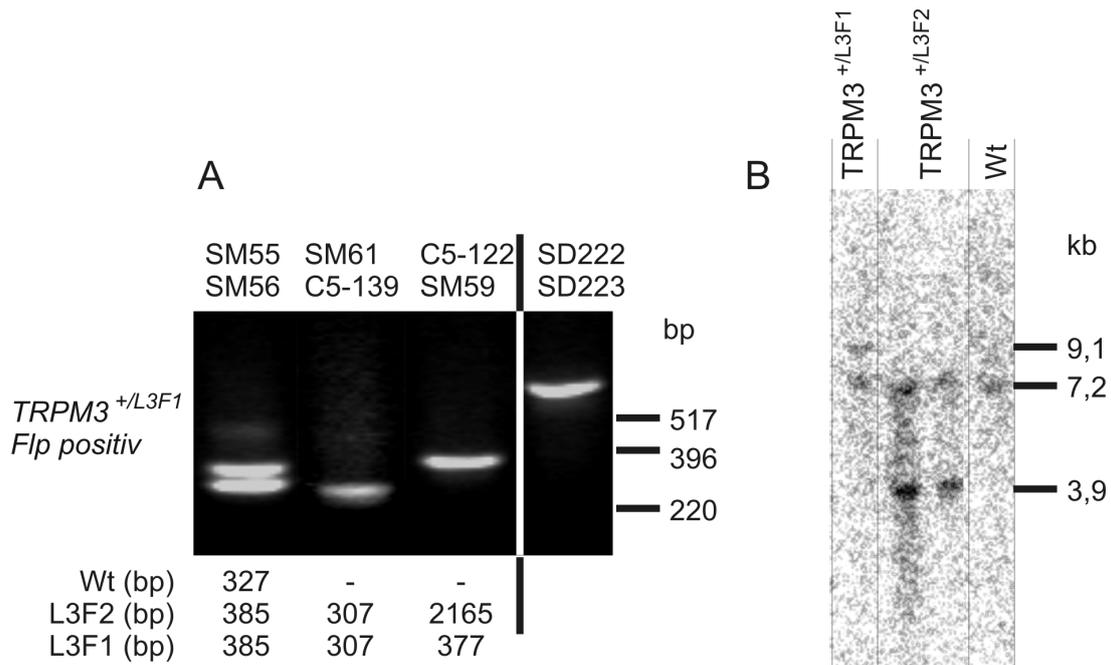


Abb. 50: Genotypisierung von Mäusen mit L3F1-Allel

A: PCR-Analytik des TRPM3-Locus und des Flp-Gens mit Hilfe eines 2% Agarosegels. Die erwarteten Fragmentlängen für die verschiedenen Allele sind dargestellt. Die Fragmentgrößen eines Längenstandards sind seitlich angegeben. Ein 757 bp Fragment nach Amplifikation mit den Primern SD222/SD223 zeigt die Gegenwart des Flp-Transgens an. Der durch PCR definierte Genotyp ist in kursiver Schreibweise angegeben. **B:** Southernblot-Analytik genomischer DNA nach Hydrolyse mit SphI von zwei TRPM3^{+/*L3F2*}-, einem TRPM3^{+/*L3F1*}- und einem Wildtyp-Tier (Wt). Die Membran wurde 22 h gegen eine Phosphorimager-Platte exponiert. Die erwarteten Fragmentgrößen sind angegeben.

5 Diskussion

5.1 TRPM3-Spleissereignisse sind hochkonserviert in Ratte, Maus und Mensch

Das TRPM3-Gen der Ratte umfasst 29 Exons und ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Es weist eine ähnliche Exon/Intron-Struktur im Vergleich zu den Genen von Maus und Mensch auf (Oberwinkler and Philipp, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TRPM3-cDNA aus der Ratte erstmalig identifiziert. Insgesamt 35 TRPM3-Transkripte, die für 9 neue TRPM3-Varianten codieren, konnten beschrieben werden. Sie ähneln in ihrer Struktur bekannten Varianten aus Maus (Abb. 51; Oberwinkler et al., 2005; Lis, 2005) und Mensch (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003) und weisen eine Aminosäureidentität von 99,7% (Maus) und 99,1% (Mensch) auf. Ähnlich wie in der Maus unterscheiden sich die Varianten durch die Gegenwart oder Abwesenheit definierter Sequenzabschnitte, welche von den Exons 1, 2, 8, 15 und 25 codiert werden. Die meisten dieser Variationen entstehen durch alternatives Spleissen der TRPM3-Primärtranskripte und es konnten sowohl Varianten identifiziert werden, welche die von Exon 8, 15 und 25 codierten Abschnitte enthalten, als auch solche Varianten, in welchen diese Abschnitte fehlen. Die von Exon 1 oder Exon 2 codierten Abschnitte werden alternativ exprimiert (Abb. 51) und ebenso wie in der Maus konnten keine TRPM3 α -Varianten identifiziert werden, welche Sequenzinformationen von Exon 2 tragen (Lis, 2005). Das Vorkommen von α - und β -Varianten beruht vermutlich auf der Aktivität alternativer Promotoren, ähnlich wie sie für das TRPM1-Gen postuliert wurden (Lis et al., 2005).

Durch alternatives Spleissen weist der Aminoterminus des TRPM3-Proteins hohe Variabilität auf. Demgegenüber ist der carboxyterminale Abschnitt des Proteins nahezu konstant. Lediglich die Variante rTRPM3 α 9 besitzt durch alternatives Spleissen von Exon 28 und eines damit verbundenen Leserasterschubs mit schneller Termination des Leserahmens einen um 531 Aminosäuren verkürzten Carboxyterminus im Vergleich zu rTRPM3 α 2 (Abb. 51). In gleicher Weise führt alternatives Spleissen des homologen Exons der Maus in der Variante mTRPM3 β 6 zu einer Verkürzung des Proteins (Lis, 2005). In beiden Proteinen fehlt die Coiled-Coil-Region, während die Trp-Domäne vorhanden ist.

Neben den vielen Gemeinsamkeiten von Maus- und Rattenproteinen zeigen meine Untersuchungen auch einige signifikante Unterschiede der orthologen Proteine. So wurde in der Rattenvariante rTRPM3 α 7 zusätzlich zu den bereits aus Maus und Mensch bekannten 28 Exons ein neues Exon 17 identifiziert. Die orthologe Sequenz dieses Exons 17 ist auch im Genom der Maus vorhanden, kommt jedoch nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht zur Expression. Dagegen fehlt die Sequenz im humanen Genom, was auf ein nagerspezifisches Vorkommen dieses Exons hindeutet.

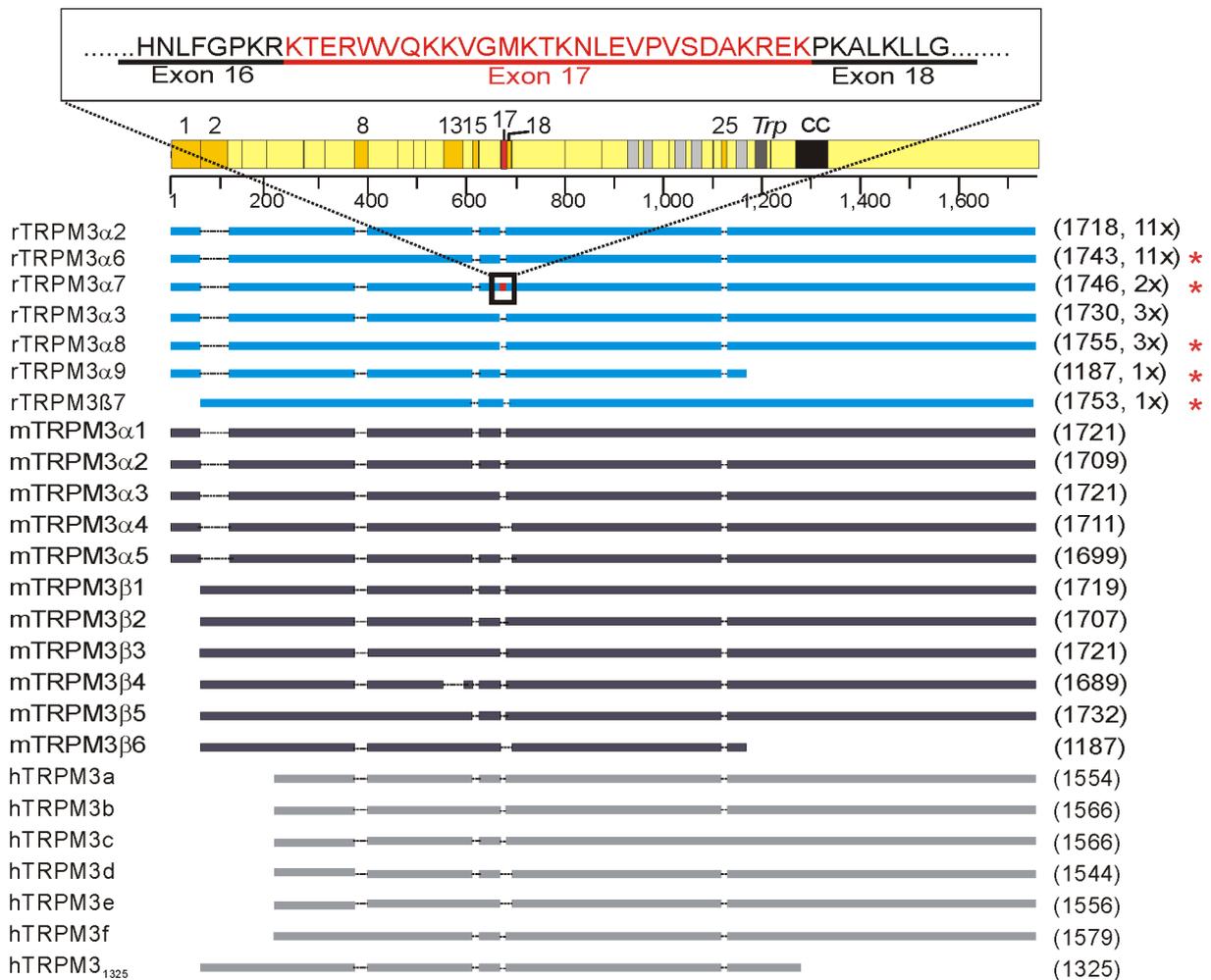


Abb. 51: Vergleich der TRPM3-Varianten aus Ratte, Maus und Mensch:

Verglichen sind die TRPM3-Varianten aus Ratte (rTRPM3), Maus (mTRPM3) und Mensch (hTRPM3). Seltene Varianten aus Maus (Lis, 2005) und Ratte (rTRPM3 α 11 und rTRPM3 α 12, Abb. 14), die keine Sequenzinformation der Transmembranregionen tragen, sind nicht gezeigt. Die Zahl der Aminosäuren und die Häufigkeit der identifizierten Klone sind in Klammern angegeben. Strukturell zu Maus und Mensch unterschiedliche Varianten der Ratte sind markiert (*). Der gelbe Balken zeigt eine schematische Darstellung der Organisation der TRPM3-Domänen. Die orangefarbenen Kästchen zeigen die durch alternatives Spleissen modifizierte Proteinabschnitte. Die neu identifizierte, von Exon 17 der Ratte codierte Sequenz (rotes Kästchen), ist auch vergrößert dargestellt. Die grauen Kästchen zeigen die Transmembrandomänen, das dunkelgraue die Trp-Domäne und das schwarze die Coiled-Coil-Region (cc).

Exon 18 fehlt in den Varianten mTRPM3 α 4-, mTRPM3 α 5-, mTRPM3 β 6-, hTRPM3d- und hTRPM3e-Varianten ist jedoch in allen TRPM3-Varianten der Ratte vorhanden. Ebenso kommt die Sequenzinformation von Exon 13 in allen Ratten-Varianten vor, fehlt jedoch in der Maus-Varianten TRPM3 β 4.

Zwei in der Ratte identifizierte Isoformen rTRPM3 α 2 und rTRPM3 α 3 sind strukturell mit den Mausproteinen mTRPM3 α 2 und mTRPM3 α 3 identisch, d.h die jeweils homologen Sequenzabschnitte kommen in gleicher Weise vor. Die anderen neu identifizierten Varianten

aus der Ratte sind hingegen strukturell unterschiedlich zu den Maus-Proteinen. Sie sind in Abbildung 51 mit einem roten Kreuz markiert. Damit steigt die Zahl der TRPM3-Varianten auf 25 (Abb. 51), so viele wie für kein anderes Protein der TRP-Kanalfamilie. Es ist aber unwahrscheinlich, dass damit bereits alle Varianten identifiziert wurden, denn anhand der Zahl variabler Regionen in Maus-TRPM3-Proteinen wurden $2^7=128$ unterschiedliche Varianten postuliert (Philipp et al., 2006; Lis, 2005). Im Vergleich mit anderen Genen erscheint diese Variabilität jedoch gering: Bei Zelloberflächenproteinen aus der Familie der Neurexine ermöglichen drei unterschiedliche Gene, die Nutzung unterschiedlicher Promotoren und alternatives Spleissen die Bildung von mehr als tausend verschiedene Neurexin-Isoformen (Missler and Sudhof, 1998). Das nach gegenwärtigem Wissensstand variabelste Gen ist allerdings das Dscam-Gen aus *Drosophila melanogaster*, welches für Proteine der Immunglobulinsuperfamilie codiert: Aus einem einzigen Gen können durch alternatives Spleissen mehr als 38.000 unterschiedliche Varianten hervorgehen (Anastassiou et al., 2006; Crayton et al., 2006).

5.2 Funktionen von TRPM3-Kanalvarianten

In Anbetracht der Vielzahl der TRPM3-Varianten ist es verständlich, dass deren unterschiedliche Funktion in den meisten Fällen noch unbekannt ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch alternatives Spleissen innerhalb von Exon 24 die Porenregion des Kanals und damit dessen Permeabilität entscheidend verändert wird (vgl. Abb. 4, Oberwinkler et al., 2005). Während die Variante mTRPM3 α 1 nahezu impermeabel für divalente Kationen ist und hauptsächlich Na⁺ in die Zelle einströmen lässt, ist die im Porenbereich um 12 Aminosäuren verkürzte Variante mTRPM3 α 2 permeabel für Ca²⁺ und führt nach Öffnung des Kanals zur Ausprägung intrazellulärer Ca²⁺-Signale.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Ins-1-Zellen aus der Ratte eine mTRPM3 α 2-homologe Variante rTRPM3 α 2 identifiziert (Abb. 14). Auch die übrigen in Ins-1- und GH3-Zellen identifizierten Varianten gleichen im Porenbereich mTRPM3 α 2 und sind somit vermutlich permeabel für divalente Kationen (Abb. 14). Diese Beobachtung korreliert mit den hier gezeigten FURA-Experimenten, die sowohl in Ins-1-Zellen als auch in GH3-Zellen einen deutlichen TRPM3-vermittelten Ca²⁺-Einstrom zeigten (vgl. Abb. 19, S. 68).

Alle in Ins-1- und GH3-Zellen identifizierten Varianten zeigen also uniform einen verkürzten, Ca²⁺-permeablen Porenbereich. Ebenso zeigen sie uniform einen von Exon 1 codierten α -Aminoterminus (Abb. 14). Während es mit Exon 2-spezifischen Primern und RNA aus Gehirn der Ratte gelang TRPM3 β -Transkripte zu amplifizieren, gelang dies mit RNA aus GH3- und Ins-1-Zellen nicht (Abb. 13). Möglicherweise ist in diesen Zellen nur ein distal von Exon 1 gelegener Promotor aktiv. Die spezifische Bedeutung des von Exon 1 codierten α -

Aminoterminus ist bislang unklar. Vorläufige Daten nach Überexpression von TRPM3 β -Varianten, welchen dieser Aminoterminus fehlt, zeigen, dass solche Varianten eine geringere Ansprechbarkeit für Pregnenolonsulfat aufweisen (persönliche Mitteilung S. Philipp). Möglicherweise beeinflusst also der von Exon 1 codierte Aminoterminus die Kanalaktivierung durch das Steroid.

Um zu zeigen, dass der Steroid-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in GH3- und Ins-1-Zellen tatsächlich von TRPM3-Kanälen vermittelt wird, habe ich im Rahmen dieser Arbeit RNA-Interferenz-Studien durchgeführt: Nach Hemmung der Expression von TRPM3-Kanälen war das Steroid-induzierte Ca^{2+} -Signal signifikant reduziert. Dies zeigt die Funktion von TRPM3-Proteinen als Steroidrezeptor-Ionenkanal in endokrinen Zellen des Pankreas und der Hypophyse.

Die Bedeutung von Steroid-vermittelten Ca^{2+} -Signalen in neuroendokrinen Zellen ist bislang weitgehend ungeklärt. In β -Zellen des Pankreas ist die Sekretion von Insulin abhängig von erhöhten, intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln. Diese entstehen nach Glucoseaufnahme, Bildung von ATP, Hemmung ATP-abhängiger K^+ -Kanäle sowie Membrandepolarisierung und gehen mit der Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle einher (Abb. 52; Mears, 2004). Dabei scheint eine direkte Wechselwirkung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen mit dem Sekretionsapparat von entscheidender Bedeutung zu sein, jedoch tragen auch andere nicht-L-Typ-Kanäle zum Ca^{2+} -Signal und zur Insulinsekretion bei (Mears, 2004). Dazu zählen vermutlich auch TRP-Ionenkanäle. Langerhanszellen exprimieren TRPC1- (Sakura and Ashcroft, 1997), TRPC4-, TRPC6- (Roe et al., 1998) und TRPM5-Transkripte und es wurden TRPM5-charakteristische, Ca^{2+} -aktivierte Kationenströme in Ins-1-Zellen gemessen (Prawitt et al., 2003). Neuere Untersuchungen bringen auch TRPM2- und TRPM4-Proteine in Verbindung mit der Insulinsekretion in β -Zellen: So führte eine Blockade der TRPM2-Expression durch RNA-Interferenz zu einer verminderten Insulinsekretion aus primären β -Zellen (Togashi et al., 2006) und auch die Einschleusung einer dominant-negativen Mutante von TRPM4 ins Ins-1-Zellen hatte eine Reduktion der Insulinfreisetzung zur Folge (Cheng et al., 2007). Ca^{2+} -aktivierte TRPM4-(TRPM5)-Kanäle könnten zu einem Einstrom von Na^+ in die Zelle führen, auf diese Weise zur Membrandepolarisation beitragen und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktivieren (Abb. 52; Cheng et al., 2007a). Die hier vorliegenden Daten legen nahe, dass auch TRPM3-Proteine am Insulinfreisetzungsprozess partizipieren. Ähnlich wie TRPM4 könnten auch TRPM3-Kanäle das Ruhepotential der Zelle und so die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle erhöhen (Abb. 52). Auch eine direkte Steuerung der Hormonfreisetzung durch TRPM3-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ist denkbar, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit (vermutlich) ausschließlich Ca^{2+} -permeable Isoformen von TRPM3 in Ins-1-Zellen identifiziert wurden. Schließlich könnte ein dritter Signalübertragungsweg

TRPM3-Kanäle mit der Freisetzung von Insulin verknüpfen (Abb. 52): Steroidaktivierung von TRPM3 - Ca^{2+} -Einstrom - Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger, nichtselektiver TRPM4-Ionenkanäle - Kationeneinstrom - Membrandepolarisation - Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle - Insulinfreisetzung.

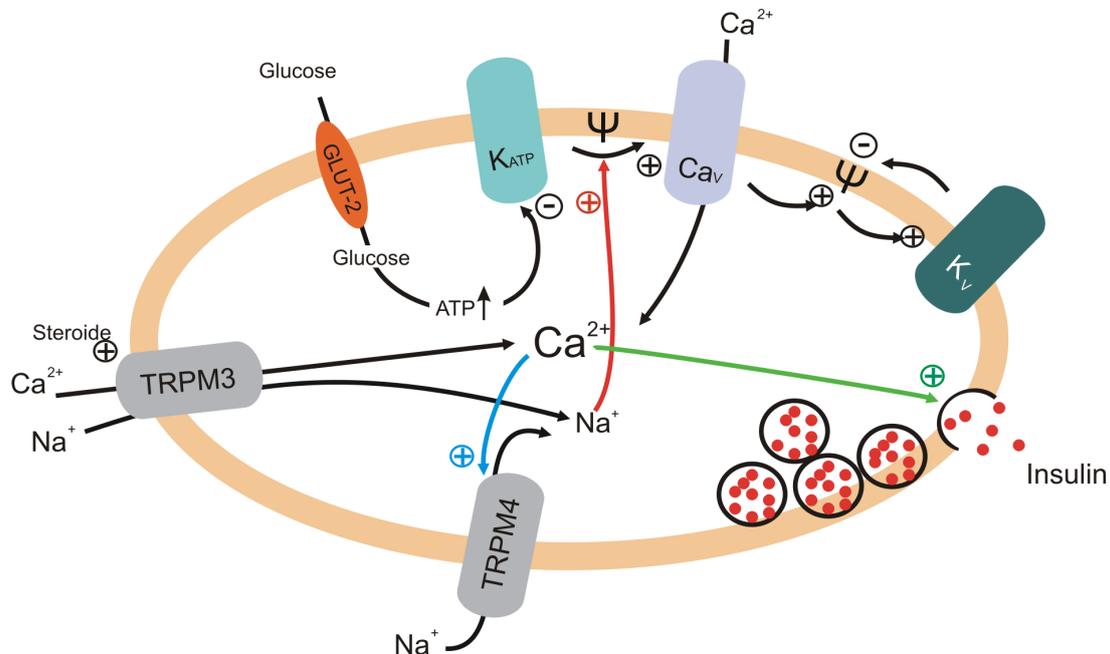


Abb. 52: TRPM-Kanäle steuern die Freisetzung von Insulin

Nach Glucoseaufnahme in die Zelle durch einen Glucosetransporter (GLUT-2) steigt der ATP-Spiegel, ATP-sensitive K^+ -Kanäle (K_{ATP}) werden blockiert und es kommt zur Depolarisation des Membranpotentials (Ψ). Dadurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v) aktiviert, Ca^{2+} strömt in die Zelle und führt zur Freisetzung von Insulin. Eine Repolarisation der Zelle ist abhängig von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (K_v). Die mögliche Beteiligung von TRPM3- und TRPM4-Kanälen an dieser Signalübertragung ist mit bunten Pfeilen angedeutet.

Ähnliche Prozesse könnten auch der Freisetzung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin) und Prolaktin aus GH3-Hypophysenzellen zu Grunde liegen (Tashjian, Jr. et al., 1970). In der Hypophyse wird diese Freisetzung von hypothalamischen Botenstoffen wie Somatoliberin (Anderson et al., 2004) und Dopamin (Ben Jonathan and Hnasko, 2001) kontrolliert und ist - ähnlich wie in pankreatischen β -Zellen - mit einer Veränderung des Membranpotentials sowie Aktivierung bzw. Inaktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle verbunden. Sie ist auch hier abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, denn Ca^{2+} -Ionen sind notwendig sowohl für das Priming, als auch für die Fusion hormonhaltiger Vesikel mit der Plasmamembran (Martin, 2003). Steroide wie Pregnenolonsulfat und TRPM3-Proteine sind nach den hier vorliegenden Daten vermutlich auch an der Hormonfreisetzung in der Hypophyse beteiligt. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Dehydroepiandrosteron (DHEA), das aus Pregnenolon gebildet wird, die Somatotropin-Freisetzung in

Hypophysenzellen stimuliert (Suarez et al., 2005) und dass Pregnenolonsulfat die IP_3 -Konzentration in der Hypophyse der Ratte erhöht (Lachowicz et al., 2001).

Meine Ergebnisse und vorangegangene Daten zeigen, dass TRPM3-Proteine auch stark in Epithelzellen des Plexus choroideus (CPE) exprimiert werden (Oberwinkler et al., 2005; Lis, 2005). Diese Zellen bilden die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), die eine wichtige Funktion bei der Nährstoffversorgung des Gehirns und der Signalübertragung zwischen verschiedenen Hirnarealen besitzt (Brown et al., 2004). Das Ionengleichgewicht in der CSF wird sehr genau reguliert. Während jedoch verschiedene Mechanismen für die Regulation der Na^+ -, K^+ -, Cl^- - oder HCO_3^- -Konzentration der CSF bekannt sind (Millar et al., 2007; Brown et al., 2004), ist die molekulare Identität Ca^{2+} -regulierender Strukturen unbekannt. TRPM3-Kanäle könnten eine wesentliche Rolle bei der Kationen-Homöostase der CSF spielen (Oberwinkler et al., 2005). Epithelzellen des Plexus choroideus (CPE) exprimieren uniform und im Gegensatz zu Ins-1-Zellen nur TRPM3 β -Varianten, welche mit der Sequenz von Exon 2 beginnen (Lis, 2005). Dieser β -Aminoterminus enthält eine zusätzliche, putative Calmodulin-Bindungsstelle (Abb. 4). β -Varianten zeigen deutlich geringere Ca^{2+} -Signale nach Überexpression in HEK293-Zellen und Stimulation mit Pregnenolonsulfat (persönliche Mitteilung S. Philipp). Übereinstimmend zeigten CPE-Zellen keine Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat und nur geringe Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in Gegenwart hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen (Abb. 17, Abb. 18). Möglicherweise ist dies Folge einer negativen Rückkopplung durch Bindung von Calcium/Calmodulin an den Kanal oder die in CPE-Zellen exprimierten TRPM3-Kanäle werden anders aktiviert. Die Aktivität einer humanen TRPM3 β -Variante konnte nach Überexpression in HEK293-Zellen durch Erhöhung der Osmolarität der umgebenden Lösung (Grimm et al., 2003) oder durch Applikation von D-Erythro-Sphingosin stimuliert werden (Grimm et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Dissertation hergestellten TRPM3-defizienten Tiere werden helfen, die biologischen Funktionen von TRPM3-Kanälen im Organismus zu verstehen. Zukünftige vergleichende Untersuchungen dieser Tiere im Hinblick auf Veränderung des Zuckerhaushalts, der Freisetzung nichtglandotroper Hypophysenhormone, sowie der Kationenhomöostase in der CSF, werden klären, welche Funktionen die verschiedenen TRPM3-Kanalvarianten in den Geweben des Organismus besitzen.

5.3 Die heterooligomere TRPM-Proteinassoziation erlaubt die Regulation des Kanals

Nach dem derzeit gültigen Modell assoziieren vier TRP-Proteine zu einem Kationenkanalkomplex und bilden dessen ionenleitende Pore (Flockerzi, 2007). Eine heterooligomere Kanalassoziation unterschiedlicher TRP-Proteine bietet die Möglichkeit verschiedene, spezifische Eigenschaften eines TRP-Proteins mit solchen eines anderen zu verbinden und auf diese Weise Kanalkomplexe mit diversen, vollkommen unterschiedlichen

Eigenschaften zu generieren: So führte die Überexpression aller möglichen tetrameren TRPV5/TRPV6-Komplexe zu Ca^{2+} -Kanälen, die deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihre Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung, ihre Kationenselektivität und ihre pharmakologische Beeinflussbarkeit aufwiesen (Hoenderop et al., 2003b). Ca^{2+} -transportierende Nierenepithelzellen, welche TRPV5 und TRPV6 coexprimieren, könnten daher eine Vielzahl pleiotroper Kanäle mit unterschiedlicher Ca^{2+} -Transportkinetik generieren (Hoenderop et al., 2003b). Auch TRPV1 und TRPV3, welche durch unterschiedliche Temperaturen aktiviert werden (Liman, 2006), bilden heterooligomere Kanalkomplexe, welche intermediäre Leitfähigkeiten und Öffnungskinetiken im Vergleich zu den homomeren Komplexen aufweisen (Cheng et al., 2007b). Es ist daher vorstellbar, dass in Hinterwurzelganglien, in welchen diese beiden „Thermo“-TRP-Kanäle coexprimiert werden, heterooligomere Kanalkomplexe mit veränderten Leitfähigkeiten und möglicherweise auch veränderter Temperatursensitivität vorkommen (Cheng et al., 2007b).

Auch TRPM3- und TRPM1-Proteine sind in der Lage miteinander in direkte Wechselwirkung zu treten. Dabei interagieren TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Proteine untereinander ebenso wie TRPM3- und TRPM1-Proteine (Lis, 2005; Philipp et al., 2006). Diese Arbeit zeigt, dass TRPM1- oder TRPM3 α 1-Proteine den Steroid-induzierten TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in GH3- und Ins-1-Zellen blockieren. Diese Beobachtung korreliert mit den genannten Interaktionsstudien und deutet darauf hin, dass rekombinante TRPM1- und TRPM3 α 1-Proteine mit zelleigenen TRPM3-Proteinen in Wechselwirkung treten und durch die Bildung heterooligomerer Komplexe die Kanalfunktion verändern und dadurch deren Diversität erhöhen. Mit Hilfe von RT-PCR-Untersuchungen konnte ich zeigen, dass in GH3- und Ins-1-Zellen TRPM3 und TRPM1 coexprimiert werden (Abb. 12), jedoch konnten nur TRPM3-Varianten mit einer kurzen, Ca^{2+} -permeablen Pore, ähnlich TRPM3 α 2, identifiziert werden. Vermutlich ermöglicht die Wechselwirkung von TRPM1- und TRPM3-Proteinen in hormonsekretierenden Zellen von Hypophyse und Pankreas die Bildung heterooligomerer Kanalkomplexe unterschiedlicher Permeabilität und erlaubt auf diese Weise die Feinsteuerung der Hormonsekretion.

5.4 Effizienz des TRPM3-Gentargeting

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel TRPM3-defiziente Mauslinien herzustellen. Durch Nutzung zwei flankierender Thymidinkinasekassetten im Targetingkonstrukt sollte eine effektive Negativselektion erreicht werden. Leider brachte die Verwendung dieses Konstruktes keine homolog-rekombinanten ES-Zellklone hervor. Eine mögliche Erklärung ist, dass die flankierenden Thymidinkinase-cDNAs miteinander in direkte Wechselwirkung treten und die entstandene Sekundärstruktur die homologe Rekombination behindert. Eine andere

Ursache könnte die Thymidinkinase selbst sein: Hoganson und Mitarbeiter zeigten, dass Zellen, die Thymidinkinasen exprimieren, nach Gabe von Ganciclovir toxische Metaboliten produzieren, welche wachstumshemmend auf kokultivierte Zellen wirken (Hoganson et al., 1996). Wird die Thymidinkinase als Negativselektion beim Gentargeting eingesetzt, werden also Zellen gehemmt, die eigentlich selektiert werden sollen. Dieser sogenannte „Bystander“-Effekt wäre eine Erklärung dafür, dass von 621 ES-Zellklonen nur 313 (50%) die Überführung in eine 96-Lochplatte überstanden. Sie waren womöglich bereits so geschädigt, dass sie die Passage nicht überlebten. Die Verwendung nur einer Thymidinkinase ist weniger toxisch für die Zellkultur und tatsächlich überlebten die Passage nach dem Gentargeting mit einem zweiten Konstrukt, welches nur *eine* TK-Kassette enthielt, 645 von 798 ES-Zellklonen (80%).

Allerdings lassen sich durch die Toxizität der Thymidinkinase nicht die extrem geringen Rekombinationsraten erklären, die im Verlauf der Experimente erhalten wurden: Während beim ersten Targetingexperiment keiner der 313 selektierten Klone eine homologe Rekombination aufwies, zeigten beim zweiten Versuch nur drei der 645 analysierten ES-Zellklone ein korrekt inseriertes Targetingkonstrukt (Tab. 16). Das entspricht einer Rekombinationsrate von 0,46%. Der allgemeine Aufbau des Targetingkonstruktes war nicht Ursache für die geringe Effizienz, denn parallel wurden zwei weitere, strukturell gleiche Konstrukte für das Gentargeting des TRPC5- und des WU-2-Gens verwendet und führten zum Erfolg mit Rekombinationsraten von 3,66% und 6,38%.

Tab. 16: Targeting des TRPM3-Gens im Vergleich zum Targeting anderer TRP-Gene

Ziel-Gen	Negativselektion	Zahl der analysierten ES-Zellklone	ES-Zellklone mit korrekter Rekomb. Zahl / %	Referenz
TRPM3	Thymidinkinase (2) Thymidinkinase	313	0 / 0	diese Arbeit
		645	3 / 0,46	
TRPC5	Thymidinkinase	82	3 / 3,66	unveröffentlicht
WU-2	Thymidinkinase	454	29 / 6,38	unveröffentlicht
TRPV6	ohne	1279	0 / 0	Olausson, 2005
	Diphtherie Toxin A	289	0 / 0	Olausson, 2005
	GFP, Thymidinkinase	1140	3 / 0,26	Olausson, 2005
TRPM7	ohne	816	52 / 6,37	unveröffentlicht
TRPM4	Thymidinkinase	320	8 / 3,20	Vennekens et al., 2007
TRPC4	Thymidinkinase	250	6 / 2,40	Freichel et al., 2004

Ähnlich niedrige Rekombinationsraten wie beim Targeting von TRPM3 gab es bisher in unserer Arbeitsgruppe nur beim Targeting des TRPV6-Gens: Hier verliefen zwei Strategien erfolglos, bis schließlich eine Dritte zum Ziel führte und drei homolog-rekombinante aus 1140 analysierten Klonen hervorbrachte (0,26%). Warum es solche Unterschiede bei der Rekombinationseffizienz verschiedener Gen-Loci gibt, ist nur wenig verstanden. Es gibt Hinweise, dass transkribierte Gene besser rekombinieren als nicht-transkribierte

(Dominguez-Bendala and McWhir, 2004), möglicherweise deshalb weil ihre nukleosomale Struktur besser für eine Wechselwirkung mit dem Targetingkonstrukt zugänglich ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten in embryonalen Stammzellen der Maus keine TRPM3-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 11, S. 57).

Die drei homolog-rekombinanten ES-Zellklone wurden in Mausblastozysten injiziert. Im Unterschied zu Klon 19A4 wurden nach Injektion der Klone 9D2 und 16E10 jedoch nur niederchimäre Mäuse geboren, welche die Mutation nicht an ihre Nachfahren weitergaben. Offensichtlich sind die ES-Zellklone 9D2 und 16E10 nicht in der Lage, Tiere mit keimbahngängiger Mutation hervorzubringen. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass ES-Zellen nach mehr als 20 Passagen dazu neigen, aneuploid zu werden, wodurch ihre Fähigkeit verloren geht, Keimzellen auszubilden (Longo et al., 1997). Zellen mit der häufig auftretenden Abnormalität Trisomie 8, besitzen zudem einen Wachstumsvorteil gegenüber euploiden Zellklonen (Liu et al., 1997). Es wäre daher denkbar, dass die ES-Zellklone 16E10 und 9D2 einen anormalen Chromosomensatz besitzen. Für die in dieser Arbeit verwendeten ES-Zellen der Linie R1 wurde jedoch auch nach 33 Passagen ein stabiler Karyotyp beschrieben (Nagy et al., 1993). Die im Rahmen meiner Arbeit verwendeten ES-Zellen wurden insgesamt nur 27 mal passagiert und führten zudem bei parallel durchgeführten Blastozysteninjektionen von ES-Zellen mit modifiziertem TRPC5- oder WU-2-Gen direkt zur Entstehung hochchimärer Tiere, welche die Mutation in den Keimzellen trugen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass sich die Passagenzahl der ES-Zellen negativ auf die Effizienz des TRPM3-Targetings auswirkte.

6 Literaturverzeichnis

Aarts, M., Iihara, K., Wei, W. L., Xiong, Z. G., Arundine, M., Cerwinski, W., MacDonald, J. F., and Tymianski, M. (2003), A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell*, 115:863-877.

Altman, P. L. and Katz, D. D. (editors)(1979), Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, Bethesda/Maryland

Anastassiou, D., Liu, H., and Varadan, V. (2006), Variable window binding for mutually exclusive alternative splicing. *Gen. Biol.*, 7.

Anderson, L. L., Jeffinija, S., and Scanes, C. G. (2004), Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp. Biol. Med.* 229:291-302.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992), Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130:167-178.

Baulieu, E. E. (1998), Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23:963-987.

Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2006), TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124:1269-1282.

Beddington, R. S. and Robertson, E. J. (1989), An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105:733-737.

Ben Jonathan, N. and Hnasko, R. (2001), Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.*, 22:724-763.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001), Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366.

Bianco, S. D., Peng, J. B., Takanaga, H., Suzuki, Y., Crescenzi, A., Kos, C. H., Zhuang, L., Freeman, M. R., Gouveia, C. H., Wu, J., Luo, H., Mauro, T., Brown, E. M., and Hediger, M. A. (2007), Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J. Bone Miner. Res.*, 22:274-285.

Birder, L. A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M. L., Barrick, S., Kanai, A. J., Wang, E., Ruiz, G., De Groat, W. C., Apodaca, G., Watkins, S., and Caterina, M. J. (2002) Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat. Neurosci.*, 5:856-860.

Bollimuntha, S., Singh, B. B., Shavali, S., Sharma, S. K., and Ebadi, M. (2005), TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 280:2132-2140.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984), Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309:255-256.

Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T., and Millar, I. D. (2004), Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129:957-970.

- Buchholz, F., Angrand, P. O., and Stewart, A. F. (1998), Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.*, 16:657-662.
- Bukusoglu, C. and Sarlak, F. (1996), Pregnenolone sulfate increases intracellular Ca²⁺ levels in a pituitary cell line. *Eur. J. Pharmacol.*, 298:79-85.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987), XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β-galactosidase selection. *Bio Techniques*, 5:376-378.
- Cahalan, M. D. (2001), Cell biology. Channels as enzymes. *Nature*, 411:542-543.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitze, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2000), Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288:306-313.
- Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S. A., Stokes, A. J., Kinet, J. P., Fleig, A., and Penner, R. (2007a), TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium*, 41:51-61.
- Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C. L., and Zheng, J. (2007b), Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J. Gen. Physiol.*, 129:191-207.
- Chien, A., Edgar, D. B., and Trela, J. M. (1976), Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, 127:1550-1557.
- Christoph, T., Grunweller, A., Mika, J., Schafer, M. K., Wade, E. J., Weihe, E., Erdmann, V. A., Frank, R., Gillen, C., and Kurreck, J. (2006), Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350:238-243.
- Chubanov, V., Waldegger, S., 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.*, 101:2894-2899.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984), Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:1991-1995.
- Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426:517-524.
- 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*, 432:723-730.
- Crayton, M. E., Powell, B. C., Vision, T. J., and Giddings, M. C. (2006), Tracking the evolution of alternatively spliced exons within the Dscam family. *BMC Evol. Biol.*, 6.
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Perez, C. A., Shigemura, N., Yoshida, R., Mosinger, B., Jr., Glendinning, J. I., Ninomiya, Y., and Margolskee, R. F. (2006), Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem. Senses*, 31:253-264.

- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., and McMahon, A. P. (1998), Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.*, 8:1323-1326.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A., and Sheardown, S. A. (2000), Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405:183-187.
- Deeds, J., Cronin, F., and Duncan, L. M. (2000), Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors. *Hum. Pathol.*, 31:1346-1356.
- Dietrich, A., Mederos, Y. S., 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.*, 25:6980-6989.
- Dominguez-Bendala, J. and McWhir, J. (2004), Enhanced gene targeting frequency in ES cells with low genomic methylation levels. *Transgen. Res.*, 13:69-74.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Cronin, F. E., Donovan, M., Sober, A. J., Kauffman, M., and McCarthy, J. J. (2001), Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 19:568-576.
- 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.*, 58:1515-1520.
- Dymecki, S. M. and Tomasiewicz, H. (1998), Using Flp-recombinase to characterize expansion of Wnt1-expressing neural progenitors in the mouse. *Dev. Biol.*, 201:57-65.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001), Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-498.
- Erler, I., Al Ansary, D. M., Wissenbach, U., Wagner, T. F., Flockerzi, V., and Niemeyer, B. A. (2006), Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J. Biol. Chem.*, 281:38396-38404.
- Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Niemeyer, B. A. (2004), Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.*, 279:34456-34463.
- Fantozzi, I., Zhang, S., Platoshyn, O., Remillard, C. V., Cowling, R. T., and Yuan, J. X. (2003), Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285:L1233-L1245.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984), "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Analytic. Biochem.*, 137:266-267.
- Flockerzi, V. (2007), An introduction on TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 1-19. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Freichel, M. and Flockerzi, V. (2007), Biological functions of TRPs unravelled by spontaneous mutations and transgenic animals. *Biochem. Soc. Trans.*, 35:120-123.

- Freichel, M., Philipp, S., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (2004), TRPC4 and TRPC4-deficient mice. *Novartis Found. Symp.*, 258:189-99
- 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 Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat. Cell Biol.*, 3:121-127.
- Gibbs, T. T., Russek, S. J., and Farb, D. H. (2006), Sulfated steroids as endogenous neuromodulators. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 84:555-567.
- Goel, M., Sinkins, W. G., and Schilling, W. P. (2002), Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 277:48303-48310.
- Griegel, S., Hong, C., Frotschl, R., Hulser, D. F., Greger, V., Horsthemke, B., and Rajewsky, M. F. (1990), Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype in vitro. *Int. J. Cancer.*, 46:125-132.
- Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., and Harteneck, C. (2005) Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol. Pharmacol.*, 67:798-805.
- Grimm, C. M., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003), Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J. Biol. Chem.*, 278:21493-21501.
- Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X., and Schreibmayer, W. (1998), Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett.*, 437:101-106.
- Gudermann, T. and Flockerzi, V. (2005), TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371:241-244.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, M. (2005), Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.*, 118:917-928.
- Hickman-Davis, J. M. (2001), Implications of mouse genotype for phenotype. *News Physiol. Sci.*, 16:19-22
- Hoenderop, J. G., van Leeuwen, J. P., van der Eerden, B. C., Kersten, F. F., van der Kemp, A. W., Merillat, A. M., Waarsing, J. H., Rossier, B. C., Vallon, V., Hummler, E., and Bindels, R. J. (2003a), Renal Ca^{2+} wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J. Clin. Invest.*, 112:1906-1914.
- Hoenderop, J. G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., and Bindels, R. J. (2003b), Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.*, 22:776-785.
- 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.*, 13:1153-1158.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002), Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:7461-7466.

- Hoganson, D. K., Olsen, J. C., and Boucher, R. C. (1996), Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Hum. Gene Ther.*, 9:1143-1156.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981), A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114:193-197.
- Hsu, Y. J., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2007), TRP channels in kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 8:928-936.
- Humphray, S. J., Oliver, K., Hunt, A. R., Plumb, R. W., Loveland, J. E. and Dunham, I. (2004), DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature*, 429:369-374.
- Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., and Shigekawa, M. (2003), A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J. Cell Biol.*, 161:957-967.
- Jahnel, R., Dreger, M., Gillen, C., Bender, O., Kurreck, J., and Hucho, F. (2001), Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur. J. Biochem.*, 268:5489-5496.
- 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.*, 276:28613-28619.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherck, C., and Schutz, G. (1999), Inducible site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.*, 285:175-182.
- Kwan, K. M. (2002), Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*, 32:49-62.
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D. S., Woolf, C. J., and Corey, D. P. (2006), TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, 50:277-289.
- Lachowicz, A., Pawlikowski, M., and Rebas, E. (2001), Pregnenolone sulfate modulates angiotensin II-induced inositol 1,4,5-trisphosphate changes in the anterior pituitary of female rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287:701-704.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W., and Westphal, H. (1996), Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:5860-5865.
- Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A., and Kinet, J. P. (2004), TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, 306:1374-1377.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., and Kinet, J. P. (2002), TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109:397-407.
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M. J. (2005), Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J. Neurosci.*, 25:1304-1310.

- Lee, N., Chen, J., Wu, S., Sun, L., Huang, M., Levesque, P. C., Rich, A., Feder, J. N., Gray, K. R., Lin, J. H., Janovitz, E. B., and Blanas, M. A. (2003), Expression and characterization of human Transient Receptor Potential Melastatin 3 (hTRPM3). *J. Biol. Chem.*, 278:20890-20897.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993), The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-854.
- Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., and Axel, R. (2002), Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:6376-6381.
- Liedtke, W. and Friedman, J. M. (2003), Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:13698-13703.
- Liman, E. R. (2006), Thermal gating of TRP ion channels: food for thought? *Sci. STKE*, 326:e12.
- Lis, A. (2005), Identifizierung von TRPM3- und TRPM1-Ionenkanälen: Funktionelle Diversität durch alternatives Spleißen der Transkripte und durch heterooligomere Assemblierung der Kanaluntereinheiten. *Dissertation; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät 8 der Universität des Saarlandes*.
- Lis, A., Wissenbach, U., and Philipp, S. E. (2005), Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371:315-324.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004), Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305:1437-1441.
- Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteche, C. M., Bornstein, P., and Jaenisch, R. (1997), Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.*, 209:85-91.
- Longo, L., Bygrave, A., Grosveld, F. G., and Pandolfi, P. P. (1997) The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgen. Res.*, 6:321-328.
- Mansour, S. L., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1988), Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336:348-352.
- Martin, T. F. (2003), Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1641:157-165.
- McFall, R. C., Sery, T. W., and Makadon, M. (1977), Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res.*, 37:1003-1010.
- Mears, D. (2004), Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels. *J. Membr. Biol.*, 200:57-66.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M., and Martin, G. R. (1998), An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.*, 18:136-141.
- Millar, I. D., Bruce, J. I., and Brown, P. D. (2007), Ion channel diversity, channel expression and function in the choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Res.*, 4.

- Miller, A. J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C. L., Widlund, H. R., and Fisher, D. E. (2004), Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res.*, 64:509-516.
- Missler, M. and Sudhof, T. C. (1998), Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet.*, 14:20-26.
- Mitchell, C. H., Peterson-Yantorno, K., Carre, D. A., McGlenn, A. M., Coca-Prados, M., Stone, R. A., and Civan, M. M. (1999), A3 adenosine receptors regulate Cl⁻ channels of nonpigmented ciliary epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 276:C659-C666.
- Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M., and Suzuki, M. (2003), Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285: 96-101.
- Mohler, P. J., Gramolini, A. O., and Bennett, V. (2002), Ankyrins. *J. Cell Sci.*, 115:1565-1566.
- Montell, C. (1999), Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15:231-268.
- Montell, C. (2005), The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE*, 272:re3.
- Montell, C. and Rubin, G. M. (1989), Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2:1313-1323.
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M., and Patapoutian, A. (2005), Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 307:1468-1472.
- Morse, H. C. (1978), Origins of inbred mice. *Academics Press, New York*.
- Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M., and Fleig, A. (2001), LTRPC7 is a MgATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411:590-595.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A. K., Pirtity, M. and Rossant, J. (1998), Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr. Biol.*, 8:661-664.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993), Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:8424-8428.
- Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I. and Molkentin, J. D. (2006), Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J.*, 20:1660-1670.
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P.D. Caterina, M.J. (2003), TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J. Neurophysiol.*, 90:515-520.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., and Flockerzi, V. (2003), Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.*, 278:30813-30820.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., and Sugino, Y. (1990), A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.*, 18:6169.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991), Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108:193-199.

- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., and Philipp, S. E. (2005), Alternative Splicing Switches the Divalent Cation Selectivity of TRPM3 Channels. *J. Biol. Chem.*, 280:22540-22548.
- Oberwinkler, J. and Philipp, S. E. (2007), TRPM3. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 253-267. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Olausson, J. (2005), Gezielte Inaktivierung von Genen der TRP-Kanalproteine. *Dissertation*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät 8 der Universität des Saarlandes.
- Pei, Y. and Tuschl, T. (2006), On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat. Methods*, 3:670-676.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. (2002), The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr. Biol.*, 12:938-943.
- Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A., Bagley, L. A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A. J., Zhu, Q., Bessman, M. J., Penner, R., Kinet, J. P., and Scharenberg, A. M. (2001), ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411:595-599.
- Philipp, S. E., Lis, A., and Oberwinkler, J. (2006), Functional diversity of TRPM3 cation channel is generated by splicing and heterooligomeric channel assembly. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 372 Suppl.1:R202.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., and Penner, R. (2003), TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[Ca^{2+}]_i$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:15166-15171.
- Ray, M. K., Fagan, S. P., Moldovan, S., DeMayo, F. J., and Brunicardi, F. C. (1999), Development of a transgenic mouse model using rat insulin promoter to drive the expression of CRE recombinase in a tissue-specific manner. *Int. J. Pancreatol.*, 25:157-163.
- Roe, M. W., Worley, J. F., Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A. A., Dralyuk, F., Blair, N. T., Mertz, R. J., Philipson, L. H., and Dukes, I. D. (1998), Characterization of a Ca^{2+} release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in transgenically derived beta-cells. *J. Biol. Chem.*, 273:10402-10410.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., and Logothetis, D. E. (2005), PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.*, 8:626-634.
- Runnels, L. W., Yue, L., and Clapham, D. E. (2001), TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, 291:1043-1047.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
- Sakura, H. and Ashcroft, F. M. (1997), Identification of four *trp1* gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia*, 40:528-532.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 74:5463-5467.

- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2001), Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*, 293:1327-1330.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1989), Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res.*, 17:147-161.
- Schaefer, M., Plant, T. D., Stresow, N., Albrecht, N., and Schultz, G. (2002), Functional differences between TRPC4 splice variants. *J. Biol. Chem.*, 277:3752-3759.
- Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann, N. L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H. W., and Konrad, M. (2002), Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.*, 31:166-170.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995), A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.*, 23:5080-5081.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150:76-85.
- Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002), Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295:1493-1500.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001), TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*, 29:645-655.
- Suarez, C., Vela, J., Garcia-Tornadu, I., and Becu-Villalobos, D. (2005), Dehydroepiandrosterone (DHEA) modulates GHRH, somatostatin and angiotensin II action at the pituitary level. *J. Endocrinol.*, 185:165-172.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003), Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem.*, 278:22664-22668.
- Tabuchi, K., Suzuki, M., Mizuno, A., and Hara, A. (2005), Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci. Lett.*, 382:304-308.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F., and Nilius, B. (2005), Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*, 438:1022-1025.
- Tashjian, A. H., Jr., Bancroft, F. C., and Levine, L. (1970), Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J. Cell Biol.*, 47:61-70.
- Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2005), Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280:39423-39435.
- Thomas, K. R., Folger, K. R., and Capecchi, M. R. (1986), High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44:419-428.

- Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S. M., Paria, B. C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A. B. (2002), Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ. Res.*, 91:70-76.
- Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A., and Suzuki, M. (2004), Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J. Biol. Chem.*, 279:35133-35138.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006), TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.*, 25:1804-1815.
- Tsuruda, P. R., Julius, D., and Minor, D. L., Jr. (2006), Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron*, 51:201-212.
- van der Eerden, B. C., Hoenderop, J. G., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Buurman, C. J., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A., Bindels, R. J., and van Leeuwen, J. P. (2005), The epithelial Ca^{2+} channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:17507-17512.
- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1999), Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca^{2+} entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:2060-2064.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S. E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V., and Freichel, M. (2007), Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat. Immunol.*, 8:312-320.
- Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004), Outer pore architecture of a Ca^{2+} -selective TRP channel. *J. Biol. Chem.*, 279:15223-15230.
- Voets, T. and Nilius, B. (2003), The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium*, 33:299-302.
- Wagner, T. F., Loch, S., Straub, I., Lambert, S., Lis, A., Mannebach, S., Flockerzi, V., Philipp, S. E., and Oberwinkler, J. (2007a), TRPM3alpha2 channels are ionotropic steroid receptors in endocrine cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 375 Suppl.1:R173.
- Wagner, T. F. J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Düfter, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S. E., and Oberwinkler, J. (2007b), Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *eingereichtes Manuskript*.
- Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsohia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R., and Sheffield, V. C. (2002), Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.*, 31:171-174.
- Warnat, J., Philipp, S., Zimmer, S., Flockerzi, V., and Cavalié, A. (1999), Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca^{2+} . *J. Physiol.*, 518:631-638.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988), Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336:684-687.

- Wistow, G., Bernstein, S. L., Wyatt, M. K., Behal, A., Touchman, J. W., Bouffard, G., Smith, D., and Peterson, K. (2002), Expressed sequence tag analysis of adult human lens for the NEIBank Project: over 2000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants. *Mol. Vis.*, 8:171-84.:171-184.
- Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J. H., Reynolds, D. M., Maeda, Y., Le, T. C., Hou, H., Jr., Kucherlapati, R., Edelmann, W., and Somlo, S. (1998), Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell*, 93:177-188.
- Wu, G., Markowitz, G. S., Li, L., D'Agati, V. D., Factor, S. M., Geng, L., Tibara, S., Tuchman, J., Cai, Y., Park, J. H., van Adelsberg, J., Hou, H., Jr., Kucherlapati, R., Edelmann, W., and Somlo, S. (2000), Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat. Genet.*, 24:75-78.
- Xu, X., Li, C., Garrett-Beal, L., Larson, D., Wynshaw-Boris, A., and Deng, C. X. (2001a), Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis*, 30:1-6.
- Xu, X. Z., Moebius, F., Gill, D. L., and Montell, C. (2001b), Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:10692-10697.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003), Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, 17:3011-3016.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000), RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101:25-33.
- Zheng, W. and Zhao, Q. (2002), Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Res.*, 958:371-380.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Mannebach
Geburtsdatum: 09.11.1978
Geburtsort: Lebach
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Adresse: Rudolf-Diesel-Str. 3A
66773 Schwalbach

Telefon: 06831-51510
Mobiltelefon: 0176-21118760

Werdegang

1989 - 1998 Illtalgymnasium Illingen, Abschluss Abitur

1998 - 2003 Biologiestudium, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Abschluss Diplombiologin (Note 1,2)
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Mikrobiologie, Virologie

 Diplomarbeit im Institut für Virologie
Titel der Diplomarbeit: Identifizierung putativer p53-Bindungsstellen im mitochondrialen Genom
Betreuer: PD Dr. Klaus Römer

12/2003 - 2008 Promotion im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie & Toxikologie
Universität des Saarlandes, Homburg

Tagungen

Frühjahrstagung der DGPT 2007, Mainz

Vortrag: „Hemmung des Steroid -aktivierten Calcium-Einstroms in endokrinen Zellen durch TRPM1“

Viertes internationales SFB 530 Symposium „Spatio-Temporal Interactions of Cellular Signalling Molecules“ in Homburg, 18. & 19. Mai, Homburg

Publikationen

Heyne K., Mannebach S., Wuertz E., Knaup K.X., Mahyar-Roemer M., Roemer K., 2004
Identification of a putative p53 binding sequence within the human mitochondrial genome
FEBS LETTERS 578: 198-202

Eingereichtes Manuskript:

Wagner T.F.J., Loch S., Lambert S., Straub I., Mannebach S., Düfer M., Lis, A., Flockerzi V., Philipp S.E., Oberwinkler J.

Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β -cells.

Publizierte Abstracts:

S. Mannebach, S. Lambert, T.F.J. Wagner, V. Flockerzi, J. Oberwinkler, S.E. Philipp, 2007
Inhibition of steroid activated calcium entry pathways in endocrine cells by introduction of TRPM1

Naunyn- Schmiedeberg`s Archives of Pharmakologie volume 375, suppl 1, 172

T.F.J. Wagner, S. Loch, I. Straub, S. Lambert, A. Lis, S. Mannebach, V. Flockerzi, S.E. Philipp, J. Oberwinkler, 2007

TRPM3 α 2 channels are ionotropic steroid receptors in endocrine cells

Naunyn- Schmiedeberg`s Archives of Pharmakologie volume 375, suppl 1, 173