

Untersuchungen zur physiologischen Relevanz von TRPM5 im endokrinen System

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

von

Wiebke Jessen

geboren am 01.11.1985 in Speyer

Mainz, im Juli 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Mündliche Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden	23
2.1 DNA- und RNA-Standardmethoden	23
2.1.1 RNA-Isolierung	23
2.1.2 Reverse Transkription	24
2.1.3 DNA-Isolierung	25
2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.1.6 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen.....	28
2.1.7 Aufreinigung von DNA	28
2.1.8 Fällung von DNA	29
2.1.9 Restriktion von DNA	30
2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.1.12 Quantitative Echtzeit-PCR.....	32
2.1.13 Sanger-Sequenzierung.....	35
2.2 Arbeiten mit Proteinen	36

2.2.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	36
2.3	Mikrobiologische Methoden	38
2.3.1	Herstellung chemokompetenter Bakterien.....	38
2.3.2	Transformation chemokompetenter Bakterien.....	38
2.3.3	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen.....	39
2.4	Zellkultur-Techniken	39
2.4.1	Kultivierung von Zellen	39
2.4.2	Auftauen von kryokonservierten Zellen	40
2.4.3	Kryokonservierung von Zellen	40
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl	40
2.4.5	Transiente Transfektion von Zellen	41
2.4.6	Stabile Transfektion von Zellen	41
2.4.7	Erstellung einer Titrationskurve zur G418-Selektion.....	43
2.4.8	Zellfixierung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	43
2.5	Stimulationsversuche endokriner Zellen	44
2.5.1	Reduktion des Hormongehalts von FCS durch Behandlung mit Aktivkohle 44	
2.5.2	Reportergenanalysen zur Überprüfung der TSH-Stimulierbarkeit humaner Thyreozyten.....	44
2.5.3	TRH-Stimulation der murinen Hypophysenzelllinie Tat1	46
2.5.4	CaCl ₂ -Stimulation der humanen C-Zelllinie TT	46
2.6	Anhang: Verwendetes Material	47

2.6.1	Bakterienstämme.....	47
2.6.2	Chemikalien und Reagenzien.....	47
2.6.3	Enzyme	51
2.6.4	Geräte	51
2.6.5	Kits	54
2.6.6	Lösungen und Puffer	55
2.6.7	Molekulargewichtsstandards	59
2.6.8	Oligonukleotide.....	59
2.6.9	Tiere	63
2.6.10	Verbrauchsmaterialien.....	63
2.6.11	Vektoren	65
2.6.12	Vektorkonstrukte.....	65
2.6.13	Zelllinien	65
2.6.14	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	65
3	Ergebnisse	67
3.1	Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion	67
3.1.1	Bestimmung des fT4-Serumspiegels in der <i>Trpm5^{-/-}</i> -Maus	67
3.1.2	Etablierung einer geeigneten Zelllinie zur funktionellen Untersuchung von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion	68
3.2	Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der Adenohypophyse	71
3.2.1	Bestimmung des TSH-Serumspiegels in der <i>Trpm5^{-/-}</i> -Maus	71

3.2.2	Etablierung einer geeigneten Zelllinie zur funktionellen Untersuchung von TRPM5 in der thyreotropen Adenohypophyse.....	73
3.2.3	Sequenzierungsanalyse des TRPM5-Gens bei Patienten mit reduziertem fT4- sowie reduziertem TSH-Spiegel.....	83
3.3	Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der parafollikulären Hormonsekretion.....	87
4	Diskussion	96
4.1	Physiologische Funktion von TRPM5 im thyreotropen Regelkreis	97
4.2	Physiologische Funktion von TRPM5 in parafollikulären Zellen.....	111
4.3	Ausblick	121
5	Zusammenfassung.....	124
6	Literaturverzeichnis	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Struktureller Aufbau eines TRP-Tetramers und seiner Proteinuntereinheit.	2
Abbildung 1.2 Wahrnehmung der Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami.	8
Abbildung 1.3 Feinregulation der Insulinsekretion in β -pankreatischen Zellen durch TRPM5.	11
Abbildung 1.4 Rolle von TRPM5 im Sekretionsmechanismus von MUC5AC in den Becherzellen des Colons.	13
Abbildung 1.5 <i>Dot Northern Blot</i> Expressionsanalysen in humanen Geweben bezüglich <i>TRPM5</i>	14
Abbildung 1.6 Histologie der Schilddrüse.	16
Abbildung 1.7 Thyreotroper Regelkreis zwischen Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse.	18
Abbildung 1.8 Regulation der Ca^{2+} -Homöostase durch die Hormone Calcitonin und Parathormon.	19
Abbildung 3.1 fT4-Serumspiegel von <i>Trpm5</i> ^{+/+} - und <i>Trpm5</i> ^{-/-} -Mäusen im Vergleich.	68
Abbildung 3.2 1,5% Agarosegel des qRT-PCR-Produkts bezüglich <i>TSHR</i> in NThy-ori 3-1.	69
Abbildung 3.3 cAMP-abhängige Luciferase Aktivität nach Stimulation mit verschiedenen TSH-Konzentrationen.	71
Abbildung 3.4 TSH-Serumspiegel von <i>Trpm5</i> ^{+/+} - und <i>Trpm5</i> ^{-/-} -Mäusen im Vergleich.	72
Abbildung 3.5 Expression von <i>Trpm5</i> und <i>Tshb</i> in Tat1-Zellen.	74
Abbildung 3.6 Expression von <i>Tshb</i> in Tat1 nach 24 h Stimulation mit 0,1 μ M TRH.	75
Abbildung 3.7 Expression von <i>Tshb</i> in Tat1 nach definierten Inkubationszeiten mit 0,1	

μM TRH.....	76
Abbildung 3.8 Vektorkarte des im Konstrukt verwendeten pcDNA3-Plasmids.	77
Abbildung 3.9 Überlebenskurve der Zelllinie Tat1 in Abhängigkeit der eingesetzten G418-Konzentration.	78
Abbildung 3.10 Lokalisation von PLE in Tat1-Zellen.	79
Abbildung 3.11 Lokalisation von PE in Tat1-Zellen.	80
Abbildung 3.12 Expression von <i>Tshb</i> in <i>TRPM5</i> -überexprimierenden Tat1 (PLE) im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (PE) nach Stimulation mit 0,1 μM TRH.....	81
Abbildung 3.13 Sekretion von TSH in <i>TRPM5</i> -überexprimierenden Tat1 (PLE) im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (PE) nach Stimulation mit 0,1 μM TRH.....	82
Abbildung 3.14 Polynukleotid-Insertion eines Patienten mit pathogener fT4- und TSH-Reduktion im zweiten Intron von <i>TRPM5</i>	84
Abbildung 3.15 Position der durch die betroffenen Polymorphismen beeinträchtigten Aminosäuren im <i>TRPM5</i> -Protein.....	86
Abbildung 3.16 Korrelationsanalyse bezüglich der Genexpression von <i>TRPM5</i> und <i>CALCA</i>	88
Abbildung 3.17 Expression von <i>TRPM5</i> und <i>CALCA</i> in TT-Zellen.....	89
Abbildung 3.18 Sekretion von Calcitonin in nativen TT-Zellen nach Stimulation mit 3 mM und 6 mM CaCl ₂	91
Abbildung 3.19 Überlebenskurve der Zelllinie TT in Abhängigkeit der eingesetzten G418-Konzentration.	92
Abbildung 3.20 Lokalisation von PLE und PE in TT-Zellen.	93
Abbildung 3.21 Sekretion von Calcitonin in PE- und PLE-überexprimierenden TT-Zellen nach Stimulation mit 6 mM CaCl ₂	95
Abbildung 4.1 Modell zur physiologischen Funktion von <i>TRPM5</i> in der	

Hypophysenzelle.....	109
Abbildung 4.2 Modell zur physiologischen Funktion von TRPM5 in der parafollikulären C-Zelle.....	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Reaktionsansätze der verwendeten reversen Transkriptasen von Invitrogen bzw. New England Biolabs.	24
Tabelle 2.2 <i>Thermocycler</i> -Programme für die cDNA-Synthese mit M-MLV Reversen Transkriptasen von Invitrogen bzw. New England Biolabs.	25
Tabelle 2.3 PCR-Standardprogramm im <i>Thermocycler</i>	32
Tabelle 2.4 qPCR-Standardprogramme am <i>LightCycler480 II</i>	34
Tabelle 2.5 Übersicht der in den qPCR-Expressionsanalysen untersuchten Haushaltsgene.	35
Tabelle 2.6 Sanger-Sequenzierungsprogramm im <i>Thermocycler</i>	36
Tabelle 2.7 Geteste Transfektionsreagenzien zur Durchführung der stabilen Transfektion.	42
Tabelle 3.1 Zusammenfassung der gefundenen Polymorphismen im Genbereich von <i>TRPM5</i>	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACTH	Adrenocorticotropin, Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
CPHD	engl. <i>combined pituitary hormone deficiency</i>
CT	Calcitonin
DAG	Diacylglycerin
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eh.	ehemals
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fa.	Firma
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fT3	freies Triiodthyronin
fT4	freies Thyroxin

g	Gramm; bei Zentrifugation Erdschwerebeschleunigung
G	Guanin
GH	Somatotropin (engl. <i>growth hormone</i>)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
M.	<i>Morbus</i>
MAF	engl. <i>minor allele frequency</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom (engl. <i>medullary thyroid cancer</i>)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na ⁺	Natrium
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher (engl. <i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PA	Phosphatidsäure
p. A.	pro analysis

P2Y	P2 Nukleotidrezeptor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLC	Phospholipase C
pM	Picomolar
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRL	Prolaktin
PTH	Parathormon
RET-TK	RET-Tyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SNP ID	Identitätsnummer des Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Thymin
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TG	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
TRP	engl. <i>transient receptor potential</i>
TRH	Thyreoliberin (engl. <i>thyrotropin-releasing hormone</i>)
TSH	Thyreotropin, Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TSHR	TSH-Rezeptor
U	Unit(s)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
V	Volt
v. a.	vor allem

VDCC spannungsabhängiger Calciumkanal (engl. *voltage-dependent calcium channel*)
z. B. zum Beispiel

1 Einleitung

Informationsübertragung ist für die Funktion eines vielzelligen Organismus unabdingbar. Sie ermöglicht ihm, äußere Einflüsse und Signale zu integrieren, weiterzuverarbeiten und darauf adäquat zu reagieren. Einen wesentlichen Bestandteil der Informationsübertragung stellt der Ionentransport, insbesondere über die Zellmembran, dar. Da Ionen die Zellmembran aufgrund ihrer Ladung nicht durch einfache Diffusion passieren können, werden für sie durchlässige Transmembranproteine benötigt. Diese werden je nach Energiebedarf in aktive oder passive Transportproteine unterschieden. Zu den passiven Transportproteinen gehören die Ionenkanäle, welche Ionen entlang ihres Konzentrations- und Ladungsgradienten transportieren. Eine der größten Ionenkanalfamilien ist die Gruppe der sogenannten *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle. Diese Ionenkanäle transportieren ausschließlich Kationen nach Aktivierung und lösen dadurch eine Depolarisation der Zellmembran aus. Ihre Gruppierung erfolgt dabei aufgrund ihrer Sequenzhomologie. Insgesamt sind sieben Subfamilien bekannt, wovon fünf die höchste Homologie zum *Drosophila*-Gründungsmitglied *trp* aufweisen: Die klassische Subfamilie (TRPC), Vanilloid-Rezeptor-Subfamilie (TRPV), Melastatin-Subfamilie (TRPM), Ankyrin-Subfamilie (TRPA) und die NOMPC-Subfamilie (TRPN). Zwei weitere Subfamilien, die Polycystin-Subfamilie (TRPP) und Mucoipin-Subfamilie (TRPML), weisen eine geringere Sequenzhomologie auf (Venkatachalam und Montell, 2007; Wu *et al.*, 2010).

Alle TRP-Ionenkanäle besitzen eine gemeinsame Kernstruktur. Wie in Abbildung 1.1A gezeigt, setzt diese sich aus vier Untereinheiten zusammen, welche sich zu einem Tetramer zusammenlagern (Clapham, 2003). Dabei wurde sowohl die Bildung von Homotetrameren als auch von Heterotetrameren zwischen nah verwandten Kanälen beschrieben (Kedei *et al.*, 2001; Hoenderop *et al.*, 2003; Chubanov *et al.*, 2004). Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs Transmembrandomänen, wobei die Porendomäne zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne lokalisiert ist (Abbildung 1.1B). N- und C-Terminus befinden sich jeweils intrazellulär und

besitzen in Abhängigkeit der Subfamilie konservierte Regionen (Wu *et al.*, 2010).

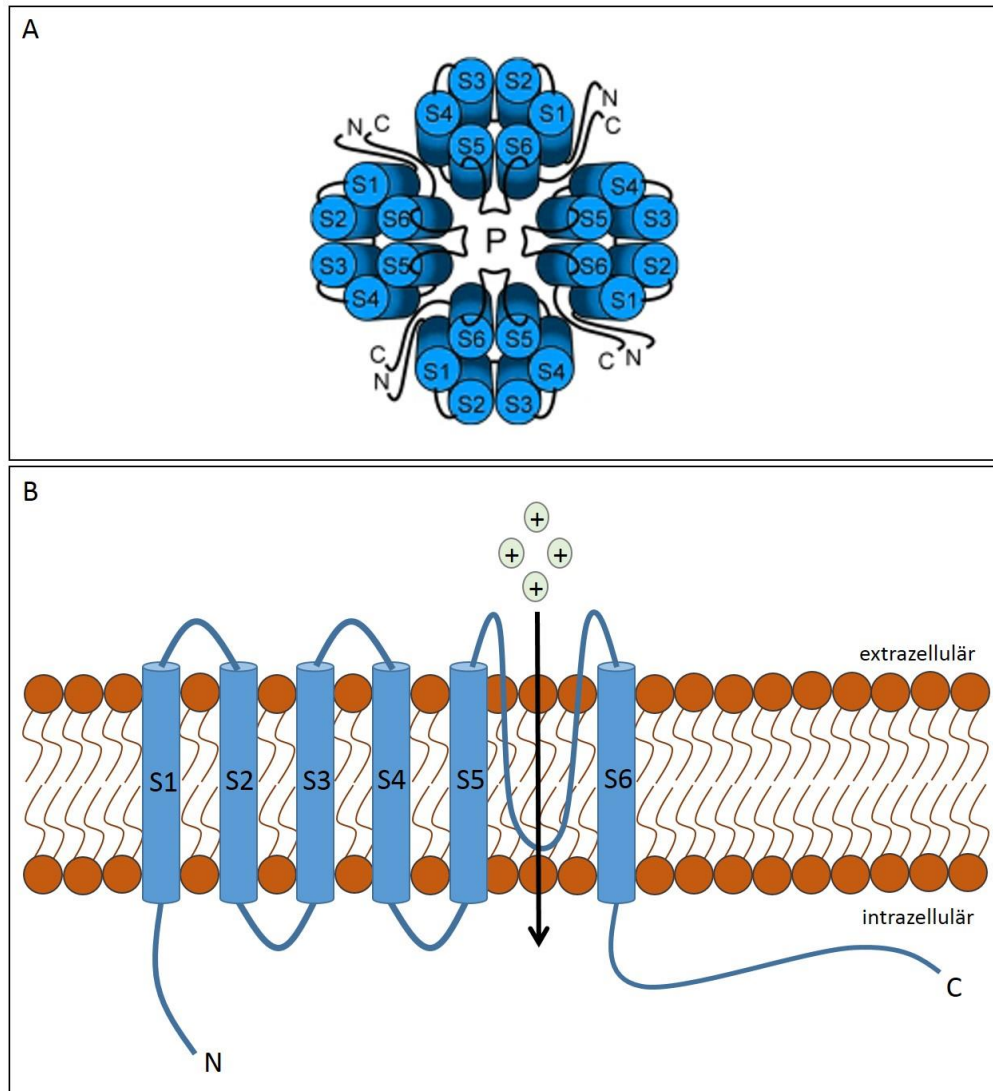


Abbildung 1.1 Struktureller Aufbau eines TRP-Tetramers und seiner Proteinuntereinheit.

Schematisch dargestellt sind (A) Aufsicht auf die Tetramerstruktur eines TRP-Ionenkanals und (B) die Struktur einer TRP-Proteinuntereinheit. Jede Untereinheit eines TRP-Proteins besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1 - S6), welche die Plasmamembran durchziehen. Die Ionenpore (P) ist zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment lokalisiert und ermöglicht den Transport von ein- oder zweiwertigen Kationen über die Plasmamembran. N- und C-Terminus der Untereinheit sind jeweils intrazellulär gelegen und besitzen für die jeweilige Subfamilie charakteristische konservierte Regionen. (A) verändert nach http://research.uni-leipzig.de/pharma/main/research/schaefer/TRP_multimerisation.html.

N-terminal befindet sich bei TRPC, TRPV, TRPA und TRPN eine Anhäufung von sogenannten Ankyrin Repeats. Sie spielen eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion und in der Assemblierung der Untereinheiten (Liu *et al.*, 2005b; Jin *et al.*, 2006; McCleverty *et al.*, 2006). TRPM-Kanäle besitzen diese Repeat-Einheiten nicht.

Stattdessen ist am N-Terminus eine große TRPM homologe Region zu finden, die aus vier Subfamilie-spezifischen Repeats besteht (Wu *et al.*, 2010). Ihre Funktion ist bislang nicht geklärt. Des Weiteren liegt bei einigen Mitgliedern der TRPC- und TRPM-Subfamilie eine *coiled coil* Domäne vor, welche in Zusammenhang mit der Homodimerisierung des Kanals sowie Regulation der Proteinexpression und -Funktion gebracht werden konnte (Engelke *et al.*, 2002; Mei und Jiang, 2009). Eine 25 Aminosäuren lange TRP-Domäne befindet sich unmittelbar C-terminal auf die sechste Transmembrandomäne folgend. Sie besteht aus einem konservierten Motiv, das die Bezeichnung TRP-Box trägt, und einer Prolin-reichen Region, welche TRP Box 2 benannt wurde. Diese Domäne ist mit Ausnahme von TRPA und TRPP in allen TRP-Kanälen der *Mammalia* sowie bei TRPN zu finden. Ihr schreibt man eine vielfältige Bedeutung in der Regulierbarkeit des Kanals, u. a. durch den Regulator PIP₂, sowie in der Aggregation des TRP-Kanals zu (Clapham, 2003; Montell, 2005; Garcia-Sanz *et al.*, 2004; Rohacs *et al.*, 2005). Neben dieser TRP-Domäne besitzen TRPP- und TRPM-Kanäle am C-Terminus eine weitere *coiled coil* Domäne, welche essentiell für die Tetramerisierung dieser Kanäle zu sein scheint (Mei *et al.*, 2006; Tsuruda *et al.*, 2006). Eine Besonderheit liegt des Weiteren bei einigen Kanälen der TRPM-Subfamilie vor, da diese durch Anwesenheit eines Enzyms eine bimodale Funktion ausüben können. Dies führte zu ihrer Bezeichnung als sogenannte *Chanzymes*, was sich aus den englischen Wörtern für Kanal (*channel*) und Enzym (*enzyme*) ableitet (Perraud *et al.*, 2001; Runnels *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2001; Ryazanova *et al.*, 2004).

Erstmals beschrieben wurden TRP-Kanäle in Photorezeptoren von *Drosophila melanogaster*. Eine *trp*-Mutante reagierte geblendet auf anhaltende Lichteinstrahlung und resensitivierte erst nach mindestens einminütiger Dunkelheit vollständig. Untersuchungen des Licht-induzierten Ionenstroms erwiesen sich im Gegensatz zum Wildtyp als transient und erklärten den gestörten Ca²⁺-Einstrom in den Photorezeptoren der Mutanten. Der elektrophysiologische Phänotyp führte zur Bezeichnung der *transient receptor potential*-Mutante (Minke *et al.*, 1975). Nach ihrer Entdeckung in *Drosophila* wurde die Existenz und Funktion von TRP-Kanälen auch in der Klasse der Säugetiere beschrieben. Aufgrund der höchsten Homologie zu *trp*

wurde diese Subfamilie als klassische Subfamilie bzw. TRPC-Kanalfamilie bezeichnet. Ihr gehören sieben Mitglieder an, welche insbesondere im Gehirn und der glatten Muskulatur exprimiert werden und dort Verantwortung in der Hirnentwicklung, Wahrnehmung von Pheromonen und Vasomotilität übernehmen (Freichel *et al.*, 2001; Leybold *et al.*, 2002; Stowers *et al.*, 2002; Greka *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

Die Bezeichnung der TRPV-Ionenkanäle geht zurück auf ihr erstes beschriebenes Mitglied, dem Vanilloid Rezeptor 1. Bislang konnten sechs Mitglieder identifiziert werden. Von besonderem Interesse war die Erforschung des Ionenkanals TRPV1, da dieser in thermosensitiven Nozizeptoren exprimiert wird und dadurch in die Wahrnehmung von (Hitze-) Schmerz involviert ist. Er wird auch Capsaicin-Rezeptor genannt, da er den Schärfe- und Wärmereiz dieses Alkaloids vermittelt (Caterina *et al.*, 1997; Caterina *et al.*, 2000). Ebenfalls eine Rolle in der Nozizeption schreibt man dem Ionenkanal TRPA1 zu, da er durch einige Schmerz-induzierende Verbindungen agonisiert wird (Bautista *et al.*, 2006; McNamara *et al.*, 2007; Petrus *et al.*, 2007). Er stellt das einzige Mitglied dieser Ionenkanal-Subfamilie in Säugetieren dar (Wu *et al.*, 2010). Die TRPML-Subfamilie besitzt dagegen in Säugetieren bis zu drei Mitglieder, die insbesondere in endolysosomale Prozesse involviert sind. Mutationen im *TRPML1*-Gen konnten daher als molekulare Ursache für die lysosomale Speicherkrankheit Mukopolipidose IV identifiziert werden (Bargal *et al.*, 2000; Bassi *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte eines der drei TRPP-Mitglieder ebenfalls mit einer Channelopathie assoziiert werden. Dabei handelt es sich um TRPP1, den bislang am besten untersuchten Kanal dieser Subfamilie. Etwa 15% der vorstelligen Patienten mit einer autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (engl. *autosomal dominant polycystic kidney disease*, ADPKD) weisen Mutationen innerhalb dieses Genlocus auf (Peters *et al.*, 1993).

Bei der bislang einzigen Subfamilie, die ausschließlich außerhalb der *Mammalia* zu finden ist, handelt es sich um die TRPN-Kanäle. Sie konnte bisher in *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Xenopus* und *Danio* nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Rolle in der Mechanosensorik erhielt die Subfamilie nach ihrer Entdeckung den englischen Namen „*no mechanoreceptor potential C*“ (nompC), weshalb sie nach TRP-Nomenklatur den Namen TRPN erhielten. Diese Kanäle scheinen in *Drosophila*

insbesondere für die Lokomotion und Propriozeption bedeutend zu sein (Walker *et al.*, 2000; Sidi *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Rolle des Ionenkanals TRPM5 näher untersucht, welcher zur Subfamilie der TRPM-Ionenkanäle gehört. Diese Subfamilie besteht aus insgesamt acht Mitgliedern, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Gruppen unterteilt werden: TRPM1 und TRPM3, TRPM4 und TRPM5, TRPM6 und TRPM7. TRPM2 und TRPM8 besitzen geringe Sequenzhomologie und werden daher in einer Gruppe zusammengefasst (Wu *et al.*, 2010). Der Name der Subfamilie geht zurück auf das erste beschriebene Mitglied Melastatin (TRPM1). Es wurde als Tumorsuppressor in Melanomzellen identifiziert, welcher in hochmetastasierenden Zellen herunterreguliert vorliegt (Duncan *et al.*, 1998). Die Transkriptmenge dieses Gens wurde daher als ergänzender, prognostischer Marker für das Metastasierungspotential von Melanom-Patienten postuliert (Fang *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 2001; Brożyna *et al.*, 2017). Ihm nahe verwandt ist TRPM3, welcher in Temperaturempfinden und Nozizeption involviert ist. Des Weiteren scheint er die Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen mitzuregulieren (Wagner *et al.*, 2008; Vriens *et al.*, 2011). Eine Einzigartigkeit unter Ionenkanälen zeigt sich bei TRPM2, TRPM6 und TRPM7. Bei diesen drei TRP-Kanälen handelt es sich um sogenannte *Chanzymes*, welche sich sowohl durch eine Ionenkanal- als auch durch eine Enzymfunktion auszeichnen. Die für die Enzymfunktion notwendige Proteindomäne befindet sich am C-Terminus einer jeweiligen Untereinheit. Sie fungiert in TRPM2 als Nukleosid-Diphosphat-Pyrophosphatase, welche spezifisch an ADP-Ribose binden und diese hydrolysieren kann (Perraud *et al.*, 2001). TRPM6 und TRPM7 besitzen dagegen eine atypische Proteinkinase, welche ihre Zielproteine an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Runnels *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2001). Als Vermittler im Ca^{2+} -*Signaling* ist TRPM2 in unterschiedlichste Zellprozesse, wie oxidativem Stress, Freisetzung von Insulin und Produktion von Zytokinen in Monozyten involviert (Hara *et al.*, 2002; Perraud *et al.*, 2004; Togashi *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2008). TRPM6 und TRPM7 spielen insbesondere in der zellulären Mg^{2+} -Homöostase eine funktionelle Rolle, welche sich aufgrund ihrer Beteiligung an der

Mg²⁺-Absorption in Niere und Darm auch systemisch auswirkt. Ihre physiologische Relevanz manifestiert sich in der durch *TRPM6*-Mutationen verursachten Erkrankung der Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie und der embryonalen Lethalität im Tiermodell bei homozygotem *Knockout* von *TRPM7* (Schlingmann *et al.*, 2002; Ryazanova *et al.*, 2010). Parallel zur Charakterisierung dieser drei *Chanzymes* führte die Identifizierung des Mentholrezeptors TRPM8 Anfang der 2000er Jahre zur Entdeckung des ersten Kälte-sensitiven TRP-Kanals. Es handelt sich somit um einen weiteren TRP-Ionenkanal, der eine entscheidende Rolle im Temperaturempfinden und der damit verbundenen Nozizeption spielt (McKemy *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2007).

Eine weitere Besonderheit unter den TRP-Kanälen zeigt sich bei den beiden Ionenkanälen TRPM4 und TRPM5, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie nahe verwandt sind. Als Einzige der TRP-Ionenkanäle sind diese beiden Kanäle impermeabel für divalente Kationen und transportieren ausschließlich monovalente Kationen. Dabei werden sie durch hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert (Launay *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2003; Liu und Liman, 2003; Prawitt *et al.*, 2003). Physiologisch ist TRPM4 dadurch u. a. in die Funktion und Zytokinproduktion von T-Zellen und in die Insulinsekretion involviert (Launay *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2010). Außerdem wurden Mutationen innerhalb des Gens mit einer fortschreitenden Erregungsleitungsstörung im Herzen mit Todesfolge assoziiert (Kruse *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Stallmeyer *et al.*, 2012). Auch für TRPM5 konnten bis heute einige funktionelle Charakterisierungen durchgeführt werden. So nahm man zunächst an, dass TRPM5 eine Rolle in der Tumorgenese spielen könnte. Diese Vermutung kam aufgrund der genetischen Lokalisation des *TRPM5*-Gens zustande, da es der Chromosomenregion 11p15.5 zugeordnet werden konnte, welche mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und Prädisposition für einige Tumoren assoziiert ist (Prawitt *et al.*, 2000). Diese Hypothese konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden. In der Erstbeschreibung des humanen Gens gelang es Prawitt *et al.* außerdem, das Transkript des humanen Gens zu bestimmen. Dieses ist ca. 4,5 kb groß und scheint durch alternatives Spleißen in Exon 18 in zwei Isoformen aufzutreten. Der offene Leserahmen führt zu einem aus 1165 bzw. 872 Aminosäuren bestehenden

Protein und damit einer Proteingröße von 131,45 kDa bzw. 97,74 kDa. Algorithmen prognostizierten für die längere Isoform ein Protein mit sechs Transmembrandomänen, während die kürzere Isoform lediglich die ersten vier Domänen beinhaltet (Prawitt *et al.*, 2000). Letztere wurde bislang bezüglich ihrer Funktion noch nicht näher untersucht. Im Gegensatz dazu tritt das 4,4 kb große murine Transkript ausschließlich in der langen Isoform auf. Sein Gen ist ortholog zum humanen Pendant auf Chromosom 7 lokalisiert und führt zu einem 1158 Aminosäuren langen Protein, dessen Transmembrandomänen sich lediglich in einer Aminosäure vom humanen Protein unterscheiden (Enklaar *et al.*, 2000). Voneinander unabhängige Expressionsanalysen von *TRPM5* wiesen ein breites Spektrum auf, mit höchsten Expressionen in Niere, Leber, Darm und Drüsengeweben (Prawitt *et al.*, 2000; Fonfria *et al.*, 2006). Außerdem wird es stark in Geschmacksrezeptor-Zellen exprimiert (Pérez *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang konnte die physiologische Rolle des Kanals daraufhin näher beschrieben werden. Vorteilhaft für viele der funktionellen Analysen war dabei die Existenz einer homozygoten *Trpm5 Knockout* Maus (*Trpm5^{-/-}*). Sie wurde von Zhang und Mitarbeitern auf der Basis eines C57BL/6 Hintergrunds generiert. Dazu wurden die Exons 15 bis 19 des *Trpm5*-Gens, welche für die ersten fünf Transmembrandomänen des Kanals kodieren, deletiert. Auf die Lebensfähigkeit, Körpergewicht, Anatomie und Verhalten der Tiere schien der *Knockout* keinen Effekt zu besitzen (Zhang *et al.*, 2003a). Allerdings führte er zu einem vollständigen Verlust der Wahrnehmung von süßen, bitteren und umami Geschmacksrichtungen. Hierdurch konnte die starke *TRPM5*-Expression in Geschmacksrezeptorzellen mit einer entscheidenden Rolle des Kanals in der Geschmacksperezeption assoziiert werden. Über die Bindung von süßen und Glutamat-haltigen bzw. bitteren Liganden an die Geschmacksrezeptoren T1R bzw. T2R in diesen Zellen wird eine *TRPM5* involvierende Signalkaskade ausgelöst, welche die Weiterleitung des Sinnessignals an afferente Neuronen des Gehirns ermöglicht (Abbildung 1.2).

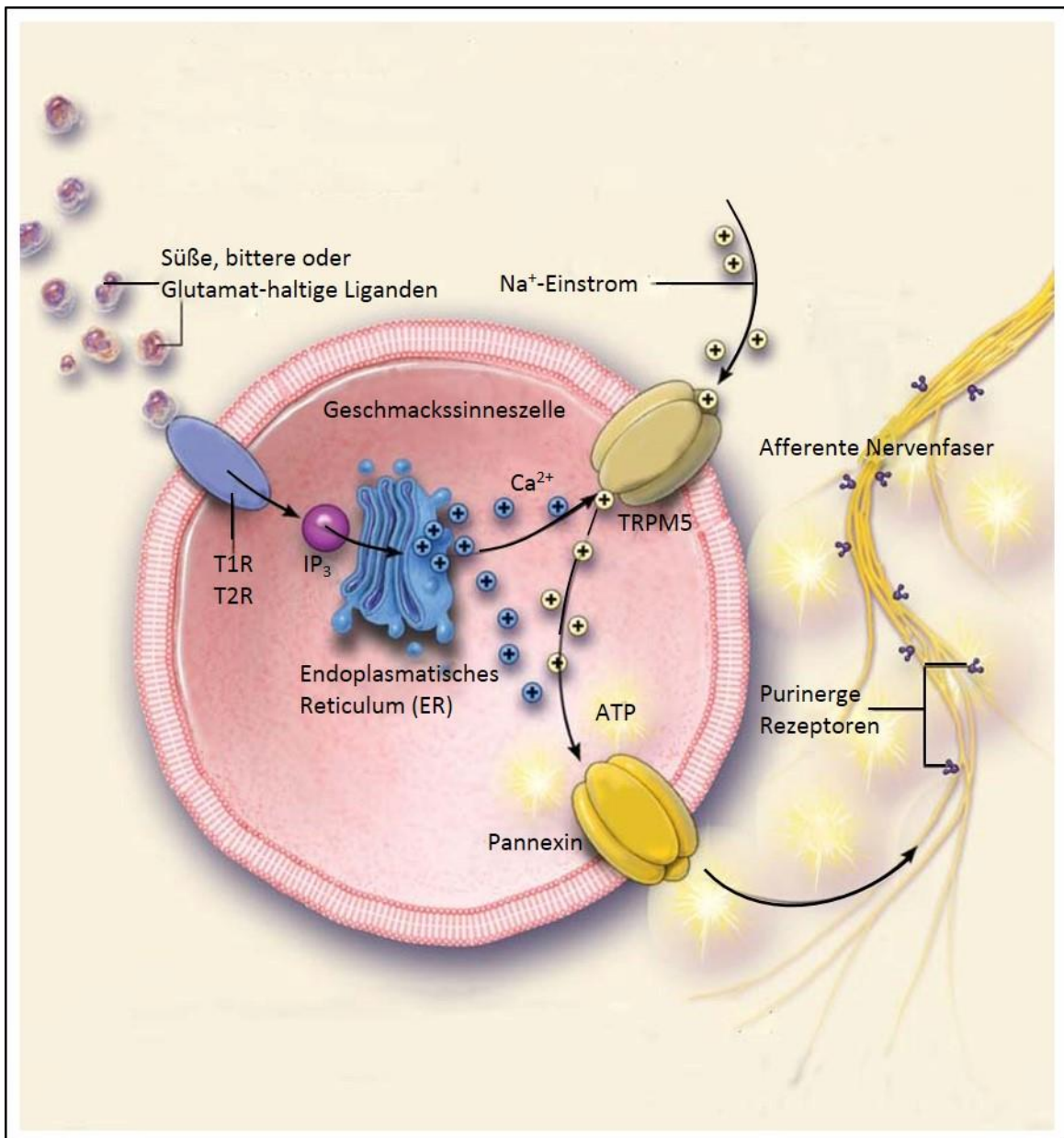


Abbildung 1.2 Wahrnehmung der Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami.

Durch die Bindung von süßen, bitteren oder glutamat-haltigen Substanzen an die Geschmacksrezeptoren in der Geschmackssinneszelle kommt es zur Ausschüttung des Botenstoffs IP₃, welcher an die IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Reticulums bindet und damit die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher bewirkt. Durch den drastischen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, wird TRPM5 aktiviert. Der konsequente Na⁺-Einstrom in die Zelle hat die Depolarisation der Zellmembran zur Folge, wodurch letztlich die Ausschüttung von ATP über Pannexine ermöglicht wird. Dieses bindet an purinerge Rezeptoren afferenter Nervenfasern und leitet somit das Sinnessignal an das Gehirn weiter. Verändert nach: Finger und Kinnamon, 2011.

Dabei bewirkt die Bindung eines solchen Liganden an den G-Protein gekoppelten Geschmacksrezeptor die Dissoziation des G-Proteins. Dessen Untereinheiten β und γ aktivieren das Enzym Phospholipase C β₂, welche den *second messenger*

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Reticulums (ER) und bewirkt die Ausschüttung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher. Der rasche Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert TRPM5, wodurch es zum Einstrom von Na⁺-Ionen und zur Depolarisation der Zelle kommt. Letztere ermöglicht die Sekretion von ATP über Pannexin-Kanäle, welches anschließend an purinerge Rezeptoren afferenter Neuronen bindet (Liu und Liman, 2003; Zhang *et al.*, 2003a).

Neben seiner Bedeutung in der Wahrnehmung dieser Geschmacksrichtungen konnte TRPM5 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen außerdem eine entscheidende Rolle in der Regulation der Insulinsekretion zugeschrieben werden (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Dabei beobachteten beide Gruppen eine beeinträchtigte Freisetzung von Insulin und eine damit einhergehende Glucoseintoleranz in *Trpm5*^{-/-}-Mäusen, nachdem diese mit Glucose stimuliert worden waren. Dieses Defizit lag insbesondere in einer reduzierten Frequenz der Membranpotential- und Ca²⁺-Oszillationen der β -Zellen begründet. Typischerweise weisen β -Zellen nach Glucose-Stimulation ein Muster von schnellen, langsamen und gemischten Oszillationen des Membranpotentials und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf. Insbesondere schnelle Ca²⁺-Oszillationen konnten dabei im Vergleich zu langsamen Oszillationen mit einer effizienteren Exocytose von Insulin in Zusammenhang gebracht werden. Da der *Knockout* von *TRPM5* zu einem Verlust der schnellen Membranpotential- und Ca²⁺-Oszillationen führte, war als Folge daher eine Reduktion der Glucose-induzierten Insulinsekretion zu beobachten (Colsoul *et al.*, 2010). Die Verknüpfung von Glucosestimulus und Insulinsekretion *via* TRPM5 war dabei folgendermaßen erklärbar: Verstoffwechselt die β -Zelle wenig Glucose, so bleibt die Energiebilanz der Zelle entsprechend niedrig. Das führt dazu, dass das Verhältnis von ATP zu ADP zu Gunsten des ADPs ausfällt, weshalb ATP-abhängige Kalium (K_{ATP}-)Kanäle geöffnet bleiben und kontinuierlich K⁺-Ionen aus der Zelle transportiert werden. Dadurch verbleibt die Zelle im Ruhepotential und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (engl. *voltage-dependent calcium channels*, VDCCs) bleiben geschlossen, wodurch Insulin

in der Zelle verbleibt. Steigt nun die glykolytische Rate in der Zelle, so ändert sich das Verhältnis von ATP zu ADP zu Gunsten des ATPs, was zum Schließen der K_{ATP} -Kanäle und somit einer initialen Depolarisation der Zelle führt. Dies verursacht eine initiale Öffnung der VDCCs, weshalb es zum Einstrom von Ca^{2+} und zu einer initialen Sekretion von Insulin kommt. Diese Depolarisation alleine reicht jedoch nicht aus, um die VDCCs optimal zu öffnen, und erklärt auch nicht die Menge an Insulin, die man letztlich nach einem solchen Stimulus beobachtet. Durch die Arbeiten von Brixel und Mitarbeitern konnte TRPM5 als weitere depolarisierende Komponente in β -Zellen und daher als Feinregulator der Insulinausschüttung identifiziert werden (Abbildung 1.3). Dabei erfolgt die Aktivierung des Ionenkanals aufgrund des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs, dem neben dem initialen Ca^{2+} -Einstrom über die VDCCs noch ein weiterer Mechanismus zu Grunde liegt: Infolge des in der Zelle vermehrt zur Verfügung stehenden ATPs fallen mehr Stoffwechselprodukte an, welche die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher begünstigen. Auf diese Weise wird TRPM5 sowohl durch den Ca^{2+} -Einstrom als auch durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert, woraufhin der Kanal Na^+ -Ionen in die Zelle transportiert und somit das ursprüngliche Depolarisationssignal verstärkt. Dies verursacht letztlich eine optimale Öffnung der VDCCs, was eine optimale und effiziente Sekretion von Insulin zur Folge hat. Neben seiner entscheidenden Mitwirkung als depolarisierender Faktor scheint TRPM5 zusätzlich eine direkte Rolle im Fusionsprozess der Vesikel mit der Zellmembran zu spielen (Brixel *et al.*, 2010).

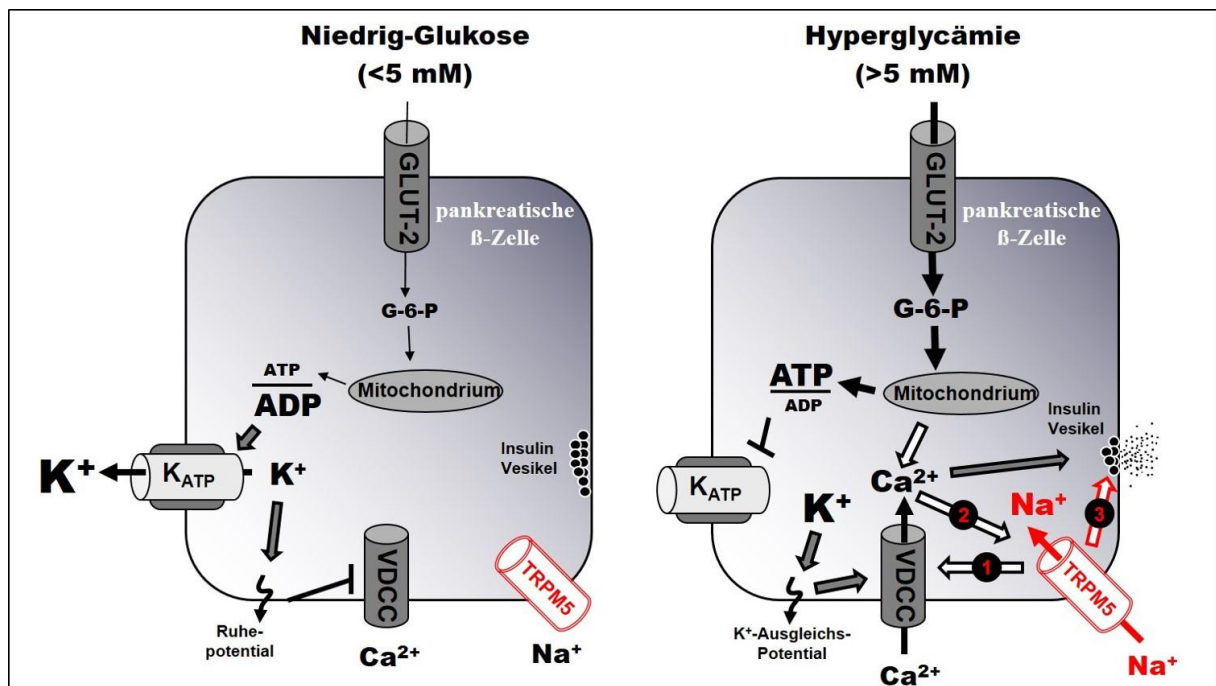


Abbildung 1.3 Feinregulation der Insulinsekretion in β -pankreatischen Zellen durch TRPM5.

Dargestellt ist der physiologische Zustand einer β -pankreatischen Zelle im hypoglycämischen (links) bzw. hyperglycämischen (rechts) Milieu. Im hypoglycämischen Milieu produziert die Zelle entsprechend wenig ATP, wodurch K_{ATP}-Kanäle geöffnet bleiben. Die Zelle verbleibt im Ruhepotential und es wird kein Insulin ausgeschüttet. Kommt es nun zu einem erhöhten Glukose-Stoffwechsel aufgrund eines hyperglycämischen Milieus, wird die Energiebilanz der Zelle gesteigert, was zum Schließen der K_{ATP}-abhängigen Kanäle führt. Das verursacht eine initiale Depolarisation der Zelle, welche VDCCs öffnet und eine initiale Sekretion von Insulin begünstigt. Durch diese initiale Öffnung der VDCCs kommt es außerdem zur Aktivierung von TRPM5, woraufhin der Kanal Na⁺-Ionen in die Zelle transportiert und das Depolarisationssignal der Zelle verstärkt. Dies löst eine optimale Öffnung der VDCCs aus, sodass ein effizienter Ca²⁺-Einstrom in die Zelle erfolgt, was in einer auf den Glukosestimulus adäquaten Insulinsekretion resultiert. Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wird zusätzlich durch Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher erhöht. Neben seiner Rolle als depolarisierender Faktor scheint TRPM5 außerdem direkt in den Fusionsprozess der Vesikel mit der Zellmembran involviert zu sein. (ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; G-6-P: Glukose-6-Phosphat; GLUT2: Glukosetransporter Typ 2; VDCC: spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanal). Verändert nach: Brixel *et al.*, 2010.

Aufgrund seiner Implikation in der Regulation der Insulinsekretion wurde eine pathogene Veränderung des Ionenkanals als mögliche Ursache für Hyperinsulinismus oder Diabetes Typ 2 postuliert (Brixel *et al.*, 2010). Tatsächlich konnten genetische Variationen des *TRPM5*-Locus mit einem prädiabetischem Phänotyp assoziiert werden, welcher mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes vom Typ 2 einhergeht (Ketterer *et al.*, 2011).

Eine weitere Funktion von TRPM5 konnte vor wenigen Jahren in den Becherzellen des Colons aufgedeckt werden. Auch hier ist der Kanal in die Sekretion eines Proteins involviert. Dabei nutzte die Arbeitsgruppe humane Colonkarzinom-Zellen, welche

unter Hungerkultur zu Becherzellen differenzieren und daraufhin vermehrt das Mucin MUC5AC produzieren (Mitrovic *et al.*, 2013). Dieses Protein stellt einen Hauptbestandteil des Mucus in den Atemwegen und im Gastrointestinaltrakt dar. Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt durch Bindung von ATP bzw. Acetylcholin an purinerge bzw. muskarinerge Rezeptoren, was die Produktion von DAG und IP₃ sowie die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Folge hat. Dies führt zur Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher mit subsequenter Mucin-Sekretion (Bou-Hanna *et al.*, 1994; Abdullah *et al.*, 1996; Abdullah *et al.*, 1997; Bertrand *et al.*, 2004; Ehre *et al.*, 2007). Der Arbeitsgruppe um Mitrovic gelang es, den Sekretionsmechanismus und seine Komponenten detaillierter zu skizzieren (Mitrovic *et al.*, 2013). Dabei konnte die Involvierung von TRPM5 in die MUC5AC-Sekretion nachgewiesen werden, da die Herunterregulation des *TRPM5*-Gens zu einer reduzierten Ausschüttung von MUC5AC führte. Zusätzlich konnten sie die Expression und membranöse Lokalisation von TRPM5 in der verwendeten Zelllinie nachweisen. *Whole-cell patch-clamp* Experimente bestätigten die Aktivität des Ionenkanals in Anwesenheit von Ca²⁺. Um die physiologische Funktion von TRPM5 in diesen Zellen besser untersuchen zu können, generierten sie eine stabil transfizierte Zelllinie, die sich durch Depletion von *TRPM5* auszeichnete. Stimulation mit ATP, welches ein physiologisches Sekretagogum des Mucins darstellt, zeigte eine Reduktion der ATP-induzierten MUC5AC-Sekretion in *TRPM5*-depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem kam es zu einer verringerten Ca²⁺-Akkumulation im Cytoplasma, was die Vermutung einer den Ca²⁺-Einstrom modifizierenden Rolle von TRPM5 bestätigte. Ferner zeigten diese Ergebnisse, dass die Kopplung des Na⁺-Einstroms über TRPM5 und die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration über einen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (engl. *Na⁺/Ca²⁺ exchanger*, NCX) erfolgt. Dieser transportiert bei hoher intrazellulärer Na⁺-Konzentration Ca²⁺-Ionen im Antiport in die Zelle. Diese Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration scheint letztlich zur Förderung der MUC5AC-Sekretion beizutragen. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe eine Rolle von TRPM5 in der durch das DAG-Mimetikum Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induzierten MUC5AC-Sekretion beobachten. Abbildung 1.4 fasst die Erkenntnisse von Mitrovic und Mitarbeitern in Kombination mit bereits bekannten Komponenten als möglichen

Signalweg graphisch zusammen.

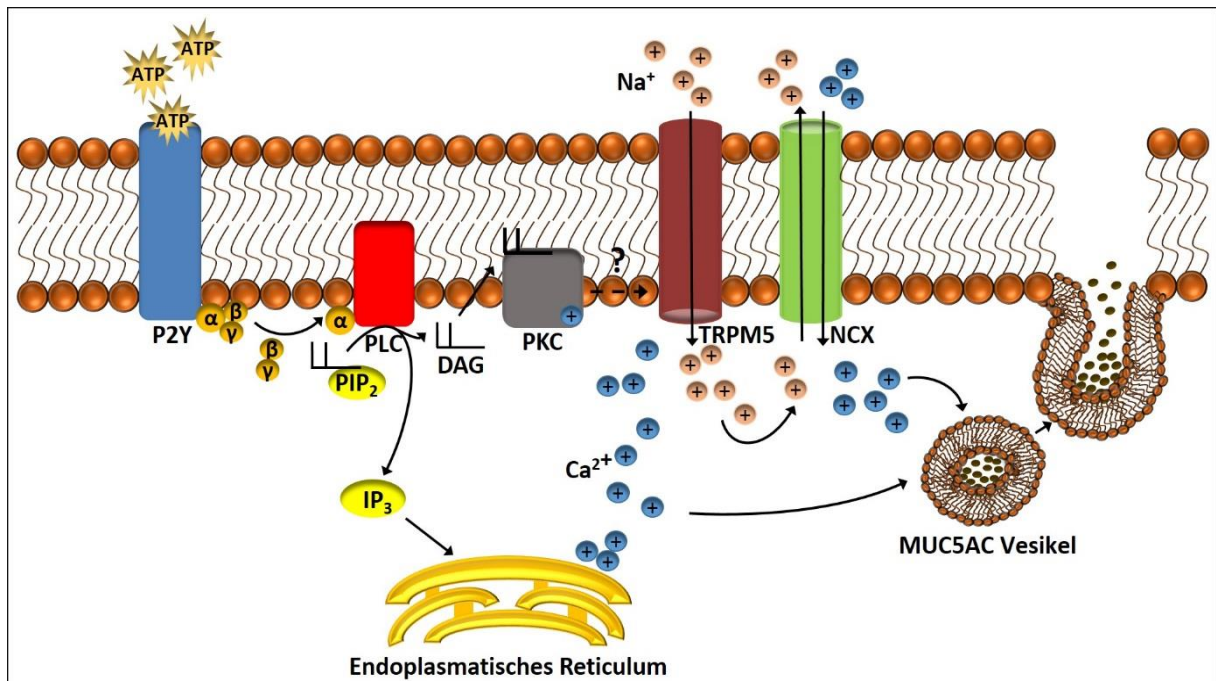


Abbildung 1.4 Rolle von TRPM5 im Sekretionsmechanismus von MUC5AC in den Becherzellen des Colons.

Bekannterweise löst die Bindung von ATP an den purinergen GPCR-Rezeptor P2Y die Aktivierung und subsequenten Zerfall des G-Proteins aus. Die α -Untereinheit aktiviert das Enzym PLC, welches die Hydrolyse von PIP₂ in DAG und IP₃ katalysiert. IP₃ bewirkt durch die Bindung an IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum die Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher. DAG und Ca²⁺-Ionen führen parallel zur Aktivierung des Enzyms PKC. Dieser Schritt sowie die rasche Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sind für eine adäquate Mucin-Sekretion unabdingbar. Mitrovic und Mitarbeiter konnten belegen, dass diese Schritte eine Aktivierung von TRPM5 bewirken. Wie genau PKC und TRPM5 dabei in Verbindung stehen, ist jedoch unklar. Durch seine Aktivierung transportiert der Kanal Na⁺-Ionen in das Zellinnere, welche von dem Kanal NCX im Antiport mit Ca²⁺-Ionen aus der Zelle transportiert werden. Dies führt zum Einstrom extrazellulärer Ca²⁺-Ionen, welcher die konsequente Sekretion von MUC5AC gewährleistet. (ATP: Adenosintriphosphat; DAG: Diacylglycerin; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; NCX: Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; P2Y: P2-Nukleotidrezeptor).

Neben der funktionellen Charakterisierung von TRPM5 in Zunge, Pankreas und Colon ist über die physiologische Funktion des Ionenkanals in anderen Geweben bislang nur wenig bekannt. Daher sollte die vorliegende Dissertation einem besseren Verständnis bezüglich der physiologischen Relevanz von TRPM5 dienen. Neben einer sehr starken *TRPM5*-Expression in Leber, Dünndarm und Lunge fiel in den publizierten Expressionsdaten eine ausnahmslose Expression in allen Drüsengeweben mit meist starker Intensität auf (Abbildung 1.5).

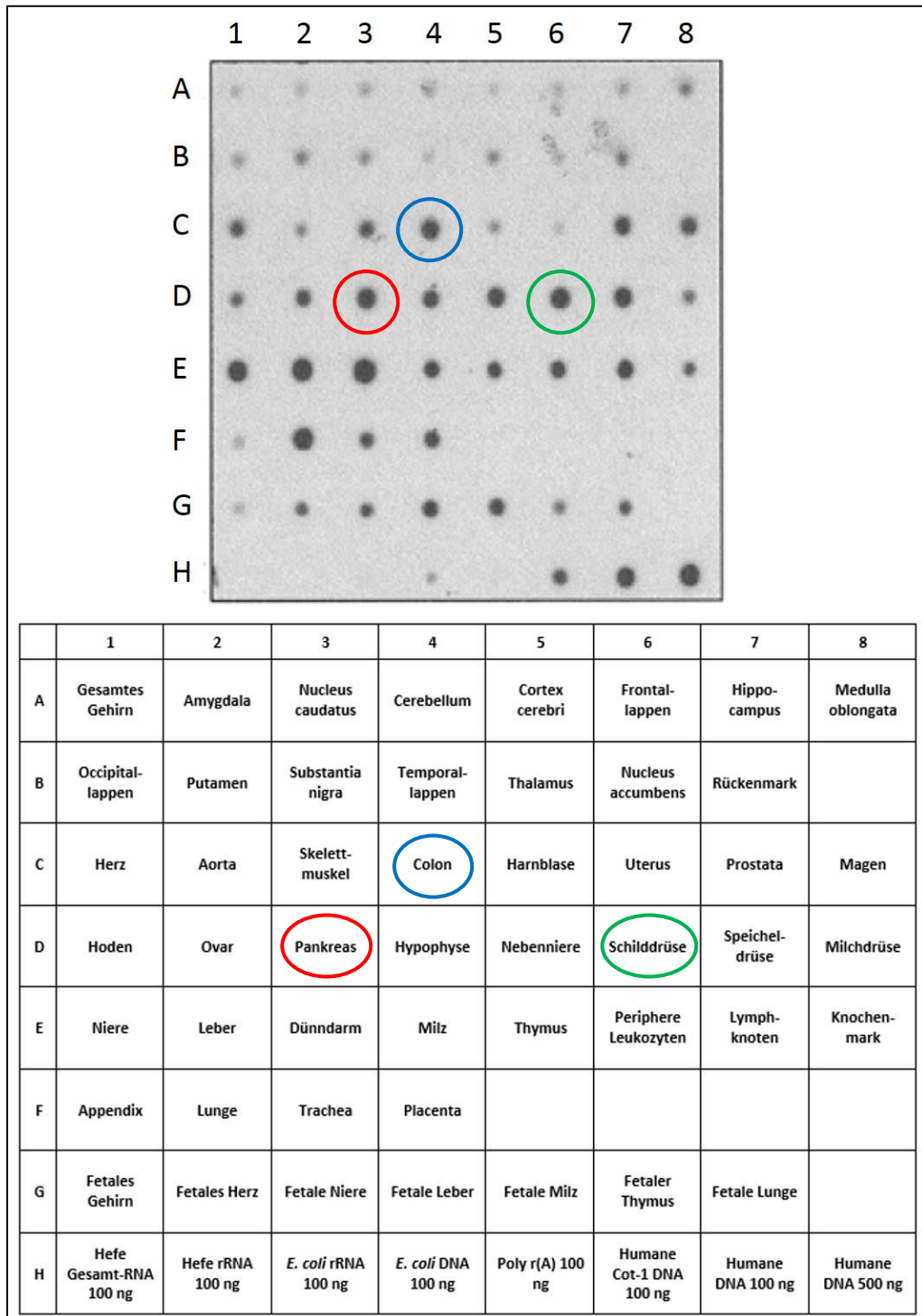


Abbildung 1.5 Dot Northern Blot Expressionsanalysen in humanen Geweben bezüglich TRPM5.

Publizierte *Dot Northern Blot* Hybridisierungen in verschiedenen humanen Geweben wiesen u. a. starke Hybridisierungssignale in den Drüsengeweben auf (Reihe D). Pankreas (rot umrahmt), Colon (blau umrahmt) und Schilddrüse (grün umrahmt) zeigten zudem vergleichbare Expressionsstärken. Verändert nach: Prawitt *et al.*, 2000.

U. a. zeigte sich dort eine dem Pankreas vergleichbare Expression in der Schilddrüse, die zudem ein dem Colon vergleichsweise ähnlich starkes Signal aufwies (Prawitt *et al.*, 2000). Da für Pankreas und Colon die Rolle von TRPM5 wie oben beschrieben bereits sehr genau erfasst werden konnte, war eine physiologische Funktion des Ionenkanals daher in der Schilddrüse denkbar. Ausgangspunkt dieser Arbeit war deshalb die Überprüfung einer in der Schilddrüse möglichen Funktion.

Die Schilddrüse stellt das größte endokrine Organ beim Menschen dar. Sie ist unterhalb des Kehlkopfes ventral der Trachea lokalisiert und umfasst zwei Lappen, *Lobus dexter* und *Lobus sinister*, welche über den *Isthmus* miteinander verbunden sind. Dorsal jeden Lappens befinden sich jeweils paarweise zwei der Nebenschilddrüsen. Bindegewebssepten strukturieren diese Lappen in kleinere Läppchen, welche sich aus zahlreichen, histologisch auffälligen Follikeln zusammensetzen (Wartofsky und Van Nostrand, 2006; Wenig, 2016). Jedes dieser Follikel besteht aus einem inneren Hohlraum, der von einem einschichtigen Epithel umgeben ist. Er wird durch eine zähe Sekretmasse gefüllt, die als Kolloid bezeichnet wird. Dieses besteht vor allem aus dem Vorläuferprotein der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4), dem Thyreoglobulin (TG), und den Schilddrüsenhormonen T3 und T4 selbst. Alle drei Moleküle werden von den Follikelepithelzellen, auch Thyreozyten genannt, synthetisiert und bis zur Verwendung im Lumen der Follikel gespeichert. Zwischen den Thyreozyten befinden sich die in nur geringer Anzahl vorhandenen parafollikulären Zellen, auch C-Zellen genannt. Sie machen nur bis zu 0,1% der Schilddrüse aus. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Synthese und Sekretion des Hormons Calcitonin, welches für die Calcium-Homöostase im Körper verantwortlich ist (Wartofsky und Van Nostrand, 2006; Schmid, 2015; Wenig, 2016). Abbildung 1.6 stellt die histologischen Merkmale schematisch dar.

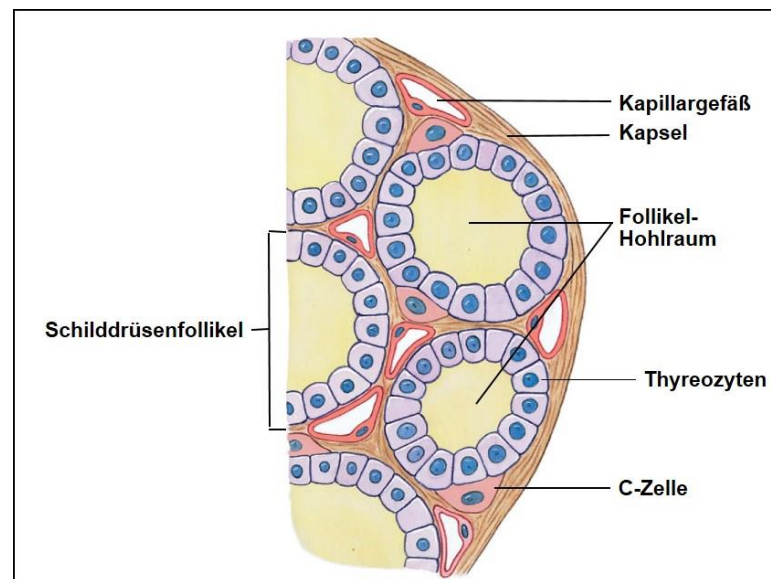


Abbildung 1.6 Histologie der Schilddrüse.

Schematisch dargestellt ist der histologische Querschnitt durch die Schilddrüse. Ein besonderes Merkmal stellen die kugelförmigen Follikel dar, die durch einen Hohlraum und angrenzende Thyreozyten gekennzeichnet sind. Neben diesen in großer Zahl vorkommenden Zellen sind außerdem die selteneren C-Zellen zu finden. Umschlossen wird die Schilddrüse von einer Bindegewebskapsel. Verändert nach: Fundamentals of Anatomy & Physiology, 9. Auflage, Pearson Education, Inc. 2012; Abgedruckt mit Erlaubnis von Pearson Education, Inc., New York, New York.

Die Hauptaufgabe der Schilddrüse besteht in der Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 durch die Thyreozyten, was durch den thyreotropen Regelkreis streng reguliert wird. Dieses *Feedback* System registriert über Rezeptoren im Hypothalamus die Plasmakonzentration der beiden Hormone fT3 und fT4. Dabei handelt es sich um die freie, ungebundene Form von T3 und T4. Da diese Hormone hydrophobe Moleküle darstellen, erfolgt ihr Transport im Blut zum Zielort überwiegend über Plasmatransportproteine, v. a. Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), aber auch Transthyretin und Albumin, und nur ein sehr geringer Anteil des zirkulierenden Hormons liegt als ungebundenes Hormon vor. Lediglich 0,02% des Gesamt-T4 und 0,3% des Gesamt-T3 stehen aufgrund gesättigter Transportproteine als fT4 bzw. fT3 im Serum zur Verfügung. Dies ermöglicht eine kontrollierte Aktivität des Hormons ausschließlich am Zielort, da lediglich ungebundenes Hormon seine aktive Wirkung entfalten kann. Wegen der erhöhten Bindungsaffinität von T4 zu TBG liegt das Hormon in der Zirkulation dabei deutlich höher konzentriert vor als T3. Effektorhormon in den Zielzellen stellt fT3 dar, das zum größten Teil durch Deiodierung von fT4 mittels

Thyroxindeiodinasen unmittelbar in den Zielzellen gewonnen wird (Williams, 2008). Dies gewährleistet zusätzlich eine ortsspezifische Hormonwirkung. Sinkt die Plasmakonzentration von fT3 und fT4 nun unter einen Sollwert, wird im Hypothalamus die Synthese und Freisetzung des Hormons Thyreoliberin (Thyreotropin Releasing Hormon, TRH) initialisiert (Segerson *et al.*, 1987; Abel *et al.*, 2001). TRH bindet in der Hypophyse an den TRH-Rezeptor (TRHR) und stimuliert dort die Produktion und Sekretion von Thyreotropin (Thyreoida-stimulierendes Hormon, TSH) (Harris *et al.*, 1978; Carr *et al.*, 1989; Steinfeld *et al.*, 1991). Dieses Hormon gelangt über die Blutbahn zur Schilddrüse und fördert dort durch Bindung an den TSH-Rezeptor (TSHR) die Synthese und Freisetzung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 (Pastan *et al.*, 1966; Parmentier *et al.*, 1989; Ikegami *et al.*, 2014). Über den Blutkreislauf erreichen diese ihre Wirkorte im Körper, über welche sie zahlreiche Effekte ausüben. Dabei stimulieren die beiden Hormone sowohl den Metabolismus als auch das kardiovaskuläre System, und sind für die geistige Entwicklung unabdinglich (Williams, 2008; Brent, 2012). Außerdem hemmt das Überschreiten der Sollwertkonzentration über den negativen *Feedback Loop* die weitere Produktion und Sekretion von TRH und TSH (Shupnik *et al.*, 1985; Segerson *et al.*, 1987, Maruta und Greer, 1988; Rondeel *et al.*, 1992). Abbildung 1.7 hebt den beschriebenen Regelkreis graphisch hervor.

Gerät der thyreotrope Regelkreis an einer der Stationen außer Kontrolle, kann dies in einer Über- bzw. Unterfunktion der Schilddrüse und letztlich einer Hyper- bzw. Hypothyreose resultieren. Ein prominentes Beispiel für die Hyperthyreose stellt die Autoimmunerkrankung des *Morbus Basedow* (*M. Basedow*) dar. Dabei richten sich Antikörper dauerhaft gegen den TSHR der Schilddrüse und stimulieren auf diese Weise die Sekretion von T3 und T4. Aufgrund des *Feedback Systems* führt dies zu einer Herunterregulation von TSH und als Folge zu einem chronischen Überschuss der beiden Schilddrüsenhormone. Häufige Begleitsymptome sind Strumabildung und ein- oder beidseitiger Exophthalmus des Augapfels (Shimojo *et al.*, 1996; Kita *et al.*, 1999). Als Therapiemaßnahmen dienen Gabe von Thyreostatika und partielle bis vollständige Thyreoidektomie (Allelein *et al.*, 2017).

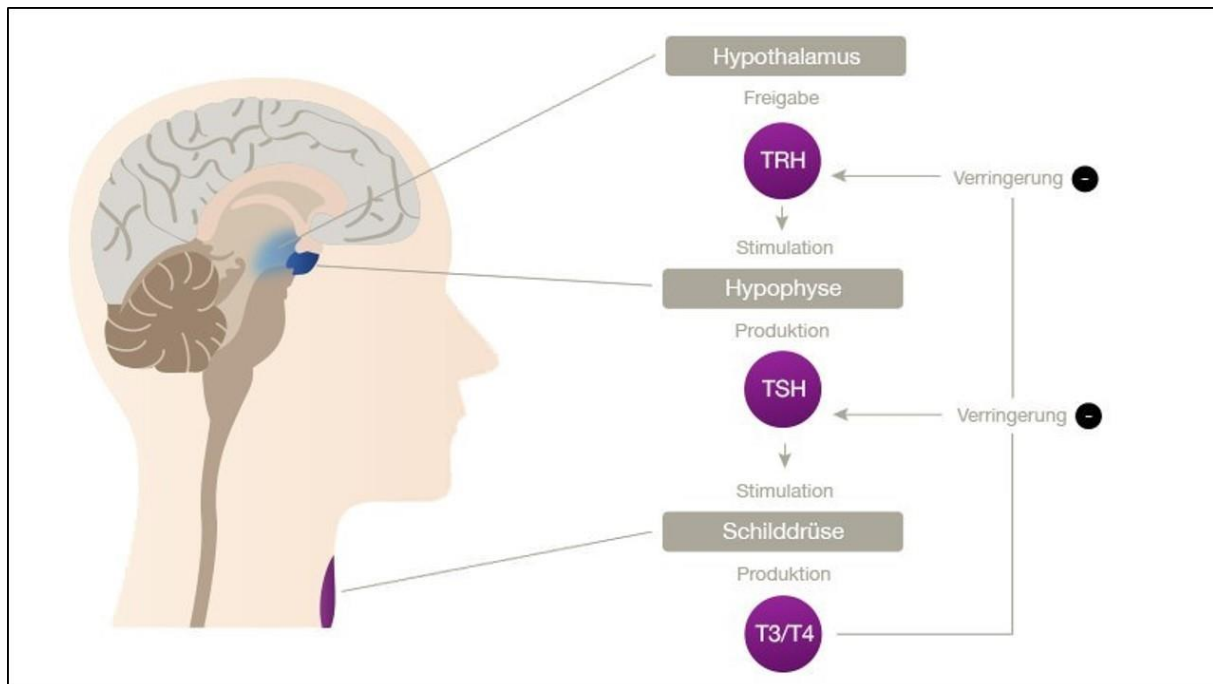


Abbildung 1.7 Thyreotroper Regelkreis zwischen Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse.

Dargestellt ist das *Feedback* System zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse. Vom Hypothalamus wird das Hormon TRH synthetisiert und sezerniert, welches in der Hypophyse die Produktion und Freisetzung von TSH stimuliert. Letzteres gelangt über das Blut zur Schilddrüse und stimuliert dort wiederum die Produktion und Sekretion der beiden Schilddrüsenhormone T3 und T4. Diese hemmen über einen negativen *Feedback Loop* die weitere Synthese und Freisetzung von TRH und TSH. Verändert nach: <http://www.schilddruesenkrebs.de/schilddruese/hormonregler-tsh/>.

Hypothyreosen werden meist durch Jodmangel ausgelöst und können durch eine Jodtherapie in der Regel erfolgreich behandelt werden (Niwattisaiwong *et al.*, 2017). Seltener manifestiert sich als Ursache hierfür die Autoimmunerkrankung einer Hashimoto-Thyreoditis (Allelein *et al.*, 2017). Die molekulare Ursache dieser Erkrankung ist bislang nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die Autoimmunität T-Zell-vermittelt wird und initial zu einer Hyperthyreose führt, die in eine chronische Hypothyreose übergeht. Diese ist in der autoimmunen Zerstörung des Schilddrüsengewebes bis hin zur Atrophie begründet. Zusätzlich liegen typischerweise Antikörper gegen das Schilddrüsen-spezifische Enzym Thyreoperoxidase (TPO) vor, welches in die Synthese der beiden Schilddrüsenhormone T3 und T4 involviert ist. Als Standardtherapie der Hashimoto-Thyreoditis wird aufgrund der resultierenden Hypothyreose eine Substitution der Schilddrüsenhormone vorgenommen, mit deren Hilfe die Erkrankung in der Regel gut behandelt werden kann (Allelein *et al.*, 2017).

Neben der Synthese und Freisetzung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 kommt der Schilddrüse außerdem eine Bedeutung in der Ca^{2+} -Homöostase zu. Verantwortlich hierfür sind die C-Zellen des Organs, die auf einen erhöhten Blutcalciumspiegel mit der Sekretion des Hormons Calcitonin reagieren (Copp *et al.*, 1962, Foster *et al.*, 1964; Pearse 1966). Calcitonin bewirkt die Ablagerung von Ca^{2+} -Ionen in die Knochen und hemmt parallel die Reabsorption dieser Ionen in Niere und Darm, was zur Senkung des Calciumspiegels im Blut führt (Warshawsky *et al.*, 1980; Matsui *et al.*, 1983). Sein Gegenspieler ist das Parathormon (PTH). Es wird von den Nebenschilddrüsen synthetisiert und freigesetzt, wenn der Calciumspiegel im Blut unter einen Sollwert sinkt (Patt und Luckhardt, 1942). Die Anhebung des Spiegels erreicht PTH durch entgegengesetzte Wirkung zu Calcitonin (Chase und Aurbach, 1967; Kleeman *et al.*, 1971). Die homöostatische Wechselwirkung der beiden Hormone ist in Abbildung 1.8 zusammengefasst.

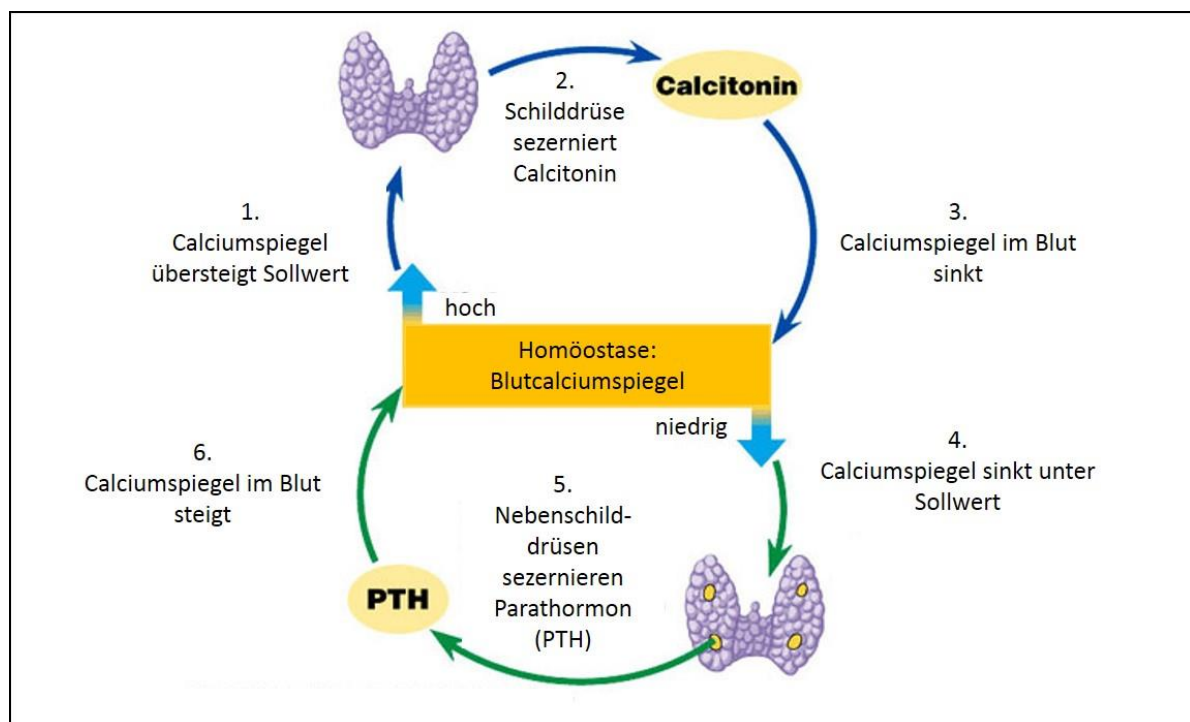


Abbildung 1.8 Regulation der Ca^{2+} -Homöostase durch die Hormone Calcitonin und Parathormon.

Die beiden Hormone Calcitonin und Parathormon unterstützen wechselseitig das Gleichgewicht des Blutcalciumspiegels. Bei erhöhtem Calciumspiegel schütten die C-Zellen der Schilddrüse Calcitonin aus, woraufhin der Calciumspiegel im Blut sinkt. Unterschreitet er einen Sollwert, so steuert das von den Nebenschilddrüsen sezernierte Parathormon dagegen. Verändert nach: Biology, 5. Auflage, Benjamin Cummings 1999; Abgedruckt mit Erlaubnis von Pearson Education, Inc., New York, New York.

Zusätzlich besitzt das Hormon größere Bedeutung in der Diagnostik, da Calcitonin als Tumormarker für das medulläre Schilddrüsenkarzinom (engl. *medullary thyroid cancer*, MTC) dient. Dieses Karzinom entwickelt sich aus den C-Zellen der Schilddrüse und geht charakteristischerweise mit erhöhten Konzentrationen an Calcitonin einher (Bae *et al.*, 2015; Schmid, 2015). Die Mehrzahl dieser Tumore entwickelt sich sporadisch. 20 – 30% von ihnen gehen jedoch auf eine Keimbahnmutation des Protoonkogens *RET* zurück, welches für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert (Schmid, 2015).

1.1 Zielsetzung

Die für *TRPM5* publizierten Expressionsdaten zeigten eine auffällige Expressionsstärke in Drüsengeweben (Prawitt *et al.*, 2000). Eine funktionelle Rolle für den Ionenkanal konnte bereits in β -pankreatischen Zellen nachgewiesen werden (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Es zeigte sich, dass TRPM5 in diesen Drüsen für eine adäquate Insulinsekretion notwendig ist und eine Feinregulation der Hormonsekretion ermöglicht. Eine dem Pankreas vergleichbare Expression zeigten die publizierten *Dot Northern Blot* Analysen von Prawitt und Mitarbeitern in der Schilddrüse (Prawitt *et al.*, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob TRPM5 in diesem Gewebe eine ähnliche funktionelle Rolle übernimmt. Da die Schilddrüse aus zwei unterschiedlichen Zelltypen besteht, die für die Sekretion von Hormonen verantwortlich sind, kamen beide prinzipiell für weitere Untersuchungen in Frage.

Um die mögliche Rolle von TRPM5 in den Thyreozyten zu klären, sollte mit verschiedenen Systemen gearbeitet werden. Hierfür stand zum einen die von Zhang und Mitarbeitern generierte *Knockout* Maus zur Verfügung (Zhang *et al.*, 2003a). Serumproben dieser Tiere sollten Alters- und Geschlechts-abgestimmt mit Serumproben von Wildtyptieren mit identischem genetischem Hintergrund bezüglich ihrer fT4-Konzentration untersucht werden. Dies sollte Rückschlüsse auf das Sekretionsverhalten der Thyreozyten zulassen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollten durch *in vitro* Analysen gestützt werden. Dazu sollte eine geeignete Zelllinie gefunden werden, welche voraussetzend den *TSHR* exprimiert und Stimulierbarkeit durch TSH zeigte. Zusätzlich sollte die Expression des *TRPM5*-Gens vor weiteren

Analysen nachgewiesen werden. Bei positiven Befunden sollte *TRPM5* stabil in diese Zellen eingebracht und die Schilddrüsenhormonsekretion nach TSH-Stimulation vergleichend zur Kontrolle analysiert werden.

Parallel zu den Untersuchungen zur Rolle von *TRPM5* in den Thyreozyten sollte bei auffälligen Beobachtungen der fT4-Werte in den *Knockout* Mäusen die TSH-Konzentration der identischen Serumproben vergleichend zum Wildtyp bestimmt werden. Dies sollte verifizieren, ob der Ursprung der auffälligen Beobachtungen potentiell auf eine zentrale Funktion des Ionenkanals im thyreotropen Regelkreis in der Hypophyse und damit oberhalb der Schilddrüse zurückzuführen ist. Im zutreffenden Fall sollte eine Zelllinie adenohipophysären Ursprungs gefunden werden, die sich durch Expression von *TRPM5* und Stimulierbarkeit durch TRH auszeichnete. Dort sollte anschließend die funktionelle Rolle des Ionenkanals in der Hypophyse durch Überexpression von *TRPM5* näher untersucht werden. Außerdem sollten Patienten mit auffälligen fT4- und TSH-Werten identifiziert und nach Ausschluss von Kandidatengenen als Ursache für den Defekt bezüglich aller 24 Exons von *TRPM5* sequenziert werden. Dies sollte ermöglichen, einen potentiellen Zusammenhang zwischen einer abnormen Dosis an *TRPM5* und einem zentralen Hormondefekt herzustellen.

Da für eine funktionelle Rolle von *TRPM5* in der Schilddrüse neben den Thyreozyten auch die C-Zellen in Frage kamen, sollten diese bezüglich ihrer Funktion von *TRPM5* ebenfalls untersucht werden. Hierfür sollte zum einen eine Charakterisierung der Funktion des Ionenkanals in einem entsprechenden Zellkultursystem durchgeführt werden. Es galt, eine geeignete Zelllinie parafollikulären Ursprungs zu finden, welche mit Expression von *TRPM5* und Stimulierbarkeit durch Ca^{2+} -Ionen ausgestattet war. Bei Nachweis dieser Eigenschaften sollte das *TRPM5*-Gen in diesen Zellen stabil überexprimiert werden, und die Zellen auf einen möglichen Effekt bezüglich der Calcitonin-Sekretion analysiert werden. Neben dem zellulären System standen Gewebeproben von Patienten zur Verfügung, welche an einem medullären Schilddrüsenkarzinom erkrankt sind. Aus den Proben dieser Patienten sollte RNA gewonnen werden und anschließend die Expression von *TRPM5* quantitativ bestimmt

werden. Diese sollte abschließend auf Korrelation mit der quantifizierten Expression des *Calcitonin*-Gens überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 DNA- und RNA-Standardmethoden

2.1.1 RNA-Isolierung

Um RNA aus eukaryotischen Zelllinien bzw. aus Gewebe zu isolieren, wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* der Fa. PEQLAB verwendet. Dazu wurden die Zellen gewaschen, von ihrem Kulturgefäß abgelöst und auf eine 10 cm Schale entweder für eine Versuchsreihe mit einer bestimmten Zellzahl ausgesät oder so ausplattiert, dass sie zum Tag der Zellyse eine 50 – 80%ige Konfluenz besaßen. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit 800 µl *RNA Lysis Buffer T* bedeckt, mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale abgelöst und anschließend homogenisiert. Zur RNA-Isolierung aus Gewebe wurden ca. 3 mm³ Gewebe unter Anwesenheit von Flüssigstickstoff mit einem Pistill zermörsert und pulverisiert in 800 µl *RNA Lysis Buffer T* aufgenommen und homogenisiert. Nach Homogenisierung der jeweiligen Probe wurde diese zur Entfernung von DNA auf eine *DNA Removing Column* geladen und für 1 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit 1 Volumen 70% Ethanol gemischt und zur Bindung der DNA auf die *PerfectBind RNA Column* geladen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10000 g und RT wurde der Durchfluss verworfen und 500 µl *RNA Wash Buffer I* auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 15 sec bei 10000 g und RT wurde der Durchfluss verworfen und ein DNase I Verdau auf der Säule durchgeführt, um mögliche DNA-Kontaminationen vollständig zu eliminieren. Dazu wurden je 73,5 µl *DNase I Digestion Buffer* mit 1,5 µl RNase-freier DNase I (20 U/ µl) versetzt, und das Gemisch auf die Membran der Säule pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden 400 µl *RNA Wash Buffer I* auf die Säule pipettiert und diese für weitere 5 min bei RT inkubiert. Nachdem für 15 sec bei 10000 g und RT zentrifugiert worden war, wurde der Durchfluss verworfen und die Säule zweimal mit je 600 µl *RNA Wash Buffer II* gewaschen und für 15 sec bei 10000 g und RT zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung von Ethanolrückständen wurde die Säule nach Entfernen des Durchflusses nochmals für 2 min bei 10000 g und RT zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem

H₂O nach einminütiger Inkubation sowie Zentrifugation bei 5000 g und RT eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.2 Reverse Transkription

Um die Expression bestimmter Gene an dem *Real-Time* PCR System *LightCycler480 II* analysieren zu können, war es notwendig, die zuvor isolierte RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde die Reverse Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) der Firmen Invitrogen und New England Biolabs verwendet. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze ist in Tabelle 2.1 angegeben.

Tabelle 2.1 Reaktionsansätze der verwendeten reversen Transkriptasen von Invitrogen bzw. New England Biolabs.

Zusätze	M-MLV Reverse Transkriptase von Invitrogen	M-MLV Reverse Transkriptase von New England Biolabs
RNA	1 – 3 µg	0,5 – 2 µg
RNase-freies H ₂ O	ad 16 µl	ad 10 µl
T ₁₆ –Oligonukleotid (50 µM)	5 µl	2 µl
dNTPs (10 mM)	3,5 µl	4 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	2 µl	1 µl
Puffer	8 µl	2 µl
DDT (0,1 M)	4 µl	-
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,5 µl	1 µl
Gesamtvolumen/ Reaktionsansatz	40 µl	20 µl

Bei Verwendung der Reversen Transkriptase von Invitrogen wurden 1 – 3 µg der isolierten RNA mit RNase-freiem H₂O auf 16 µl aufgefüllt und im *Thermocycler* denaturiert (siehe Tabelle 2.2). Danach wurden die restlichen Zusätze zugegeben und

mit dem zweiten Programmschritt der cDNA-Synthese fortgefahren. Wurde die Reverse Transkriptase von New England Biolabs verwendet, so wurden 0,5 – 2 µg RNA mit RNase-freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt, T₁₆-Oligonukleotid und dNTPs zugegeben, bevor die Denaturierung im *Thermocycler* erfolgte. Anschließend wurden die weiteren Zusätze hinzugefügt und ebenfalls mit dem zweiten Programmschritt der cDNA-Synthese fortgefahren.

Tabelle 2.2 *Thermocycler*-Programme für die cDNA-Synthese mit M-MLV Reversen Transkriptasen von Invitrogen bzw. New England Biolabs.

Programmschritt	Reverse Transkriptase von Invitrogen		Reverse Transkriptase von New England Biolabs	
	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]
[1] Denaturierung der RNA	70	10	80	5
[2] cDNA-Synthese	37	90	42	60
[3] Enzyminaktivierung	90	10	90	10
[4] Kühlung	4	∞	4	∞

Um in den anschließenden Expressionsanalysen den DNA-Kontaminationsstatus der jeweiligen RNA-Probe kontrollieren zu können, wurde außerdem eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase durchgeführt.

2.1.3 DNA-Isolierung

Bakterielle Plasmid-DNA wurde je nach zu isolierender Menge mit Hilfe der Kits *NucleoSpin Plasmid Kit* der Fa. Macherey-Nagel bzw. *Endofree Plasmid Maxi Kit* der Fa. QIAGEN isoliert. Ersteres besaß eine geringere DNA-Bindekapazität von bis zu 60 µg pro Säule, während bei Letzterem bis zu 500 µg Plasmid-DNA Endotoxin-frei isoliert werden konnten.

Zur Durchführung des *NucleoSpin Plasmid Kits* wurden je 50 µl Bakterienvorkultur in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und ÜN bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung nach Herstellerangaben: Am darauffolgenden Tag wurde die Bakteriensuspension für 30 sec bei 11000 g und RT herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl A1 Puffer resuspendiert, bevor 250 µl A2 Puffer hinzugegeben wurden. Nach

Invertieren und 5 min Inkubation bei RT sowie Blauumschlag des Lysats wurden 300 µl A3 Puffer hinzugefügt und durch Invertieren bis Einkehren vollständiger Farblosigkeit gemischt. Nachdem das Lysat für 5 min bei 11000 g und RT zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine *NucleoSpin Plasmid* Säule geladen und die DNA durch einminütiges zentrifugieren bei 11000 g und RT gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl AW Puffer gewaschen. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 11000 g und RT wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit 600 µl A4 Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 11000 g und RT zentrifugiert. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die Säule nach Entfernung des Durchflusses nochmals für 2 min bei 11000 g und RT zentrifugiert. Nachdem 50 µl AE Puffer auf die Membran der Säule gegeben worden waren, wurde für 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 11000 g und RT eluiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Für die Isolierung größerer DNA-Mengen mit dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* wurden 5 ml Bakterienvorkultur in 300 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und ÜN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 15 min bei 6000 g und 4°C herunterzentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von P2 Puffer wurde durch Invertieren sorgfältig gemischt und für 5 min bei RT bis zum vollständigen Blauumschlag inkubiert. Dem Lysat wurden 10 ml des vorgekühlten P3 Puffers zugegeben und durch Invertieren bis zur vollständigen Farblosigkeit gemischt. Das Gemisch wurde auf eine an der Unterseite verschlossene *QIAfilter Cartridge* gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Ventil der *QIAfilter Cartridge* an der Unterseite geöffnet und das Lysat mit Hilfe eines Kolbens proteinfrei in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,5 ml ER Puffer und mehrfachem Invertieren folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Während dieser Inkubationszeit erfolgte die Kalibrierung der *QIAGEN-tip* durch Beladung mit 10 ml QBT Puffer. Nach Durchfluss des Puffers und Ende der Inkubationszeit wurde das Lysat auf die *QIAGEN-tip* geladen und die Plasmid-DNA durch Durchfluss des Lysats an die Säule gebunden. Danach wurde diese zweimal mit je 30 ml QC Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QN Puffer in ein Zentrifugationsröhrchen eluiert.

Abschließend wurde die eluierte DNA mittels Isopropanol gefällt: Zur eluierten DNA wurden 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch für 30 min bei 15000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Es folgte ein zehninütiger Zentrifugationsschritt bei 15000 g und RT und anschließende Entfernung des Überstands. Nach 5 – 10 min Lufttrocknen des DNA-Pellets wurde dieses je nach Größe in 200 – 300 µl TE Puffer bei 4°C ÜN gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit von isolierten Nukleinsäuren zu bestimmen, wurden diese am Spectrophotometer Nanodrop 1000 der Fa. Thermo Fisher Scientific gemessen. Dazu wurde das Gerät zu Beginn jeder Messung mit 1,5 µl H₂O bidest. kalibriert. Nachdem mit 1,5 µl des jeweiligen Lösungsmittels der *Blank* bestimmt worden war, wurden 1,5 µl der zu messenden Probe auf den Messarm des Nanodrops gegeben. Neben der Nukleinsäurekonzentration konnte anhand der gemessenen 260/230- bzw. 260/280-Werte außerdem die Verunreinigung mit Lösungsmitteln bzw. Proteinen bestimmt werden: Bei reinen Nukleinsäuren sollte der 260/230-Wert zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Der 260/280-Wert dagegen liegt für reine DNA bzw. RNA bei ca. 1,8 bzw. 2,0.

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Sie werden dafür auf ein Agarosegel aufgetragen, welches sich in einer ionischen Pufferlösung befindet. Zur Visualisierung der einzelnen Banden findet abschließend eine Färbung mit Ethidiumbromid statt, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Abhängigkeit der aufzutrennenden Fragmentgrößen 0,8 – 2%ige Agarosegele verwendet, die nach Beladung in horizontalen Gelkammern aufgetrennt wurden. Als Puffer diente hierbei 1x TBE. Um ein Entweichen der aufgetragenen Proben zu verhindern, wurden diese mit 1/6 des Ladepuffers *Orange Dye* beschwert. Zum Größenvergleich wurden 3 – 5 µl eines DNA-

Markers aufgetragen. Nachdem die DNA-Moleküle bei 80 – 140 Volt aufgetrennt worden waren, wurde das Agarosegel für 15 – 20 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und nach kurzer Entfärbung im Wasserbad am Geldokumentationssystem visualisiert.

2.1.6 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* der Fa. QIAGEN verwendet. Dazu wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 2.1.5) und die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpell im UV-Licht ausgeschnitten. Diese wurde mit dem dreifachen Volumen des Puffers QG versetzt und für 10 min bei 50°C bis zur vollständigen Gelschmelze inkubiert. Um die Schmelze zu unterstützen wurde das Gemisch während dieser Inkubationszeit alle 2 - 3 min gevortext. Anschließend wurde ein Volumen Isopropanol hinzugefügt, sorgfältig gemischt und die Probe zur Bindung der DNA auf eine *QIAquick* Säule aufgetragen. Nach einem einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und RT wurde der Durchfluss verworfen und die Säule erneut mit 500 µl QG Puffer beladen. Die Säule wurde für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 750 µl PE Puffer wurde erneut für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses wurde die Säule anschließend nochmals für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, um mögliche Ethanolrückstände vollständig zu entfernen. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von 30 µl EB Puffer und nach einminütiger Inkubation sowie Zentrifugation bei 13000 rpm und RT von der Säule eluiert und vorübergehend bei 4°C gelagert.

2.1.7 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen erfolgte neben der Fällung (siehe Kapitel 2.1.8) mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Fa. QIAGEN. Je Probe wurden dazu das fünffache Volumen des PB Puffers hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde das Gemisch auf eine *QIAquick* Säule geladen und die DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm und RT gebunden. Nach

Entfernen des Durchflusses wurde die Säule mit 750 µl PE Puffer gewaschen und für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und die Säule erneut für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, um Ethanolreste vollständig zu entfernen. Abschließend wurden 50 µl EB Puffer auf die Säule gegeben, für 1 min inkubiert und die DNA durch einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm und RT eluiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.8 Fällung von DNA

Neben dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Fa. QIAGEN (siehe Kapitel 2.1.7) wurde DNA nach Enzymreaktionen über die Fällungsmethode aufgereinigt. Dabei wurden je nach Verwendungszweck sowohl die Isopropanolfällung als auch die Ethanolfällung angewandt. Da im Gegensatz zur Ethanolfällung bei der Isopropanolfällung kleinere DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 100 bp verloren gehen, wurde die Isopropanolfällung zur Aufreinigung von PCR-Reaktionen eingesetzt. Dagegen wurde die Ethanolfällung zur Aufreinigung von Sequenzierungsreaktionen verwendet.

Bei der Isopropanolfällung wurde das PCR-Gemisch durch Zugabe von H₂O bidest. auf 100 µl aufgefüllt. Nach Mischen wurde ein Volumen 4 M Ammoniumacetat und zwei Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nach Vortexen wurde das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde erneut für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 10 min bei 54°C und offenem Deckel getrocknet, bevor es abschließend in 10 µl H₂O bidest. gelöst wurde.

Für die Ethanolfällung wurden je 10 µl Sequenzierungsreaktion mit 1 Volumen H₂O bidest. versetzt. Diesem wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumen 100% Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen, danach wurde erneut für 15 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Nachdem das Pellet für 10 min bei 54°C und offenem Deckel getrocknet worden war, wurde es für die Analyse mit dem DNA-Sequenzierer

AbiPrism™ 3130 Genetic Analyzer der Fa. Applied Biosystems in 15 µl deionisiertem Formamid gelöst.

2.1.9 Restriktion von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde DNA ausschließlich zum Zwecke der Linearisierung von Vektorkonstrukten restringiert, um sie anschließend durch Transfektion stabil in eine Zelllinie einzubringen. Hierfür wurden folgende Restriktionsansätze vorbereitet:

- 15 – 53 µg Plasmid
- 40 - 60 U Restriktionsenzym
- 10 µl Puffer *Cut Smart*
- ad 100 µl H₂O bidest.

Die Ansätze inkubierten 3 – 16 h bei 37°C und wurden anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Fa. QIAGEN aufgereinigt (Kapitel 2.1.7) und auf einem Agarosegel analysiert (Kapitel 2.1.5).

2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

In dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente ausschließlich zu Sequenzierungszwecken in den pCR2.1-TOPO Vektor der Fa. Invitrogen eingebracht. Der Vorteil dieses Vektorsystems liegt darin, dass der Vektor linearisiert mit 3'-T Überhängen vorliegt. Da Taq-Polymerasen einen 3'-A Überhang generieren, können PCR-Produkte so auf sehr einfache Weise mit dem Vektor ligiert werden. Diese Reaktion wird durch die an den Vektor gebundene Topoisomerase I katalysiert (Shuman, 1994).

Die Reaktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 3 µl PCR-Produkt
- 1 µl *Salt Solution*
- 1µl pCR2.1 TOPO

- ad 6 µl H₂O Bidest.

Nachdem die Ansätze vorsichtig gemischt worden waren, wurden sie für 30 min bei RT inkubiert und abschließend in den Bakterienstamm DH5α transformiert (siehe Kapitel 2.3.2).

2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente enzymatisch vervielfältigt werden (Saiki *et al.*, 1988). Dazu werden die DNA-Doppelstränge denaturiert, sodass sich synthetisch hergestellte Oligonukleotide an die Zielregion anlagern können. Dieser Schritt wird auch als *Annealing* bezeichnet. Ausgehend von den angelagerten Oligonukleotiden synthetisieren hitzestabile DNA-Polymerasen, in der Regel Taq-Polymerasen aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, komplementäre Stränge. Dies ist die Elongation. Mehrfache Wiederholung von Denaturierung, *Annealing* und Elongation ermöglicht eine exponentielle Amplifikation der Zielregion.

Zur Durchführung der PCR wurden in dieser Arbeit verschiedene Taq-Polymerasen verwendet (siehe Kapitel 2.6.3). Die Reaktionsansätze setzten sich hierfür folgendermaßen zusammen:

- 10 – 200 ng DNA
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 4 µl dNTPs (10 mM)
- 0 - 1,5 µl MgCl₂ (50 mM)
- 1 - 2,5 µl Oligonukleotid *Forward* (10µM)
- 1 - 2,5 µl Oligonukleotid *Reverse* (10µM)
- 1 U Taq-Polymerase
- ad 50 µl H₂O bidest.

Zur verbesserten Bindung an die Ziel-DNA war es bei manchen Oligonukleotiden außerdem notwendig, 5% DMSO bzw. 5% Glycerol zu den Reaktionsansätzen hinzuzufügen. Nach Zusammenführung aller Komponenten erfolgte die PCR im *Thermocycler* nach dem in Tabelle 2.3 angegebenen Programm.

Tabelle 2.3 PCR-Standardprogramm im *Thermocycler*.

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
[1] Initiale Denaturierung	94	2 – 4 min	1
[2] Denaturierung	94	30 – 60 sec	35 - 40
[3] <i>Annealing</i>	52 - 64	30 – 60 sec	
[4] Elongation	72	45 – 90 sec	
[5] Finale Elongation	72	6 – 10 min	1
[6] Kühlung	4	∞	1

Anschließend wurden je 5 µl des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

2.1.12 Quantitative Echtzeit-PCR

Um unterschiedliche cDNA-Proben hinsichtlich ihrer Genexpression vergleichen zu können, wurde die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) am *LightCycler480 II* der Fa. Roche durchgeführt. Dabei werden Nukleinsäuren nach dem Prinzip der PCR amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Einsatz des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green*. Durch Amplifikation der Zielregion kommt es dabei zu einer Steigerung des Fluoreszenzsignals, welche sich bei Überschreitung des Schwellenwerts zu einer bestimmten Zykluszahl als *Crossing Point* (CP) manifestieren lässt. Dabei indiziert ein CP < 25 eine starke Genexpression, ein CP = 25 – 29 mittlere Expression des Gens, wohingegen ein CP = 30 - 35 basale Transkriptionsaktivität anzeigt. Da sich unter

optimalen PCR-Bedingungen die Nukleinsäurenmenge pro Zyklus verdoppelt, lässt sich der CP unbekannter Proben dann durch Vergleich mit einer linearen Standardreihe verrechnen und ermöglicht so die Quantifizierung dieser Proben hinsichtlich ihrer Genexpression. Eine an die PCR anschließende Schmelzpunktanalyse erlaubt außerdem eine Aussage über die Spezifität des verwendeten Oligonukleotidpaars: Unter Temperaturzunahme von 65°C auf 95 - 97°C wird diejenige Temperatur gemessen, welche zu einer Separation der PCR-Produkte und damit messbarer Fluoreszenzabnahme führt. Diese ist aufgrund der Basenzusammensetzung und Länge des Produktes produktspezifisch.

Zur Durchführung der qPCR wurden *SYBR Green* Reagenzien der Firmen Roche und Kapa Biosystems verwendet und folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

- 0,5 µl Oligonukleotid *Forward* (10 µM)
 - 0,5 µl Oligonukleotid *Reverse* (10 µM)
 - 5 µl *LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix* (Roche)
- bzw.
- 5 µl *KAPA SYBR FAST Mix* (Kapa Biosystems)
 - 3 µl H₂O bidest.

Nach Zusammenfügen der Komponenten wurden diese in 96-Well Platten der Fa. 4titude überführt und je 1 µl der zu analysierenden cDNA-Probe hinzugegeben. cDNA-Proben unbekannter Genexpression wurden hierfür in 1:10 – 1:20 Verdünnungen eingesetzt. Für die Verrechnung mit einer linearen Standardreihe wurde die entsprechende cDNA in fünf Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80) verwendet. Anschließend wurde die 96-Well Platte mit einer Klebefolie verschlossen, kurz herunterzentrifugiert und die Proben mit dem in Tabelle 2.4 angegebenen Programm im *LightCycler480 II* amplifiziert.

Tabelle 2.4 qPCR-Standardprogramme am *LightCycler480 II*.

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklusanzahl
		SYBR Green (Roche)	SYBR Green (Kapa)	
[1] Initiale Denaturierung	95	10 min	5 min	1
[2] Denaturierung	95	10 sec	5 sec	45 - 50
[3] <i>Annealing</i>	60 – 66	10 sec	5 sec	
[4] Elongation	72	20 sec	1 sec	
[5] Schmelzpunktanalyse	95	5 sec		1
	65	1 min		1
	95 - 97	Kontinuierliche Erfassung		1
[6] Kühlung	40	∞		1

Neben der Schmelzpunktanalyse wurde die Spezifität des Oligonukleotidpaars anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese von je 5 µl Amplifikat überprüft.

Zur Normierung unterschiedlicher Proben wurde parallel die Expression verschiedener Haushaltsgene analysiert. Diese sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.5 Übersicht der in den qPCR-Expressionsanalysen untersuchten Haushaltsgene.

Kodierung des Haushaltsgens	Funktion
β -Aktin (ACTB)	Strukturprotein im Cytoskelett
F _{0F6} -Untereinheit der ATP-Synthase (ATP5J)	Interaktion der ATP-Synthase-Multikomplexe
β_2 -Mikroglobulin (B2M)	Untereinheit des MHC I in der Antigenpräsentation
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)	<i>Recycling</i> von Purinbasen
Pyruvatdehydrogenase (PDH)	Decarboxylierung von Pyruvat in der Glykolyse
Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA)	Isomerisierung bestimmter Oligopeptide und Proteinfaltung
TATA-Bindeprotein (TBP)	Allgemeiner Transkriptionsfaktor

2.1.13 Sanger-Sequenzierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die nach Sanger *et al.* modifizierte Sequenzierungsmethode angewandt, bei welcher es durch Einbau fluoreszierender Didesoxynukleotide zu Kettenabbruchprodukten kommt. Diese können anschließend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und aufgrund ihrer Fluoreszenz analysiert werden (Lee *et al.*, 1992; Sanger *et al.*, 1977).

Für die Sequenzierung wurde das *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* der Fa. AbiPrism/ Applied Biosystems verwendet. Dabei wurden sowohl Plasmide als auch PCR-Produkte in die Sequenzierung eingesetzt. Bei den PCR-Produkten wurde vor Verwendung eine Isopropanolfällung durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.8), um störende Beiprodukte zu entfernen. Die Reaktionsansätze für die Sequenzierung setzten sich folgendermaßen zusammen:

- je 450 – 600 ng Plasmid bzw. 1 – 4 μ l der gefällten PCR-Produkte
- 1 μ l Primer (10 μ M)

- 1 µl Sequenzierungspuffer
- 1 µl *BigDye v3.1 Mix*
- ad 10 µl H₂O bidest.

Nachdem die einzelnen Komponenten zusammengefügt worden waren, wurden die Sequenzierungsansätze im *Thermocycler* nach dem in Tabelle 2.6 angegebenen Programm sequenziert.

Tabelle 2.6 Sanger-Sequenzierungsprogramm im *Thermocycler*.

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
[1] Initiale Denaturierung	96	1 min	1
[2] Denaturierung	96	10 sec	25
[3] <i>Annealing</i>	50	5 sec	
[4] Elongation	60	4 min	
[5] Kühlung	10	∞	1

Nach Beendigung der Sequenzierung wurden die Produkte mit Hilfe einer Ethanol-fällung aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.8) und abschließend durch den DNA-Sequenzierer *AbiPrism™ 3130 Genetic Analyzer* der Fa. Applied Biosystems aufgetrennt und analysiert.

2.2 Arbeiten mit Proteinen

2.2.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Mit Hilfe des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* kann ein bestimmtes Protein auf immunenzymatische Weise quantifiziert werden. Bei dem in der Arbeit verwendeten System *Rat TSH ELISA Kit* der Fa. Shibayagi handelte es sich um einen sogenannten *Sandwich-ELISA*, bei welchem die ELISA-Platte mit einem Antikörper

gegen das zu untersuchende Protein beschichtet ist. Nach Zugabe des Analyts bindet ein weiterer, Biotin-gekoppelter Antikörper an das zu untersuchende Protein. An das Biotin wird wiederum ein Avidin-gekoppeltes Enzym gebunden, welches nach Zugabe eines Substrats einen Farbumschlag katalysiert. Nach Abstoppen kann dieser mit Hilfe eines geeigneten Mikrotiterplatten-Lesegeräts photometrisch erfasst werden. Dabei ist die gemessene Absorption proportional zur Konzentration des zu quantifizierenden Proteins, welches durch Vergleich mit einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen exakt bestimmt werden kann.

Bei den in der Arbeit analysierten Proben handelte es sich um Zellkulturüberstände. Diese wurden 1:3 – 1:5 mit 1x Waschpuffer des Kits verdünnt und anschließend analysiert. Dazu wurde die 96-Well Platte zu Beginn der Prozedur viermal mit 1x Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl des Standards (*Range* 0,46 – 18 ng/ml), des *Blanks* bzw. der verdünnten Probe in die vorbestimmten Wells pipettiert und mit Hilfe eines Thermoschüttlers dreimal für 10 s bei 900 rpm geschüttelt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte erneut viermal mit 1x Waschpuffer gewaschen. Nachdem je 100 µl des 1:100 verdünnten Biotin-gekoppelten Antikörpers zugegeben worden waren, wurde die Platte mit Hilfe des Thermoschüttlers dreimal für 10 s bei 900 rpm geschüttelt und mit einer Klebefolie verschlossen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT und vier anschließende Waschschrte mit 1x Waschpuffer. Nun wurden je 100 µl des 1:100 verdünnten, Avidin-gekoppelten Enzyms *Horse Radish Peroxidase* (HRP) hinzugegeben. Nach dreimaligem Schütteln für je 10 s bei 900 rpm auf dem Thermoschüttler wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 min bei RT inkubiert. Die Wells wurden danach vier- bis achtmal mit 1x Waschpuffer gewaschen und anschließend mit je 100 µl *Substrate Chromogen Reagent* bestückt. Nach dreimaligem Schütteln der Platte für je 10 s bei 900 rpm auf dem Thermoschüttler wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen kam es zu einem blauen Farbumschlag, der anschließend durch Zugabe von 100 µl *Reaction Stopper* abgestoppt wurde, was wiederum einen gelben Farbumschlag zur Folge hatte. Danach wurde die Platte dreimal kurz für je 10 s bei

900 rpm auf dem Thermoschüttler geschüttelt und die Absorption bei 450 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts *GloMax®-Multi Detection System* der Fa. Promega gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde zusätzlich die Absorption bei 600 nm bestimmt. Abschließend wurde die Absorption der Standardkurve logarithmisch gegen die bekannten Protein-Konzentrationen aufgetragen und mit Hilfe ihrer Funktion die Protein-Konzentration der unbekanntenen Proben bestimmt.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Für die Transformation des chemokompetenten Bakterienstamms DH5 α war es notwendig, diesen immer wieder herzustellen. Dazu wurden DH5 α auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und nach einer Inkubation bei 37°C ÜN eine Bakterienkolonie gepickt. Diese überführte man in 15 ml LB-Medium und ließ sie bei 37°C und 150 – 200 rpm ÜN inkubieren. Am darauffolgenden Tag wurde die OD der Bakteriensuspension bei 550 nm bestimmt und durch Zugabe von SOB-Medium auf eine OD₅₅₀ von 0,05 verdünnt. Danach wurde das Bakteriengemisch bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 vermehrt und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen bei 1200 g und 4°C für 8 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml eiskaltem Tfb I Puffer gelöst und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 6-minütigen Zentrifugation bei 823 g und 4°C wurde das erhaltene Pellet in 4 ml Tfb II Puffer resuspendiert und in 200 μ l Aliquots bis zur Verwendung bei -80°C verwahrt.

2.3.2 Transformation chemokompetenter Bakterien

Um Vektorkonstrukte in großem Maßstab zu amplifizieren, wurden diese mittels Hitzeschock in den chemokompetenten Bakterienstamm DH5 α eingebracht. Dazu wurden 70 ng des Vektorkonstrukts bzw. 2 μ l des *TOPO TA*-Konstrukts (siehe Kapitel 2.1.10) in Transformationsröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 50 μ l des DH5 α -Stamms vermischt. Dieser Ansatz wurde anschließend 30 min auf Eis inkubiert und darauf einem 50-sekündigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C unterzogen. Danach kühlten die Bakterien für 2 min auf Eis ab, bevor 500 μ l SOC-Medium hinzugefügt wurden. Nach 1 h Inkubation des Gemischs bei 37°C und 200 rpm im

Schüttelinkubator wurden 35 – 350 µl Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum und den für die Blau-Weiß-Selektion notwendigen Zusätzen X-Gal und IPTG ausgestrichen. Danach wurden die Platten bei 37°C ÜN inkubiert, bevor weiße Einzelklone abschließend zur Anzucht in LB-Medium und für PCR-Analysen gepickt wurden.

2.3.3 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen

Um Dauerkulturen der transformierten Bakterienklone herzustellen, wurden je 500 µl Bakterienkultur in je 500 µl 2x FM-Medium aufgenommen und bei -80°C verwahrt.

2.4 Zellkultur-Techniken

2.4.1 Kultivierung von Zellen

Bei der Kultivierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien gab es zwei prinzipielle Vorgehensweisen: Mit Ausnahme der Zelllinie Tat1 wurden alle Zelllinien in T75 bzw. T175 Kulturflaschen kultiviert und zur Passage einmal mit PBS gewaschen und durch Gabe von 1 bzw. 2 ml Trypsin/EDTA von der Oberfläche abgelöst. Nach ca. 5 min Inkubation bei 37°C wurde die Ablösung der Zellen durch Klopfen an den Flaschenrand unterstützt, und die Verdaureaktion durch Gabe von 9 bzw. 8 ml Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und nach gewünschtem Verdünnungsverhältnis von 1:2 – 1:5 aufgeteilt. Abschließend wurde die jeweilige Zellkultur auf 15 bzw. 25 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Für die Kultivierung der Zelllinie Tat1 mussten die verwendeten Zellkulturgefäße zuvor mit in PBS verdünntem Matrigel der Fa. Corning beschichtet werden. Beim Verdünnen und Pipettieren des Matrigels wurde stets auf Eis, sowie mit vorgekühltem Verbrauchsmaterial und PBS gearbeitet. Waren die Zellen vor kurzem erst aufgetaut worden, wurden die Gefäße mit 1:10 verdünntem Matrigel beschichtet, während in der anschließenden Kultivierung eine 1:20 Verdünnung angewendet wurde. Zur Beschichtung wurden 10 bzw. 15 cm Schalen mit jeweils 4 bzw. 8 ml des entsprechend verdünnten Matrigels bedeckt, für 1 min inkubiert, und nach Abnahme des Gemischs

unter der Sterilbank luftgetrocknet. Anschließend wurden 10 bzw. 25 ml Kulturmedium vorgelegt, um eine gleichmäßige Verteilung bei Zugabe der Zellen zu gewährleisten. Zur Passagierung der Tat1-Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und durch Klopfen an den Schalenrand von der Oberfläche abgelöst. Danach wurden die Zellen in 2 bzw. 4 ml Kulturmedium aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und im Verhältnis von 1:2 – 1:4 gleichmäßig auf die neue Kulturschale verteilt.

2.4.2 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden dem Flüssigstickstoff entnommene Kryogefäße im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein PP-Röhrchen mit ca. 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert, um Reste des Kryokonservierungsmittels DMSO zu entfernen. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T75 Kulturflasche mit 5 ml vorgelegtem Kulturmedium bzw. auf eine 10 cm Schale gegeben.

2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden Zellen einer T175 Kulturflasche bzw. einer 15 cm Schale nach dem Kultivierungsverfahren mit PBS gewaschen und abgelöst (siehe Kapitel 2.4.1). Nach Homogenisierung der Zellsuspension wurde diese in ein PP-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1000 rpm und RT herunterzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 3 ml Einfriermedium, welches aus 90% Kulturmedium und 10% DMSO bestand, resuspendiert und gleichmäßig auf 3 Kryogefäße aufgeteilt. Um schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die befüllten Kryogefäße zunächst in *CoolCell LX* Behältern zu -80°C weggefroren, was eine kontrollierte Abkühlung um 1°C/ Minute ermöglichte. Nach ca. 1 Woche wurden die Kryogefäße abschließend in den Stickstofftank überführt.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Um eine exakte Zellzahl aussäen zu können, wurden die verwendeten Zelllinien mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden die Zellen mit PBS

gewaschen, abgelöst und je nach Zelldichte verdünnt. Diese Zellsuspension wurde auf die Zählkammer gegeben, und 4 – 8 Großquadrate dieser Kammer ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Mittelwert berechnet und der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

2.4.5 Transiente Transfektion von Zellen

Im Rahmen der transienten Transfektion wurde das Transfektionsreagenz *Fugene HD* der Fa. Promega verwendet, welches durch seine kationische Ladung die negativ geladene DNA komplexiert und ihre Zelleinschleusung ermöglicht. Dazu wurden Nthy-ori 3-1 im 24-Well Format mit jeweils 5×10^4 Zellen/ Well ausgesät. Nach 24 h und Mediumwechsel wurden die Zellen mit den beiden Plasmiden pGL4.29[*Luc2P*/CRE/Hygro] und pRL-TK cotransfiziert: In einem Reaktionsansatz von 25 μ l/ Well wurde Grundmedium ohne Zusätze vorgelegt, und mit je 0,25 μ g Plasmid und 0,875 μ l *Fugene HD* der Fa. Promega versetzt. Nach Vortexen und 15-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die tröpfchenweise Zugabe der Transfektionskomplexe. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung und Auswertung, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben.

2.4.6 Stabile Transfektion von Zellen

Zur dauerhaften Integration genetischen Materials in das Genom der verwendeten, eukaryotischen Zelllinien wurden die entsprechenden Plasmide mit Hilfe eines Restriktionsenzym linearisiert (siehe Kapitel 2.1.9) und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Fa. QIAGEN aufgereinigt. Anschließend wurden die linearisierten Plasmide mittels verschiedener kationischer Transfektionsreagenzien in die Zellen eingebracht. Dabei enthielten die Plasmide neben dem zu überexprimierenden Gen u. a. das Resistenzgen *NeoR* gegen das Antibiotikum G418, was eine an die Transfektion anschließende Selektionsphase ermöglichte.

Für die Wahl des geeigneten Transfektionsreagenz mussten in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedene Transfektionsreagenzien getestet werden, die in Tabelle 2.7 aufgelistet sind.

Tabelle 2.7 Geteste Transfektionsreagenzien zur Durchführung der stabilen Transfektion.

Transfektionsreagenz	Transfektionsformat	Volumen des eingesetzten Transfektionsreagenz [μ l]	Gesamt-DNA [μ g]	Reaktionsansatz/Well [μ l]
<i>Fugene HD</i>	6-Well – 6 cm Schale	3 - 12	1 – 3	100 - 200
<i>jetPRIME</i>	6 cm Schale	8 - 12	4	400
<i>Lipofectamin 3000</i>	6-Well	3,75 – 7,5	2,5	250
<i>Turbofect</i>	6-Well	6 - 8	4	400
<i>Viafect</i>	6 cm Schale	12 - 24	4	400
<i>Viromer RED</i>	6-Well	0,4 – 1,2	1 - 3	100 - 300
<i>Xfect</i>	6-Well	0,75 – 1,5	2,5 - 5	100

Zur Durchführung der Transfektion wurden die Zellen in den verschiedenen Transfektionsformaten ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 50 – 60% aufwiesen. Für die Transfektion wurde nach Herstellerempfehlung vorgegangen. Dazu wurde 1 – 5 μ g linearisierte Plasmid-DNA mit Reagenz-Puffer, OptiMEM oder Grundmedium auf ein Endvolumen von 100 – 400 μ l aufgefüllt, und mit 0,4 – 24 μ l Transfektionsreagenz versetzt. Bei Lipofectamin 3000 ergab sich die Besonderheit, dass neben dem Transfektionsreagenz 5 μ l P3000 Reagenz pro Ansatz hinzugegeben werden mussten. Nach Vortexen des Gemischs erfolgten eine Inkubationszeit von 5 – 20 min bei RT und die tröpfchenweise Zugabe der Transfektionskomplexe zu den Zellen. 24 – 72 h nach erfolgter Transfektion wurde mit der Gabe des Antibiotikums G418 begonnen, um die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen zu ermöglichen. Die für den jeweiligen Zelltyp geeignete Antibiotikakonzentration wurde zuvor mit Hilfe einer G418-Titrationskurve (siehe Kapitel 2.4.7) ermittelt. War die untransfizierte Kontrolle im Gegensatz zur Transfektante zwei Wochen nach Beginn der Antibiotikabehandlung abgestorben, so wurde von einer erfolgreichen Transfektion ausgegangen. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Plasmide mit einem EGFP-tag verwendet wurden, konnte

zusätzlich die Lokalisation des Plasmids mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden.

2.4.7 Erstellung einer Titrationskurve zur G418-Selektion

Um nach durchgeführter Transfektion eine das Gen stabil exprimierende Zelllinie zu generieren, erfolgte anschließend die Selektion transfizierter Zellen durch Gabe des Antibiotikums G418 (siehe Kapitel 2.4.6). Dafür musste für jede Zelllinie zuvor die minimal toxische Antibiotikakonzentration gefunden werden, welche zum Absterben der untransfizierten Zellen gerade noch ausreichend ist. Aus diesem Grund wurde eine G418-Titrationskurve durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und von ihrem Kulturgefäß abgelöst. Im 24- und 6-Well Format wurden die Zellen ausgesät und für 24 - 48 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt, bis sie eine 50 – 60%ige Konfluenz erreicht hatten. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit einer steigenden Konzentration von G418 (*Range* 0 – 1 mg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen zurück in den Brutschrank gestellt. Alle 2 – 4 Tage wurde das Selektionsmedium erneuert und das Absterben der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Diejenige Konzentration, die nach ca. zwei Wochen vollständigen Zelltod zeigte, wurde als die für die Zelllinie geeignete Antibiotikakonzentration auserwählt.

2.4.8 Zellfixierung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen mussten diese zuvor mit Hilfe von Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abgelöst und in starker Verdünnung auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Nach 24 – 120 h wurden Deckgläschen mit gut sichtbaren Einzelzellen für die weitere Prozedur ausgewählt. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, bevor die Zellen für 30 min und RT mit 4% PFA inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden Objektträger mit einem Tropfen PBS bestückt und die Deckgläschen vorsichtig aufgelegt. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Deckgläschenränder mittels *Fixogum Rubber Cement* abgedichtet. Nachdem dieses

für 30 min getrocknet war, konnten die Zellen am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Typ TCS SP2 der Fa. Leica) betrachtet werden.

2.5 Stimulationsversuche endokriner Zellen

2.5.1 Reduktion des Hormongehalts von FCS durch Behandlung mit Aktivkohle

Um zu verhindern, dass eventuelle hormonelle Rückstände im FCS einen Einfluss auf die nachfolgend beschriebenen Stimulationsversuche nehmen könnten (siehe Kapitel 2.5.2, 2.5.3 und 2.5.4), wurde das in den Versuchen verwendete FCS zuvor mit Dextran ummantelter Aktivkohle behandelt (abgewandelt nach Green & Leake, 1987). Dabei handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe lipophile Substanzen, darunter Hormone, aus einem Gemisch entfernt werden können. Hierzu inkubierten 100 ml des hergestellten Aktivkohle/ Dextran Puffers über Nacht bei 4°C, bevor dieser für 10 min bei 1100 rpm und RT zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert und durch gleiches Volumen an FCS ersetzt. Nach Vortexen folgten zwei 45-minütige Inkubationsschritte bei 56°C im Wasserbad. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 1100 rpm und RT zentrifugiert, das FCS dekantiert und für den Gebrauch mit einem 0,2 µM Cellulose Acetat Filter sterilfiltriert.

2.5.2 Reporteranalysen zur Überprüfung der TSH-Stimulierbarkeit humaner Thyreozyten

Da die Bindung von TSH an den TSHR in einer gesteigerten cAMP-Produktion resultiert (Rivas und Santisteban, 2003), konnte diese indirekt als Maß für die TSH-Stimulierbarkeit der Thyreozyten-Zelllinie Nthy-ori 3-1 genutzt werden. Durch transiente Transfektion der Zellen (siehe Kapitel 2.4.5) wurde der Vektor pGL4.29[*Luc2P*/CRE/Hygro] in die Zellen eingeschleust, welcher das induzierbare Reportergen *Luc2P* für die *Firefly* Luciferase enthält, und die Zellen anschließend mit TSH stimuliert. Die im Vektor enthaltene *cAMP Response Element (CRE)*- Sequenz induziert die Transkription der *Firefly* Luciferase in Abhängigkeit von *CRE-binding*

protein (CREB), welches durch die cAMP-Signalkaskade aktiviert wird. In einer Chemilumineszenzreaktion oxidiert die *Firefly* Luciferase unter Verbrauch von ATP das Substrat Beetle Luciferin zu Oxyluciferin, wodurch Energie in Form von Licht freigesetzt wird (de Wet *et al.*, 1985). Auf diese Weise wird die Aktivität der Luciferase in Form von *relative light units* (RLU) gemessen, welche somit direkt proportional zur Menge des gebildeten cAMP ist und eine unmittelbare Aussage über die Stimulierbarkeit der Zellen durch TSH zulässt.

Um die Transfektionseffizienz mit pGL4.29[*luc2P*/CRE/Hygro] zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem Vektor pRL-TK cotransfiziert. Dieser kodiert mit Hilfe des Reportergens *Rluc* für eine vom cAMP-Signalweg unabhängige *Renilla* Luciferase, welche in Anwesenheit von O₂ das Substrat Coelenterazin in Coelenteramid umwandelt. Neben CO₂ wird bei dieser Reaktion Energie in Form von Licht freigesetzt, die ebenfalls in Form von RLU gemessen wird (Lorenz *et al.*, 1991).

Im 24-Well Format wurden je 5 x 10⁴ Zellen ausgesät und nach 24 h mit den beiden Vektoren cotransfiziert (siehe Kapitel 2.4.5). 6 h nach Durchführung der Cotransfektion wurden die Zellen mit 0 – 52,5 mU/ml TSH stimuliert und nach weiteren 66 h lysiert. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurde Aktivkohle/ Dextran behandeltes FCS verwendet (siehe Kapitel 2.5.1). Dazu wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 100 µl 1x *Passive Lysis Buffer* (PLB) der Fa. Promega unter Schaben lysiert und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach einem Auftauzyklus zur Vervollständigung der Lyse wurden die Luciferase Aktivitäten mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* der Fa. Promega analysiert. Hierfür wurden 50 µl *Luciferase Assay Reagent II* (LARII) in einem FACS-Rundboden-Röhrchen mit je 10 µl Zelllysate versetzt und das Chemilumineszenz-Signal der *Firefly* Luciferase bei 10 sec Messzeit am Luminometer Lumat LB 9507 der Fa. Berthold Technologies gemessen. Durch Zugabe von 50 µl *Stop & Glo Reagent* mit anschließendem Vortexen wurde die erste Reaktion gestoppt und gleichzeitig die Chemilumineszenz-Reaktion der *Renilla* Luciferase ausgelöst. Diese wurde mit 10 sec Messzeit ebenfalls am Luminometer gemessen. Abschließend wurden die Messwerte der *Firefly* Luciferase mit den Messwerten der *Renilla* Luciferase verrechnet, sodass

die tatsächliche Aktivitätssteigerung der *Firefly* Luciferase beurteilt werden konnte.

2.5.3 TRH-Stimulation der murinen Hypophysenzelllinie Tat1

Da der Effekt von TRH sowohl auf die *TSH β* -Expression, als auch auf die TSH-Sekretion analysiert werden sollte, sollte die murine Hypophysenzelllinie Tat1 mit TRH stimuliert werden. Für die Sekretionsbestimmung wurden jeweils 2×10^6 Zellen im 6-Well Format ausgesät. Dabei wurde Medium ohne Phenolrot verwendet, um einen möglichen Effekt des Phenolrots auf die Methode der Sekretionsbestimmung zu vermeiden. 24 h nach Aussaat wurde durch einen Mediumwechsel auf FCS umgestellt, das zuvor mittels Dextran ummantelter Aktivkohle behandelt worden war (siehe Kapitel 2.5.1). Nach weiteren 48 h und Mediumwechsel wurden die Zellen mit $0,1 \mu\text{M}$ TRH stimuliert und für 0 – 15 min inkubiert. Nach den gewünschten Inkubationszeiten wurden je $20 \mu\text{l}$ Überstand für die TSH-Sekretionsbestimmung mit dem *Rat TSH ELISA Kit* der Fa. Shibayagi Co. abgenommen (siehe Kapitel 2.2.1).

Für die Expressionsanalysen wurden jeweils $6,5 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät. Nach 24 h wurde ein Waschschrift mit PBS mit anschließendem Mediumwechsel durchgeführt, bei welchem auf mit Aktivkohle behandeltes FCS umgestellt wurde. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit $0,1 \mu\text{M}$ TRH stimuliert. 0 – 12 h nach Zugabe des TRH wurde RNA aus den Zellen isoliert (Kapitel 2.1.1), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.1.2) und in der qPCR analysiert (Kapitel 2.1.12).

2.5.4 CaCl₂-Stimulation der humanen C-Zelllinie TT

Zur Analyse des Effekts von CaCl₂ auf die Calcitonin-Sekretion wurde die humane C-Zelllinie TT mit CaCl₂ stimuliert. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen im 24-Well Format ausgesät. Da Phenolrot einen Effekt auf die nachfolgende Methode zur Calcitoninbestimmung haben kann, wurde im gesamten Versuch Medium ohne Phenolrot verwendet. Des Weiteren wurde ausschließlich Aktivkohle/ Dextran behandeltes FCS verwendet (siehe Kapitel 2.5.1). Nach 24 – 120 h wurde ein einmaliger Waschschrift mit PBS und Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurde den Wells jeweils 0 – 6 mM CaCl₂ zugegeben und nach 0 – 48 h der Überstand

abgenommen. Die Bestimmung des Calcitonin-Gehalts wurde anschließend vom Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

2.6 Anhang: Verwendetes Material

2.6.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 α F⁻, supE44, hsdR17, recA1, Δ lacU169, Φ 80dlacZ Δ M15, endA1, gyrA96, (r_k^- , m_k^+), thi-1, relA1, λ -

2.6.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe „p. A.“ verwendet.

Agarose	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Aktivkohle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ampicillin Injektionslösung	ratiopharm GmbH (Ulm)
Bacto TM -Agar	Becton, Dickinson & Company (USA)
Bacto TM -Tryptone	Becton, Dickinson & Company (USA)
Bacto TM -Yeast Extract	Becton, Dickinson & Company (USA)
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA (Darmstadt)
DDT	Invitrogen TM / Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Dextran T-70	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

DMEM Gibco® (Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>)	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
DMEM Gibco®, ohne Phenolrot (Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>)	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
dNTP Set	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
FCS Gibco® (<i>Fetal Calf Serum</i>)	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
<i>Fixogum Rubber Cement</i>	Marabuwerke GmbH & Co. (Tamm)
<i>Fugene HD</i>	Promega GmbH (Mannheim)
G418-BC	Merck KGaA (Darmstadt)
D(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Glycerin	Riedel-de Haën GmbH (Seelze)
Ham's F-12 <i>Nutrient Mixture</i> Gibco®	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Ham's F-12 <i>Nutrient Mixture</i> , ohne Phenolrot	USBiological Life Sciences (USA)
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems (Weiterstadt)
IPTG	AppliChem GmbH (Darmstadt)

Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>jetPRIME</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Kaliumacetat (KAc)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt)
L-Glutamin Gibco®	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
<i>Lipofectamin 3000</i>	Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Matrigel® <i>Basement Membrane Matrix</i>	Corning Incorporated (USA)
Matrigel® <i>Basement Membrane Matrix</i> , ohne Phenolrot	Corning Incorporated (USA)
MCDB 105 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
MEM nicht essenzielle Aminosäuren Gibco®	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
NaMOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR international GmbH (Darmstadt)
Natriumpyruvat Gibco®	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
PBS	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin Gibco®	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
peqGold Low Melt Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
<i>Superfect</i>	QIAGEN GmbH (Hilden)
TRH (<i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA Gibco®	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
TSH (<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
<i>TurboFect</i>	Fermentas/ / Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
<i>ViaFect</i>	Promega GmbH (Mannheim)
<i>Viromer RED</i>	Lipocalyx GmbH (Halle an der Saale)
<i>Xfect</i>	Clontech Laboratories, Inc. / Takara Bio, Inc. (Frankreich)
X-Gal	AppliChem GmbH (Darmstadt)

2.6.3 Enzyme

DNase I (RNase frei)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland) New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Ribonuklease (RNase)-Inhibitor	Fermentas/ / Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Taq-DNA-Polymerase (rekombinant)	Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Taq-Polymerase	hergestellt durch: Prof. Dr. Dirk Prawitt

2.6.4 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	Easy-Cast™ elektrophoresis systems (versch. Größen); PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Bakterieninkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Bakterien-Sterilbank	Beck + Thies KG Reinraumtechnik (Langenfeld) Lamin-Air; Holten/ Thermo Fisher

	Scientific (Deutschland)
Einfrierbehälter für die Zellkultur	CoolCell LX; BioCision (USA)
DNA-Sequenzierer	AbiPrism™ 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems (Weiterstadt)
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE2000-U; Nikon Corporation (Japan)
Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Heizinkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	GloMax®-Multi Detection System; Promega GmbH (Mannheim)
Konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop	TCS SP2; Leica (Wetzlar)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar) ID03; Carl Zeiss GmbH (Österreich)
Luminometer	Lumat LB 9507; Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Magnet-Heizrührer	RCT IKAMAG®; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
PCR-Geräte	Mastercycler gradient; Eppendorf AG (Hamburg) Peltier Thermal Cyclers, Typ PTC-200; MJ Research Inc. (USA) T Professional Thermocycler; Biometra/Analytik Jena AG (Jena)

pH-Meter	CG840; Schott (Mainz)
Real-Time PCR System	LightCycler®480 II; Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Schüttelinkubator	Gallenkamp (UK)
Spannungsgeräte für Gelelektrophorese	EPS 1000 Pharmacia Biotech; Bio-Rad Laboratories (München)
Spektrophotometer	Nanodrop 1000; Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort; Eppendorf AG (Hamburg)
Vakuumpumpe	Mini-Vac power; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Vortexer	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Waagen	Analysenwaage; Sartorius AG (Göttingen)
	Laborwaage; Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbäder	Certomat WR; B. Braun Biotech International GmbH/ Sartorius BBI Systems GmbH (Melsungen)
	DC10; Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
Zellkulturinkubator	Hera cell; Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Zellkultur-Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet;

	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Zell-Zählkammer	Neubauer improved; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Zentrifugen	EBA12R; Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
	Fresco21 Centrifuge; Heraeus Holding GmbH/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
	Pico17 Centrifuge; Heraeus Holding GmbH/ Thermo Fisher Scientific (Deutschland)
	RC5C; Sorvall® Instruments/ Du Pont de Nemours GmbH (Bad Homburg)
	RT6000D; Sorvall® Instruments/ Du Pont de Nemours GmbH (Bad Homburg)

2.6.5 Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	AbiPrism™ / Applied Biosystems (Weiterstadt)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega GmbH (Mannheim)
Endofree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
KAPA SYBR FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems, Inc. (USA)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)

peqGOLD DNase I Digest Kit	PEQLAB (Erlangen)	Biotechnologie	GmbH
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB (Erlangen)	Biotechnologie	GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)		
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)		
Rat TSH ELISA Kit	Shibayagi Co. (Japan)		
TOPO TA Cloning Kit (pCR2.1-TOPO)	Invitrogen™/ (Deutschland)	Thermo Fisher Scientific	

2.6.6 Lösungen und Puffer

Zur Herstellung der wässrigen Lösungen wurde deionisiertes Millipore®-Reinstwasser verwendet. Molekularbiologische Lösungen wurden mit Hilfe von H₂O bidest. der Fa. Braun (Melsungen) angesetzt.

Agarosegel (X%)	X g Agarose
	100 ml 1x TBE
Aktivkohle/ Dextran Puffer	0,25 % Aktivkohle
	0,0025 % Dextran T-70
	0,25 M Saccharose
	1,5 mM MgCl ₂
	10 mM HEPES
	pH 7,4
	sterilfiltrieren
Ampicillin	Stammlösung: 10 mg/ml H ₂ O bidest.

	sterilfiltrieren
	Endkonzentration: 0,1 mg/ml
DNA-Ladepuffer (blau)	0,125 g Bromphenolblau
	0,125 g Xylencyanol FF
	7,5 g Ficoll 400
	ad 50 ml H ₂ O bidest.
DNA-Ladepuffer (orange)	15 g Saccharose
	0,175 g Orange G
	ad 50 ml H ₂ O bidest.
Ethidiumbromid-Färbelösung	2 µg EtBr/ml Millipore®-Wasser
FM-Medium (2x)	65% Glycerin
	100 mM MgSO ₄
	25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
IPTG	Stammlösung: 200 mg/ml
	sterilfiltrieren
	Endkonzentration: 0,048 mg/ml
LB-Agar	15 g Bacto™-Agar
	ad 1 l Millipore®-Wasser
	autoklavieren
LB-Ampicillin-Agar	5 ml Ampicillin (10 mg/ml)
	ad 500 ml LB-Agar

LB-Ampicillin/ IPTG/ X-Gal –Agar	5 ml Ampicillin (10 mg/ml) 0,12 ml IPTG (200 mg/ml) 1 ml X-Gal (20 mg/ml) ad 500 ml LB-Agar
LB-Ampicillin-Medium	500 ml LB-Medium (1x) 5 ml Ampicillin (10 mg/ml)
LB-Medium (1x)	10 g Bacto™-Tryptone 5 g Bacto™-Yeast-Extrakt 10 g NaCl ad 1 l Millipore®-Wasser (pH 7,5) autoklavieren
PCR-Puffer (10x)	15 mM MgCl ₂ 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl pH 8,3
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Yeast-Extrakt 0,5 g NaCl ad 1 l Millipore®-Wasser autoklavieren 10 mM MgCl ₂ (sterilfiltriert) 10 mM MgSO ₄ (sterilfiltriert)

SOC-Medium	20 mM Glucose-Lösung (sterilfiltriert) ad 100 ml SOB-Medium
TBE-Puffer (1x)	90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA (pH 8,3) 90 mM Tris autoklavieren
Tfb I Puffer	10 mM CaCl ₂ 30 mM KAc 100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 15% Glycerin (pH 5,8) (mit CH ₃ COOH) ad 100 ml Millipore®-Wasser sterilfiltrieren
Tfb II Puffer	75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 10 mM NaMOPS (pH 7,0) 15% Glycerin ad 100 ml Millipore®-Wasser sterilfiltrieren
X-Gal	Stammlösung: 20 mg/ml Dimethylformamid

Endkonzentration: 40 mg/l

2.6.7 Molekulargewichtsstandards

100 bp DNA Ladder

Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific
(Deutschland)

New England Biolabs GmbH (Frankfurt
am Main)

1 kb DNA Ladder

Invitrogen™/ Thermo Fisher Scientific
(Deutschland)

New England Biolabs GmbH (Frankfurt
am Main)

2.6.8 Oligonukleotide

Die unten angegebenen Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die jeweilig etablierten *Annealing*-Temperaturen sind in Klammern angegeben.

Oligonukleotide für die Sequenzierungsanalysen des *TRPM5*-Gens:

rs2301699_F (62°C)	5'-TCTCCTTGTGCATGTTGGCT-3'
rs2301699_R (62°C)	5'-GATGCACTTGACCTTGCACC-3'
TRPM5_1F (62°C)	5'-CCTCTGCTGAGTCTTTCGGA-3'
TRPM5_1R (62°C)	5'-TCCAGGTCAAGGCGGACATC-3'
TRPM5_2F (64°C)	5'-GGCCACTCTCCTCCTGCTA-3'
TRPM5_2R (64°C)	5'-TGTTCTCGTGATGGCCTGGA-3'
TRPM5_3FII (62°C)	5'-AGTTGTGTCGGATGTGTCCC-3'
TRPM5_3R (56°C)	5'-CTATGCGGTACTGCCACCTG-3'

TRPM5_4F (62°C)	5'-TGA CTGT CGA AGGAGGGTCC-3'
TRPM5_4R (62°C)	5'-GTCTCGGTGCTCAGGCAT-3'
TRPM5_5+6F (62°C)	5'-CCAGACGAAGCCCACACTTT-3'
TRPM5_5+6R (62°C)	5'-CAGGAACTCTCCCAGAGGAC-3'
TRPM5_7F (62°C)	5'-GCTGGACCAAGCTGGTATGT-3'
TRPM5_7R (62°C)	5'-CCGAGCGTCACAAACATTGG-3'
TRPM5_8F (62°C)	5'-CCGTTGCAGCCGAGAAAGTT-3'
TRPM5_8R (62°C)	5'-GGCCAGTCGTGAGCAAATG-3'
TRPM5_9F (59,1°C)	5'-GAGAGGGTCTGCGTGACCT-3'
TRPM5_9R (59,1°C)	5'-GGGTTCTCGCTCTTCTGGTT-3'
TRPM5_10+11F (63,2°C)	5'-GAGGTCTCCCGCGTACTCAA-3'
TRPM5_10+11R (63,2°C)	5'-TAACAGGCAGCCCTGGCGA-3'
TRPM5_12F (63,2°C)	5'-ACGAGGGACATTTAGCGTGG-3'
TRPM5_12R (63,2°C)	5'-CAGGCTGGGAAGTCAACTCA-3'
TRPM5_13+14F (64°C)	5'-GCAAAGGTGCAGAGTTGGAG-3'
TRPM5_13+14R (64°C)	5'-GCAGAGAAGTTCGCAGTGGT-3'
TRPM5_15F (64°C)	5'-GGAGAAGAGCCCGCTGTATG-3'
TRPM5_15R (64°C)	5'-CCCAACCTGAAGCTGCAGAG-3'
TRPM5_16F (62°C)	5'-GGCCCTGGTCATAGATGGAA-3'
TRPM5_16R (62°C)	5'-TGGAGGATGGGAGGCTGAT-3'
TRPM5_17+18F (60°C)	5'-AAAGATGAAGCCACTCAGGG-3'

TRPM5_17+18R (60°C)	5'-ACAGACCTCTCTGGAGAGC-3'
TRPM5_19F (64°C)	5'-GACTCAGCGCTCTATCTCGG-3'
TRPM5_19R (64°C)	5'-GGTCCACTCTCCTTGGGTCT-3'
TRPM5_20F (62°C)	5'-CCCAACAGCAATCAGGGTGC-3'
TRPM5_20R (62°C)	5'-ACAGAGCCCAGCTGAGGAC-3'
TRPM5_21F (62°C)	5'-CTGACGCCACATGCTCTAG-3'
TRPM5_21R (62°C)	5'-TATGCCTTCCCAGTAGGGCT-3'
TRPM5_22F (62°C)	5'-AGCCCTACTGGGAAGGCATA-3'
TRPM5_22R (62°C)	5'-AGGCGTGTAGAGTGAAAGGC-3'
TRPM5_23F (62°C)	5'-TCGCCTTTCCTACTCTACACGC-3'
TRPM5_23R (62°C)	5'-CTGAGTGAAGCACATTCGGC-3'
TRPM5_24F (62°C)	5'-CTCTGAGCCAGCTACCTCTC-3'
TRPM5_24R (62°C)	5'-TCCTTTGGGTGAGGGTCTGT-3'

Oligonukleotide für Expressionsanalysen auf humane Ziel-cDNA:

ACTB_F (60°C)	5'- GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'
ACTB_R (60°C)	5'- GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'
ATP5J_F (60°C)	5'- CTC GGG ACT GAG TGC AAG AA-3'
ATP5J_R (60°C)	5'- CCT CCG CAA ATG GAC TGA GA-3'
B2M_F (60°C)	5'- ATGAGTCCTGCCGTGTGA-3'
B2M_R (60°C)	5'- GGCATCTTCAAACCTCCATG-3'
CT_F (62°C)	5'-ACT GGT GCA GGA CTA TGT GC-3'

CT_R (62°C)	5'-TAC TCA GAT TAC CGC ACC GC-3'
HPRT_F (61°C)	5'- ATT GAC AGT GGG AAA ACA ATG C-3'
HPRT_R (61°C)	5'- TCC AAC ACT TCG TGG GGT CC-3'
TRPM5_16F (62°C)	5'-CCA TCT TCC TGT TCA TCG TG-3'
TRPM5_18R (62°C)	5'-GAG CGC ATG TGA AGG ACG-3'
TRPM5_19R (62°C)	5'-GAG CGC ATG AAG CCC GTG-3'
PDH_F (61°C)	5'-GAC CAA TGG ACA TGG AAA CC-3'
PDH_R (61°C)	5'-TGG CAA CCG TAA CAG ACA AA-3'
PPIA_F (60°C)	5'-ACGTGGTATAAAAGGGGCGG-3'
PPIA_R (60°C)	5'-TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG-3'
TBP_F (66°C)	5'-GGA TAA GAG AGC CAC GAA CCA C-3'
TBP_R (66°C)	5'-TTA GCT GCT GGA AAA CCC AAC TTC TG-3'
TSHR_F (57,8°C)	5'-GGC ATT TTC AAC ACT GGA CTT A- 3'
TSHR_R (57,8°C)	5'-CAG CTT CAG TGT CAA GGT TTC A- 3'

Oligonukleotide für Expressionsanalysen auf murine Ziel-cDNA:

mAct_F (60°C)	5'-GCG AGC ACA GCT TCT TTG C-3'
mAct_R (60°C)	5'-GCT GTA TTC CCC TCC ATC G-3'

Cellulose Acetat Filter Whatman FP30 (0,2µM)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Deckgläser (18 x 18 mm, 24 x 50 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
FACS-Rundboden-Röhrchen Falcon®	Becton, Dickinson & Company (USA)
Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Fisher Scientific (USA)
Küvetten „UVette®“	Eppendorf AG (Hamburg)
Objektträger (76 x 26 mm)	DIAGONAL GmbH & Co. KG (Münster)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Petrischalen (10 cm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
PP-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
PP-Rundbodenröhrchen Falcon® (14 ml)	Becton, Dickinson & Company (USA)
Q-Stick™ Adhesive Folie für qPCR	4titude (Berlin)
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)
Zellkulturplatten (6, 10, 15 cm Schale)	TPP Techno Plastic Products AG (Schweiz)
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

Zellkulturplatten (24-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturschaber BD Falcon™	BD Biosciences (Belgien)
2.6.11 Vektoren	
pGL4.29[<i>Luc2P</i> /CRE/Hygro]	Promega GmbH (Mannheim)
pRL-TK	Promega GmbH (Mannheim)
2.6.12 Vektorkonstrukte	
pcDNA3-EGFP (PE)	hergestellt durch: Lili Brixel (Mainz)
pcDNA3-TRPM5/EGFP (PLE)	hergestellt durch: Lili Brixel (Mainz)
2.6.13 Zelllinien	
Nthy-ori 3-1 (<i>Human thyroid follicular epithelial cells</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
RO82-W-1 (<i>Human follicular thyroid carcinoma cells</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Tat1 (<i>Murine thyrotropic pituitary cells</i>)	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Pamela Mellon (USA)
TT (<i>Human thyroid medullary carcinoma cells</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
HEK293 (<i>human embryonic kidney cells</i>)	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dirk Prawitt
2.6.14 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	
Nthy-ori 3-1	Grundmedium: RPMI-Medium 10% FCS 1% L-Glutamin

RO82-W-1	1% Penicillin/ Streptomycin Grundmedium: DMEM: Ham's F12: MCDB 105 (2:1:1) 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/ Streptomycin
Tat1	Grundmedium: DMEM-Medium 10% FCS 1% Natrium-Pyruvat 1% Penicillin/ Streptomycin
TT	Grundmedium: Ham's F-12 20% FCS 1% L-Glutamin 1% Natrium-Pyruvat 1% MEM nicht essenzielle Aminosäuren 1% Penicillin/ Streptomycin

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion

Die Literatur zeigt für *TRPM5* besonders starke Expressionen in Drüsengeweben (Prawitt *et al.*, 2000). Dabei deckten Funktionsanalysen eine Rolle von TRPM5 u. a. in der Hormonsekretion von β -pankreatischen Zellen auf (Brixel *et al.*, 2010; Colsooul *et al.*, 2010). Da eine dem Pankreas vergleichbare Expressionsstärke von *TRPM5* in der Schilddrüse beobachtet werden konnte (Prawitt *et al.*, 2000), wurde für dieses Gewebe als Arbeitshypothese eine ähnliche Rolle für TRPM5 in der Hormonsekretion vermutet. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Funktion dieses Ionenkanals in dem Gewebe analysiert werden. Histologisch lässt sich die Schilddrüse in die folliculären Epithelzellen und die parafolliculären C-Zellen differenzieren. Dabei machen Erstere den größten Anteil der Zellpopulation aus und sind vor allem für die Sekretion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 zuständig, während die wenigen C-Zellen insbesondere an der Ca^{2+} -Homöostase durch Sekretion von Calcitonin beteiligt sind (siehe Kapitel 1). Daher wurde zunächst eine mögliche Beteiligung von TRPM5 in der Sekretion der Schilddrüsenhormone in Betracht gezogen. Dies sollte sowohl durch *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen verifiziert werden.

3.1.1 Bestimmung des fT4-Serumspiegels in der *Trpm5*^{-/-}-Maus

Zur Durchführung der *in vivo* Studien stand dem Labor die von Zhang und Mitarbeitern generierte homozygote *Trpm5 Knockout* Maus (*Trpm5*^{-/-}) mit C57BL/6 Hintergrund zur Verfügung (Zhang *et al.*, 2003a). Diese zeichnet sich durch eine Deletion der Exons 15 bis 19 des *Trpm5*-Gens aus. Um zu untersuchen, ob TRPM5 einen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsekretion nimmt, wurden Serumproben von sieben *Trpm5*^{-/-}-Mäusen entnommen und bezüglich ihrer fT4-Konzentration mit Alters- und Geschlechts-abgestimmten *Trpm5*^{+/-}-Mäusen des identischen Hintergrunds und gleicher Anzahl verglichen. fT4 repräsentiert den Hauptanteil der im Blut zirkulierenden

Schilddrüsenhormone in seiner aktiven Form und kann mit höherer Messgenauigkeit als das gebundene T4 bestimmt werden. Deshalb dient fT4 als Standardparameter zur Bestimmung der Schilddrüsenfunktion. Die Bestimmung des fT4-Serumspiegels der *Trpm5*^{-/-} und *Trpm5*^{+/+}-Mäuse mittels Radioimmunassay (RIA) erfolgte in Kooperation mit dem Labor unter Leitung von Dr. Samuel Refetoff, Chicago. Dabei zeigten die Analyse der *Trpm5*^{-/-}-Tiere eine konstante Verminderung der fT4-Konzentration von 5,8 µg/dl auf 4,6 µg/dl. Dies entspricht einer sehr signifikanten Reduktion an fT4 um ca. 20% im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abbildung 3.1).

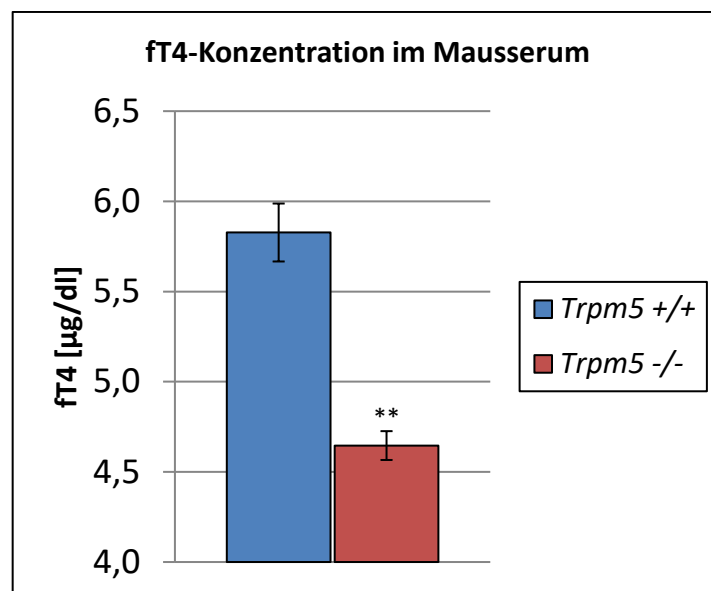


Abbildung 3.1 fT4-Serumspiegel von *Trpm5*^{+/-} und *Trpm5*^{-/-}-Mäusen im Vergleich.

Dargestellt sind die gemittelten Werte der gemessenen fT4-Konzentration in [µg/dl] von jeweils sieben Tieren. Der blaue Balken zeigt den Mittelwert des Wildtyps (*Trpm5*^{+/+}), der Rote den der homozygoten *Trpm5* *Knockout* Maus (*Trpm5*^{-/-}). *Trpm5*^{-/-} (4,6 µg/dl) zeigte eine um etwa 20% reduzierte fT4-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp (5,8 µg/dl). Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts. T-Test Analysen ergaben, dass es sich mit $p = 0,002$ um einen sehr signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und *Knockout* handelt (**).

Somit konnte ein *Knockout* von *Trpm5* im Tiermodell mit einer Reduktion an fT4 im Blutserumspiegel korreliert werden, was auf eine mögliche Rolle von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion hindeutete.

3.1.2 Etablierung einer geeigneten Zelllinie zur funktionellen Untersuchung von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion

Nachdem ein Effekt des *Trpm5* *Knockouts* auf den fT4-Serumspiegel im Tiermodell

gezeigt werden konnte, wurde der funktionelle Aspekt von TRPM5 in der Schilddrüse mit Hilfe eines Zellkulturmodells näher untersucht. Zu diesem Zweck kamen die beiden humanen Zelllinien Nthy-ori 3-1 und RO82-W-1 in Frage, welche von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen wurden. Dabei handelt es sich bei Nthy-ori 3-1 um normale Epithelzellen follikulären Ursprungs, während RO82-W-1 Karzinomzellen follikulären Ursprungs darstellen. Um die mögliche Funktion von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion anhand dieser Zelllinien zu charakterisieren, galt es, diese bezüglich ihrer Eignung zunächst zu überprüfen. Erstes Kriterium hierfür war die Expression des *TSH-Rezeptors* (*TSHR*) als Voraussetzung für die physiologische Stimulierbarkeit dieser Zellen mittels TSH. Aus diesem Grund wurde eine qRT-PCR Analyse bezüglich dieses Gens durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.12). Zwanzigfach verdünnte cDNA der Zelllinie Nthy-ori 3-1 wies mit einem CP von 33,66 eine basale Expression des *TSHR* auf. Das entsprechende PCR-Produkt wies wie erwartet eine Bande bei 159 bp auf und ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

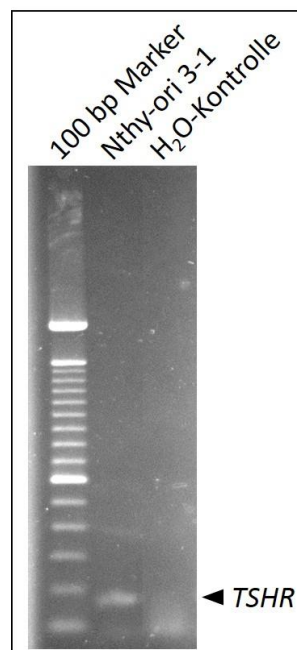


Abbildung 3.2 1,5% Agarosegel des qRT-PCR-Produkts bezüglich *TSHR* in Nthy-ori 3-1.

Die Abbildung zeigt das qRT-PCR-Produkt von *TSHR* auf einem 1,5% Agarosegel, das mit den Oligonukleotiden TSHR_F und TSHR_R generiert wurde, und die Negativkontrolle, bei welcher es aufgrund *Template*-Mangels zur Bildung von Oligonukleotid-Dimeren gekommen ist. Das PCR-Produkt des Oligonukleotidpaars ist 159 bp groß, der 100 bp Marker ist zum Größenvergleich aufgetragen. Je 5 μ l Probe und Marker wurden auf das 1,5% Agarosegel aufgetragen.

Dagegen konnte für die Zelllinie RO82-W-1 keine Expression des *TSHR*-Gens gezeigt werden. Aus diesem Grund schienen die zellulären Gegebenheiten für eine TSH-Stimulation lediglich in Nthy-ori 3-1 gegeben, sodass diese Zellen im Anschluss auf ihre Stimulierbarkeit mittels TSH getestet wurden. Da nach der Bindung von TSH an den TSHR aufgrund einer G-Protein abhängigen Signalkaskade vermehrt cAMP produziert wird, wurde dieses Signalmolekül anhand von chemilumineszenten Reporteranalysen als indirektes *Readout* für die TSH-Stimulierbarkeit genutzt (siehe Kapitel 2.5.2). Hierfür wurden je 5×10^4 Zellen im 24-Well Format ausgesät und nach 24 h mit dem Vektor pGL4.29[*Luc2P*/CRE/Hygro] transfiziert. Dieser kodiert für eine cAMP-abhängige *Firefly* Luciferase. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem Vektor pRL-TK cotransfiziert, welcher für die *Renilla* Luciferase kodiert. 6 h nach Cotransfektion erfolgte die Stimulation durch Gabe von 26,25 mU/ml und 52,5 mU/ml TSH, welche nach 66 h durch Zellyse beendet wurde. Vergleichend wurde eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Abschließend wurden die Zellysate mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assays* der Fa. Promega aufgearbeitet und analysiert. Eventuelle Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch Verrechnung der Signale von *Firefly* Luciferase und *Renilla* Luciferase bereinigt, und die Werte anschließend auf die unstimulierte Kontrolle normiert. Dabei wurde eine proportionale Steigerung der Luciferase-Aktivität um bis zu ~38% in Abhängigkeit der TSH-Konzentration beobachtet (Abbildung 3.3). Somit konnte eine Stimulierbarkeit der Zelllinie Nthy-ori 3-1 unter Verwendung von 52,5 mU/ml TSH über den TSHR gezeigt und das zweite Kriterium für ihre Eignung erfüllt werden.

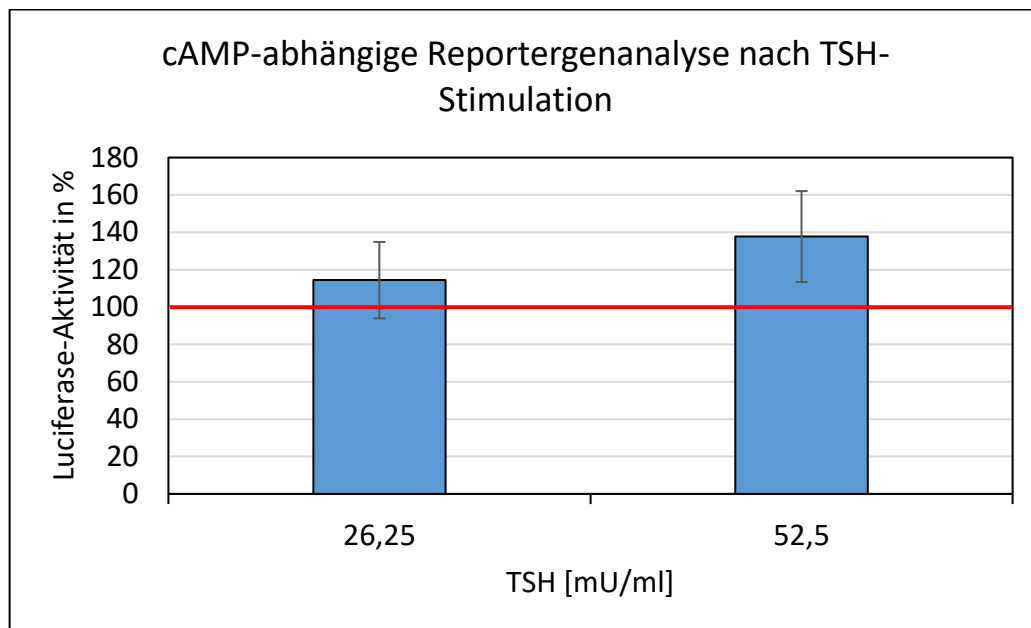


Abbildung 3.3 cAMP-abhängige Luciferase Aktivität nach Stimulation mit verschiedenen TSH-Konzentrationen.

Dargestellt ist die Luciferase-Aktivität in % nach Gabe von 26,25 mU/ml und 52,5 mU/ml TSH, normiert auf die unstimulierte Kontrolle. Dabei wurden die gemessenen Signale von *Firefly* Luciferase und *Renilla* Luciferase miteinander verrechnet und der Wert der Kontrolle anschließend als 100% gesetzt (rote Linie). Es ist eine kontinuierliche Steigerung der Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration zu beobachten. Die Maximalkonzentration an TSH von 52,5 mU/ml zeigt eine Steigerung der Luciferase-Aktivität um ca. 38%. Die Auswertung umfasst Werte von zwei unabhängigen Versuchen.

Drittes und letztes Kriterium für die funktionelle Charakterisierung von TRPM5 in der Schilddrüsenhormonsekretion war die Expression des Ionenkanals in dieser Zelllinie. Mittels qRT-PCR Analysen konnte jedoch keinerlei Amplifikat des *TRPM5*-Gens nachgewiesen werden, sodass die Voraussetzung für weitere Analysen anhand dieser Zelllinie nicht gegeben war. Dies stellte die vermutete funktionelle Rolle von TRPM5 in der Schilddrüse in Frage, was darüber hinaus durch eine ebenfalls fehlende Expression des Ionenkanals in der follikulären Zelllinie RO82-W-1 bekräftigt wurde.

3.2 Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der Adenohypophyse

3.2.1 Bestimmung des TSH-Serumspiegels in der *Trpm5*^{-/-}-Maus

Da *TRPM5* in Schilddrüsenepithelzellen follikulären Ursprungs keine Expression

zeigte, stellte sich die Frage nach der Erklärbarkeit der in den *Trpm5*^{-/-}-Mäusen beobachteten verminderten fT4-Serumspiegel. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür war eine potentielle Rolle von TRPM5 im thyreotropen Regelkreis oberhalb der Schilddrüse, welche in den *Knockout* Mäusen dann sekundär in einer Reduktion des fT4-Serumspiegels resultiert (siehe Abbildung 1.7). Um dieser Frage nachzugehen, wurden daher Seren von je sieben Alters- und Geschlechts-abgestimmten *Trpm5*^{-/-}- und *Trpm5*^{+/+}-Mäusen bezüglich ihres TSH-Serumspiegels untersucht. Die dafür notwendige Durchführung des RIA wurde ebenfalls im Labor von Dr. Samuel Refetoff in Chicago durchgeführt. Dabei zeigten die *Trpm5*^{-/-}-Tiere eine von 68 mU/L auf 19 mU/L verringerte TSH-Konzentration, was einer sehr signifikanten Reduktion an TSH um ca. 72% im Vergleich zum Wildtyp entspricht (Abbildung 3.4).

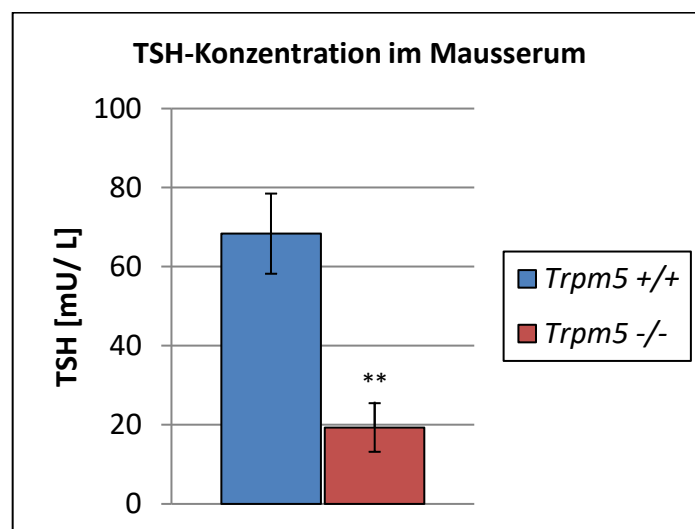


Abbildung 3.4 TSH-Serumspiegel von *Trpm5*^{+/+}- und *Trpm5*^{-/-}-Mäusen im Vergleich.

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen TSH-Konzentration in [mU/L] von jeweils sieben Tieren; in Blau: Wildtyp (*Trpm5*^{+/+}), in Rot: *Trpm5* *Knockout* Maus (*Trpm5*^{-/-}). *Trpm5*^{-/-} (19 mU/L) wies eine um etwa 72% reduzierte TSH-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp (68 mU/L) auf. Fehlerbalken geben den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts an. T-Test Analysen belegten einen sehr signifikanten Unterschied mit $p = 0,004$ zwischen Wildtyp und *Knockout* (**).

Demzufolge konnte der *Trpm5* *Knockout* mit einem reduzierten TSH-Serumspiegel korreliert werden, was auf eine funktionelle Rolle von TRPM5 in der Adenohypophyse und die Ursache der reduzierten fT4-Konzentration hinwies. Aus diesem Grund wurde die Funktion von TRPM5 in der Adenohypophyse näher untersucht.

3.2.2 Etablierung einer geeigneten Zelllinie zur funktionellen Untersuchung von TRPM5 in der thyreotropen Adenohypophyse

Die funktionelle Rolle des Ionenkanals in der Hypophyse wurde mittels *in vitro* Analysen spezifiziert. Hierfür wurde nach einer geeigneten Zelllinie hypophysären Ursprungs gesucht. Die in der Literatur häufiger vorzufindende humane Zelllinie HP75 war zum Zeitpunkt der Recherche nicht mehr kommerziell verfügbar und erwies sich nach Rücksprache mit *American Type Culture Collection* (ATCC) als ungeeignet für weitere Untersuchungen. Problematisch schien dabei neben der schwierigen Kultivierung der Zellen insbesondere der Verlust der Transfizierbarkeit und funktioneller Eigenschaften bei fortgeschrittener Kultivierung (Dr. Aruna Khashnobish, LGC Standards GmbH/ ATCC; persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund stand für die funktionellen TRPM5-Analysen kein humanes Zellsystem zur Verfügung, weshalb eine murine Hypophysen-Zelllinie auf ihre Eignung für weitere Untersuchungen getestet wurde. Hierbei handelte es sich um die immortalisierte Zelllinie Tat1, welche freundlicherweise von Dr. Pamela Mellon aus San Diego zur Verfügung gestellt wurde. Sie wurde aus einem Hypophysentumor generiert, welcher durch gerichtete Onkogenese in CB6F1/J Mäusen induziert wurde. Dabei konnte die Expression der TSH-spezifischen β -Untereinheit (*Tshb*) im *Northern Blot* und damit die thyreoide Gewebespezifität nachgewiesen werden (Alarid *et al.*, 1996). Daher erschien diese Zelllinie geeignet. Initiale Untersuchungen umfassten die Expression des Ionenkanals, sowie die TRH-Stimulierbarkeit der Zelllinie. qRT-PCR Analysen zehnfach verdünnter cDNA zeigten, dass *Trpm5* mit einem *Crossing Point* (CP) von 33,23 grundlegend exprimiert wird (siehe Kapitel 2.1.12). Abbildung 3.5A zeigt das PCR-Produkt des *Trpm5*-Gens mit einer erwarteten Bande bei 230 bp auf einem 1,5% Agarosegel. Die Ausstattung der Zelllinie für eine basale Transkriptionsaktivität dieses Gens ist somit gegeben. Auch konnte die allgemeine *Tshb*-Expression in diesen Zellen mit einem CP von 24,29 bestätigt werden, sodass die Zelllinie für weitere Stimulationsuntersuchungen in Frage kam. Das Produkt der qRT-PCR wurde auf einem 1,5% Agarosegel überprüft und ist in Abbildung 3.5B dargestellt. Dabei konnte die erwartete Bande bei 313 bp detektiert werden.

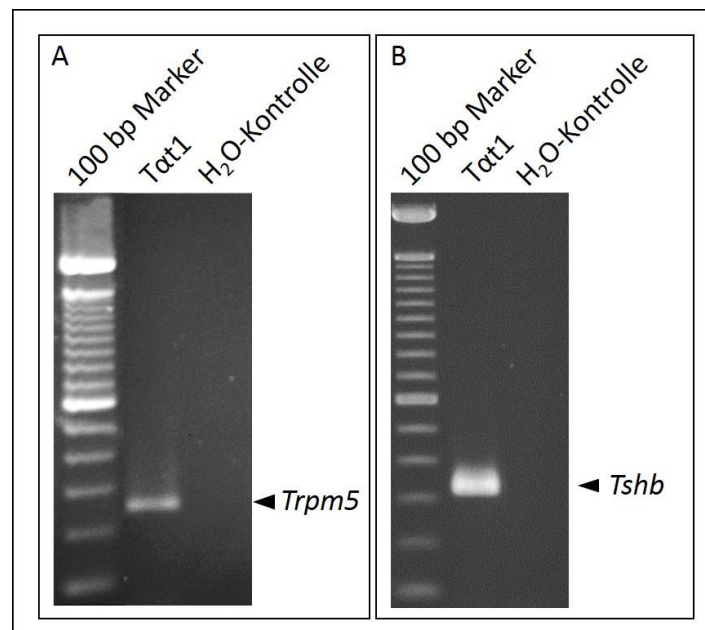


Abbildung 3.5 Expression von *Trpm5* und *Tshb* in Tat1-Zellen.

Zu sehen ist (A) das qRT-PCR-Produkt von *Trpm5*, das mit den Oligonukleotiden mM5_230_F und mM5_230_R generiert wurde, sowie die Negativkontrolle. Das PCR-Produkt besitzt eine Größe von 230 bp. In (B) ist das mit den Oligonukleotiden mTshb_4F und mTshb_5R generierte qRT-PCR-Produkt von *Tshb* mit einer Größe von 313 bp dargestellt, daneben die Negativkontrolle. Zum Größenvergleich ist jeweils der 100 bp Marker aufgetragen. Es wurden je 5 μ l PCR-Reaktion und Marker auf das 1,5% Agarosegel aufgetragen.

Nachdem die Expressionsanalysen der Gene *Trpm5* und *Tshb* diese Zelllinie für Stimulationsuntersuchungen qualifizierten, wurde der stimulatorische Effekt von TRH auf die *Tshb*-Expression untersucht. Bei erfolgreicher TRH-Stimulation war hier eine Steigerung zu erwarten, da die Zellen nach Sekretion von TSH den Verlust des sezernierten Proteins durch eine gesteigerte Synthese entsprechend ausgleichen sollten. Zur Durchführung wurden $6,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Schalen und Kulturmedium ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift und Wechsel des Mediums. Hierbei waren durch die Vorbehandlung mit Aktivkohle potentiell vorhandene Hormone im FCS herausgefiltert worden. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen im Anschluss für 24 h mit 0,1 μ M TRH stimuliert und die anschließende RNA-Isolation sowie cDNA-Synthese durchgeführt. Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin normiert und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Dort konnte lediglich eine minimale Reduktion der Expression um 3% verzeichnet werden, die im Rahmen des Schwankungsbereichs von $\pm 5\%$ lag. Somit konnte keine Veränderung in

der Genexpression von *Tshb* zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 3.6).

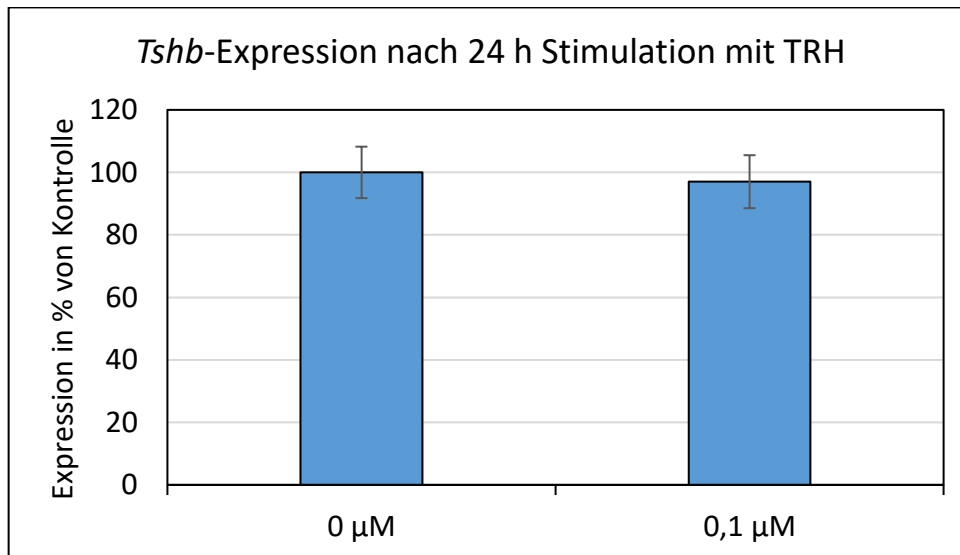


Abbildung 3.6 Expression von *Tshb* in *Tat1* nach 24 h Stimulation mit 0,1 µM TRH.

Dargestellt ist die *Tshb*-Expression in % nach Stimulation der Zellen für 24 h mit 0,1 µM TRH, normiert auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin sowie normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Die Gabe von 0,1 µM TRH zeigte 24 h nach Beginn der Stimulation lediglich einen noch im Schwankungsbereich liegenden Effekt auf die *Tshb*-Expression.

Daraufhin wurde der Stimulationsversuch auf die Inkubationszeiten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 12 h modifiziert und nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese die qRT-PCR durchgeführt. Zur Auswertung wurde auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin normiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Sie zeigte eine moderate Steigerung der *Tshb*-Transkription um ca. 19% bei 12 h Stimulation (Abbildung 3.7). Somit konnte eine prinzipielle Steigerung der *Tshb*-Expression als Folge der längeren TRH-Stimulation beobachtet werden, sodass die prinzipiellen Voraussetzungen für weitere Funktionsanalysen von *Trpm5* in dieser Zelllinie gegeben schienen.

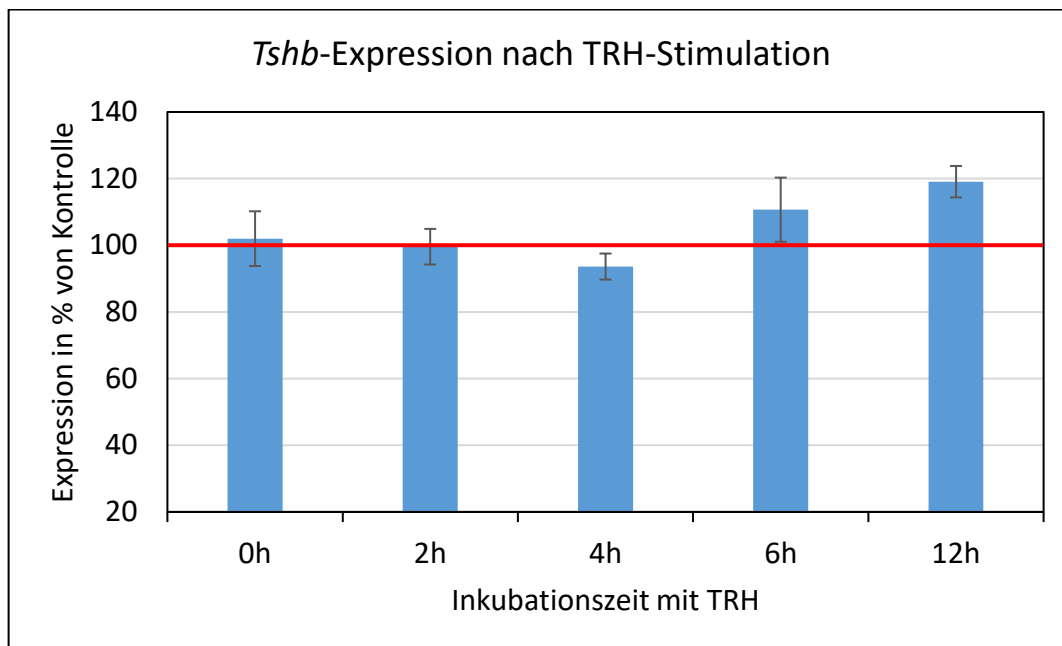


Abbildung 3.7 Expression von *Tshb* in *Tat1* nach definierten Inkubationszeiten mit 0,1 μM TRH.

Die Abbildung präsentiert die *Tshb*-Expression in % nach Stimulation der Zellen mit 0,1 μM TRH zu den Inkubationszeiten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 12 h bei Normierung auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin. Dabei wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, welche als 100% festgelegt wurde (rote Linie). 12 h nach Beginn der Stimulation ist eine Steigerung der *Tshb*-Transkription um ca. 19% zu beobachten.

Um den Einfluss von Trpm5 auf die TSH-Sekretion untersuchen zu können, wurde diese Zelllinie daraufhin mit einem Konstrukt transfiziert, welches ihr die dauerhafte, stabile Überexpression des Ionenkanals erlaubte. Das verwendete Vektorkonstrukt stand dem Labor aufgrund von Vorarbeiten bereits zur Verfügung. Es zeichnete sich durch ein pcDNA3-Rückgrat mit einem Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion positiver Bakterienklone sowie einem Neomycin-Resistenzgen zur Selektion erfolgreich transfizierter Säugerzellen aus (Abbildung 3.8). Letzteres ermöglicht die Inhibierung des Antibiotikums G418 und somit das Überleben derjenigen Zellen, welche das Konstrukt aufgenommen haben. Die Expression des Neomycin-Resistenzgens wird durch einen SV40-Promotor reguliert, während die Expression des Zielgens durch einen CMV-Promotor geregelt wird. Im verwendeten Konstrukt kodierte dieses für ein Fusionsprotein bestehend aus N-terminalem EGFP und C-terminalem humanem TRPM5. Das Konstrukt wurde daraufhin als pcDNA3-TRPM5/EGFP bezeichnet und wegen des Ligats von EGFP mit TRPM5 mit der Abkürzung PLE versehen. Aufgrund der stark übereinstimmenden Homologie des humanen und murinen TRPM5-Proteins

von 89,5% (Enklaar *et al.*, 2000) erschien dieses Konstrukt auch für Studien in den murinen Tct1-Zellen anwendbar.

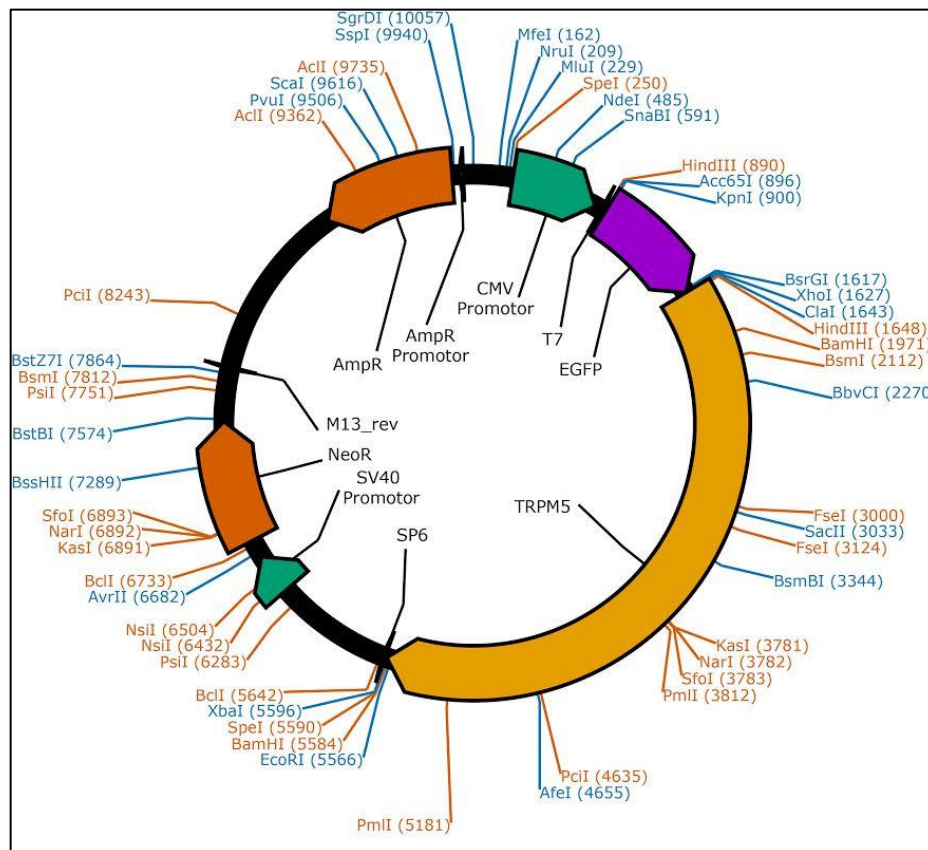


Abbildung 3.8 Vektorkarte des im Konstrukt verwendeten pcDNA3-Plasmids.

Das zur Verfügung gestellte Vektorkonstrukt pcDNA3-TRPM5/EGFP (PLE) bestand aus dem Plasmid pcDNA3 mit den beiden Resistenzgenen *AmpR* und *NeoR* (in der Vektorkarte orange). Das in die MCS klonierte Integrat kodiert für TRPM5 (gelb), welches N-terminal mit EGFP (violett) verbunden ist. Seine Expression unterliegt der Kontrolle eines CMV-Promotors. Promotoren weisen in der Vektorkarte eine grüne Farbkodierung auf. Vor Durchführung der stabilen Transfektion wurde der Vektor mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI linearisiert, welches im Bereich des *AmpR*-Gens schneidet. Vektorkarte erstellt über: PlasmaDNA, <https://www.plasmadna.net/>.

Zur Kontrolle in den folgenden Funktionsstudien erfolgte parallel die stabile Transfektion mit einem Konstrukt aus pcDNA3 und EGFP. Auf diese Weise sollte ein möglicher Einfluss von EGFP in den Versuchen erkennbar gemacht werden. Dieses Vektorkonstrukt wurde mit dem Namen pcDNA3-EGFP (PE) versehen.

Die Durchführbarkeit der stabilen Transfektion dieser Zellen erwies sich als äußerst schwierig und langwierig. Da die Zellen sehr empfindlich auf den Einsatz von Transfektionsreagenzien reagierten, mussten G418-Titrationskurven für eine sensitive

Selektion der Zellen durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.4.7). Zur Durchführung dieser Titrationskurve wurden untransfizierte Zellen im 6-Well Format ausgesät und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne und mit je 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml G418 versetzt. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Selektionsmedium erneuert und nach 10 bis 14 Tagen die Überlebensrate der Zellen durch Auswertung am Lichtmikroskop ausgewertet. Vollständiger Zelltod konnte nach 12 Tagen bei Verwendung von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml G418 beobachtet werden (Abbildung 3.9). Daher wurde zur Selektion dieser Zelllinie für die nachfolgenden Transfektionen eine G418-Konzentration von 0,5 mg/ml verwendet.

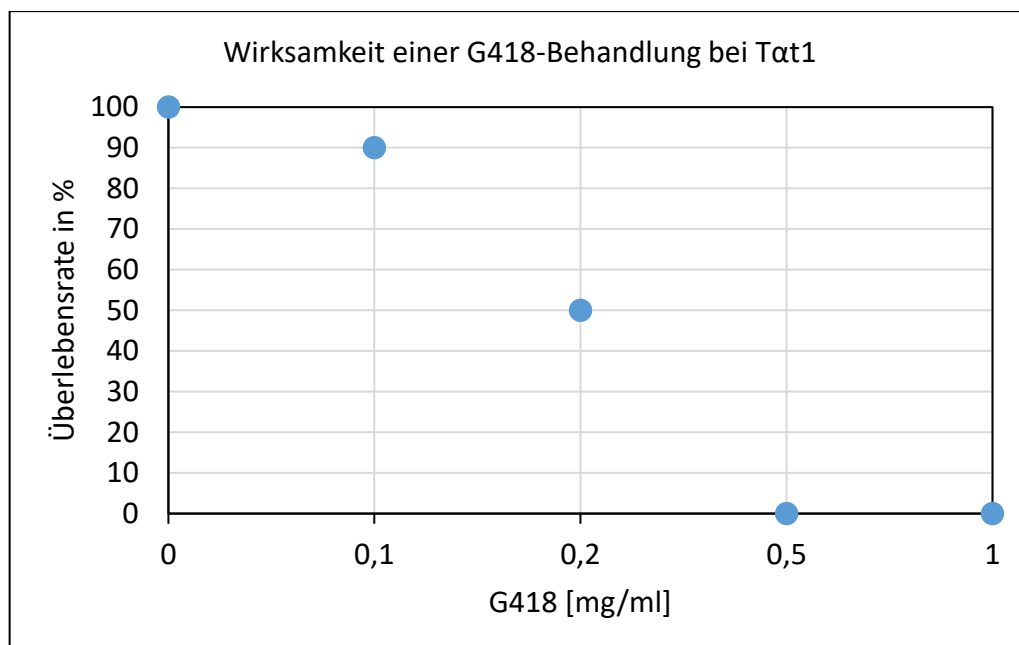


Abbildung 3.9 Überlebenskurve der Zelllinie Tat1 in Abhängigkeit der eingesetzten G418-Konzentration.

Dargestellt ist die Überlebensrate in % von Tat1 nach 12-tägiger Behandlung mit je 0 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml G418. Sie wurde anhand lichtmikroskopischer Vergleiche mit der unbehandelten Kontrolle festgehalten. 0,5 mg/ml und 1 mg/ml G418 erzielten innerhalb dieses Zeitraums eine ausreichend selektive Wirkung des Antibiotikums.

Nachdem die geeignete Antibiotika-Konzentration zur Selektion transfizierter Tat1-Zellen bestimmt worden war, wurde mit der stabilen Transfektion der beiden vorgestellten Konstrukte PE und PLE in diese Zellen begonnen. Sie konnten letztlich durch zwei unterschiedliche Vorgehensweisen stabil in die Zelle integriert werden. Dazu wurden sie vor Transfektionsbeginn mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI

linearisiert (siehe Kapitel 2.1.9), welches in dem nicht mehr benötigten Bereich des Ampicillin-Resistenzgens schneidet. Nachdem der Verdau mittels des *QIAquick PCR Purification Kits* der Fa. QIAGEN aufgereinigt und auf einem Agarosegel hinsichtlich seiner Effektivität überprüft worden war, fand die stabile Transfektion der Tat1-Zellen statt. Zur Integration von PLE wurden je ca. 6% Zellrasen einer konfluenten 15 cm Schale abgelöst, im 6 cm Format ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die anschließende Transfektion wurden 4 µg des Plasmids mit 400 µl *jetPRIME Buffer* verdünnt und dann mit 12 µl *jetPRIME* versetzt. Nach Vortexen und 10 min Inkubation bei RT wurde der gesamte Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. 44 h nach Transfektion wurden die Zellen auf 15 cm Schalen überführt und am darauffolgenden Tag mit der Selektion durch Gabe von 0,5 mg/ml G418 begonnen. Der Erfolg der Transfektion wurde mit Hilfe des EGFP-Tags am Fluoreszenzmikroskop überprüft und am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop aufgezeichnet. Letzteres ließ gleichzeitig eine Aussage über die Lokalisation des Proteins zu. PLE konnte demnach insbesondere eine membranöse Lokalisation zugeordnet werden (Abbildung 3.10). Anschließend wurden die erfolgreich transfizierten Zellklone unter Antibiotika-Selektion als Mischpool kultiviert.

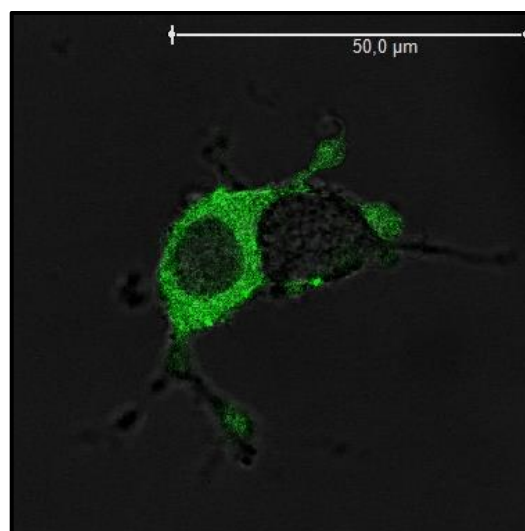


Abbildung 3.10 Lokalisation von PLE in Tat1-Zellen.

Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop. Sie bestätigte den Erfolg der Transfektion und zeigte eine membranständige Lokalisation von pcDNA3-TRPM5/EGFP.

Um das PE-Konstrukt in die Zellen einzubringen, wurden ca. 33% Zellrasen einer 10 cm Schale auf eine 10 cm Schale ausgesät und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 10 µg des Plasmids mit 460 µl DMEM gemischt und mit 40 µl *Fugene HD* versetzt. Nach Vortexen erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT und die tröpfchenweise Zugabe der Transfektionskomplexe. Nach 22 h wurden die transfizierten Zellen mit G418 versetzt. Die Selektion erfolgte über mehrere Wochen mit 0,05 bis 0,5 mg/ml des Antibiotikums, dessen Konzentration in Abhängigkeit des Zellzustands angepasst werden musste. Danach wurden die transfizierten Zellen durch Gabe von 0,5 mg/ml G418 als Mischpool aufrechterhalten. Der Erfolg der Transfektion wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskop und Konfokalem *Laser Scanning* Mikroskop überprüft und festgehalten. Dort zeigte sich, dass das Protein von PE wie zu erwarten vor allem cytoplasmatisch verteilt ist (Abbildung 3.11).

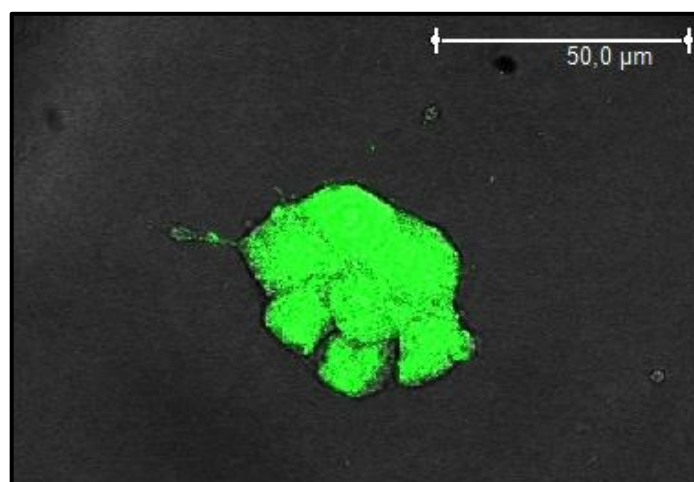


Abbildung 3.11 Lokalisation von PE in Tst1-Zellen.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop zeigte die gelungene Transfektion mit PE und eine cytoplasmatische Verteilung des Proteins.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl PLE als auch die Kontrolle PE stabil in Tst1 eingebracht werden konnten, wurde der Einfluss von TRPM5 auf die *Tshb*-Expression nach TRH-Stimulation untersucht. Dazu wurden je $6,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Schalen gegeben und unter Verwendung von Kulturmedium für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde auf Medium umgestellt, welches ausschließlich Aktivkohle-behandeltes FCS enthielt. Danach wurden die

Zellen für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor sie anschließend mit 0,1 µM TRH für 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 12 h stimuliert wurden. Für die Dauer des gesamten Versuches wurde kein Selektionsantibiotikum gegeben. Abschließend erfolgte die RNA-Isolation sowie cDNA-Synthese und Auswertung mittels qRT-PCR. Hierfür wurde auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin normiert und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Nach einer anfänglichen Reduktion konnte sowohl in der Kontrolle als auch für PLE eine gesteigerte Expression von *Tshb* beobachtet werden, die bei PLE jedoch deutlich verstärkt und zu einem früheren Zeitpunkt auftrat. Bereits 4 h nach Beginn der TRH-Stimulation konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Steigerung um ca. 56% in den *TRPM5*-überexprimierenden Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.12). Dagegen zeigte die EGFP-Kontrolle erst nach 12 h eine den untransfizierten Zellen ähnliche, gemäßigte Steigerung um ca. 18% (vgl. Abbildung 3.7).

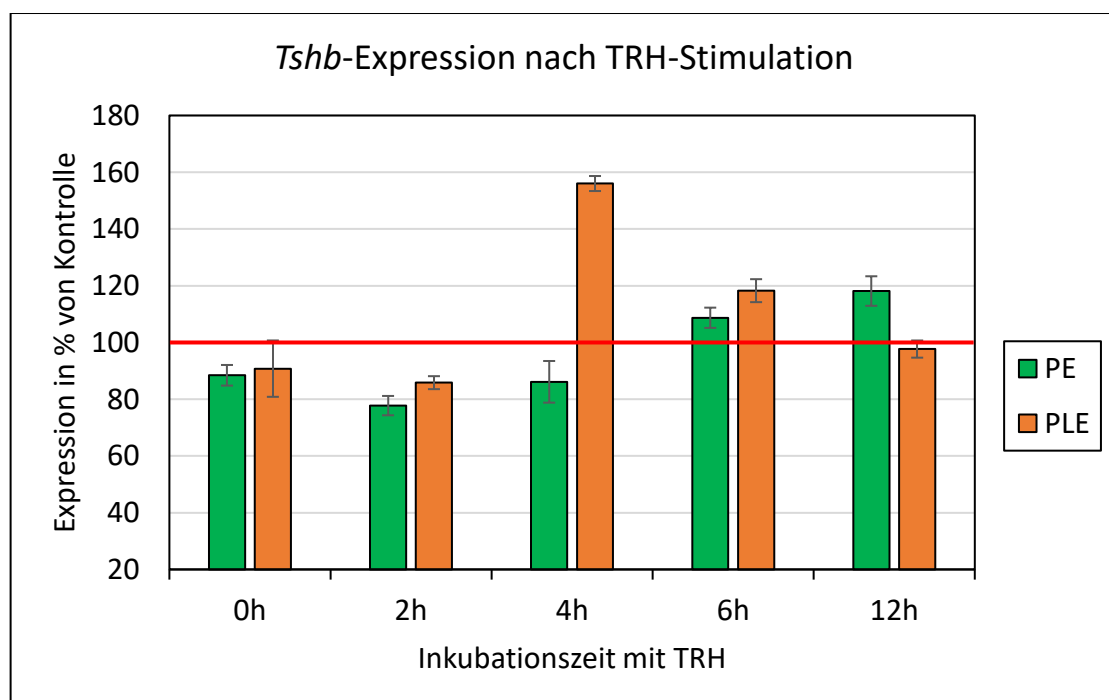


Abbildung 3.12 Expression von *Tshb* in *TRPM5*-überexprimierenden Tat1 (PLE) im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (PE) nach Stimulation mit 0,1 µM TRH.

Dargestellt ist die *Tshb*-Expression in % nach Stimulation der Zellen mit 0,1 µM TRH zu den Inkubationszeiten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h. Dazu wurde auf die Haushaltsgene β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin normiert und anschließend auf die unbehandelten Zellen normalisiert (rote Linie, 100%). *TRPM5*-überexprimierende Zellen zeigten bereits 4 h nach Gabe von TRH eine Steigerung der *Tshb*-Expression um ca. 56%, während die EGFP-Kontrolle 12 h nach Stimulationsbeginn mit einer moderaten Steigerung der Expression um ca. 18% reagierte.

Somit ergab die Auswertung der Expressionsanalyse, dass die Überexpression von *TRPM5* in *Tat1* nach 4 h Inkubationszeit mit TRH zu einer erhöhten und früheren Expressionssteigerung von *Tshb* führte. Daher wurde in darauffolgenden Versuchen die Stimulation der stabil transfizierten Zellen mit TRH durchgeführt, um im Anschluss das in den Überstand sezernierte TSH mit Hilfe eines ELISAs zu quantifizieren. PE- und PLE-überexprimierende *Tat1* wurden hierfür im 6-Well Format ausgesät. Dabei wurde Medium ohne Phenolrot verwendet, um einen möglichen *Bias* des Farbstoffs in der nachfolgenden Analyse zu verhindern. Außerdem wurde Aktivkohle-behandeltes FCS eingesetzt, sowie auf die Gabe von G418 während des gesamten Versuchs verzichtet. Nachdem die Zellen für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert worden waren, wurden sie mit 0,1 µM TRH für 0 min, 5 min und 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe des *Rat TSH ELISA Kits* der Firma Shibayagi Co. aufgearbeitet und bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert. Dieses Kit erwies sich aufgrund 100%iger Kreuzreaktivität mit murinem TSH für die Aufarbeitung als geeignet.

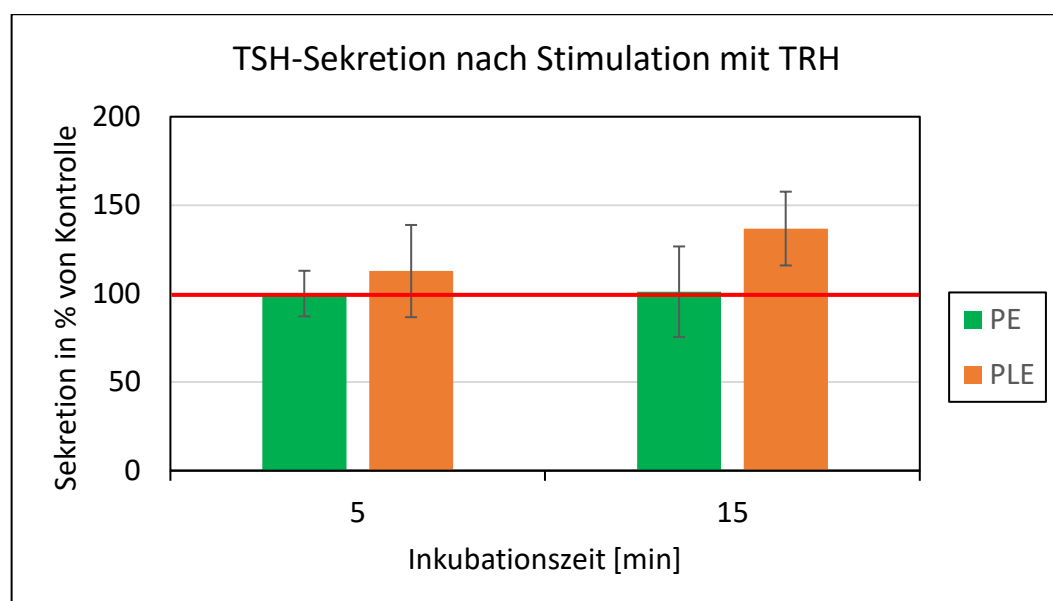


Abbildung 3.13 Sekretion von TSH in *TRPM5*-überexprimierenden *Tat1* (PLE) im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (PE) nach Stimulation mit 0,1 µM TRH.

Zu sehen ist die TSH-Sekretion in % nach Stimulation mit 0,1 µM TRH. Die Zellen wurden für 0 min, 5 min und 15 min mit TRH inkubiert und der Überstand mittels ELISA analysiert. Zur Auswertung wurden Messungen von vier unabhängigen Versuchen einbezogen und auf die Werte der Inkubationszeit 0 min normalisiert. Dies entspricht 100% und wird durch die rote Linie repräsentiert. Während die EGFP-Kontrolle mit keiner Änderung in der TSH-Sekretion reagiert, konnte in den *TRPM5*-überexprimierenden Zellen eine tendenzielle Steigerung der Sekretion beobachtet werden.

Zur Auswertung wurden die Werte der fünf- und fünfzehnminütigen Inkubation auf den 0 min Wert normalisiert. Die gemessenen Werte befanden sich nahe der detektierbaren Nachweisgrenze. Es konnte jedoch eine tendenzielle Steigerung in den *TRPM5*-überexprimierenden Zellen beobachtet werden, welche 15 min nach Beginn der TRH-Stimulation auf ca. 137% anstieg. Dagegen konnte in der Kontrolle kein verändertes Sekretionsverhalten beobachtet werden (Abbildung 3.13). Somit konnte in den *TRPM5*-überexprimierenden Zellen neben einer gesteigerten und früheren *Tshb*-Expression eine tendenziell erhöhte TSH-Sekretion nach TRH-Stimulation beobachtet werden. Im Vergleich wies die EGFP-Kontrolle eine schwächere Expressionssteigerung des *Tshb*-Gens sowie keinerlei gesteigerte Hormonsekretion auf.

3.2.3 Sequenzierungsanalyse des *TRPM5*-Gens bei Patienten mit reduziertem fT4- sowie reduziertem TSH-Spiegel

Da die Serumanalysen im *Knockout* Mausmodell auffällige Reduktionen sowohl im fT4- als auch im TSH-Spiegel aufwiesen und auch im Zellkulturmodell Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Joachim Pohlenz der pädiatrischen Endokrinologie in Mainz DNA-Proben von neun Patienten analysiert. Diese Patienten zeichneten sich alle durch pathogene Reduktionen der fT4- und TSH-Serumspiegel aus, für die Mutationen von typischen Kandidatengenen als Ursache ausgeschlossen werden konnten. Entsprechend den Beobachtungen in den *Knockout* Mäusen lag als mögliche Erklärung für die auffälligen fT4- und TSH-Werte eine *Loss-of-Function*-Mutation im *TRPM5*-Gen nahe. Aus diesem Grund wurden Oligonukleotide in die Intronbereiche des *TRPM5*-Gens gelegt, sodass der kodierende Bereich des Gens sowie die für das Spleißen notwendigen, flankierenden Konsensussequenzen komplett amplifiziert und sequenziert werden konnten. Die Auswertung der Sequenzierung identifizierte insgesamt 22 Basenaustausche sowie vier Baseninsertionen und eine Basendeletion im Intronbereich. Da sich diese Änderungen in keiner für das alternative Spleißen konservierten Sequenz vorfanden, scheinen diese keine offensichtliche Konsequenz für die Proteinsynthese zu besitzen.

Zusätzlich wurde bei einem der neun Patienten eine Insertion von 60 Basen mit 70%igem GC-Anteil im zweiten Intron von TRPM5 beobachtet (Abbildung 3.14). Diese konnte mit hoher Übereinstimmung in der unmittelbar darauffolgenden Sequenz desselben Introns noch zwei weitere Male identifiziert werden. Dabei konnte die Insertion durch die Sequenz der ersten bzw. zweiten Übereinstimmung in 59 von 60 (98,3%) bzw. 40 von 60 (66,7%) Basen abgedeckt werden („*query coverage*“), und zeigte innerhalb dieser Abdeckung jeweils ~91,5% bzw. 92,5% Basenidentität zur beobachteten Baseninsertion („*maximum percent identity*“). Weitere, genomweite Übereinstimmungen konnten mittels *BLASTN* nicht detektiert werden. Da diese Insertion durch Abgleich mit Mutationsdatenbanken keinen Treffer erzielte, scheint die vorliegende Dissertation diese erstmalig zu beschreiben.

GGCCACTCTCCTCCTGCTA	CCTGCCCCAATGCCAGCACCTCCCCGGTACCCCCGTGTGTC	TRPM5_2F
CAGCCCCCTTGATGCCAGCACCTCCAGTGCCAGTGTC	CCCCCATGCTCAGCACCTCCC	Intron 1
CAGTGCCCCCTTGTGTCCAGCCCCCAATGCCAGCAGTCCC	ATGCCCGTGCCCCGA	
AAGCCCTGAGCTGCAGACCTGCCTTGCAG	TTGTACGGGTGCCGAGCGGAGTGGCCCCGTC	Exon 2
TGTGCTCTTTGACCTGCTGCTTGCTGAGTGGCACCTGCCGGCCCCAACCTGGTGGTGTCC	CTGGTGGGTGAGGAGCAGCCTTTCGCCATGAAGTCCTGGCTGCGGGATGTGCTGCGCAAGG	
GGCTGGTGAAGGCGGCTCAGAGCACAG	GTGAGGCCCCACCCGGCACAGGCAGCGCTCCAC	
CCCACAGGGCAGCCCGACCCCTGACTGTCCCCGCAACCCGGCACAGGCAG	TGCTCCCACC	Insertion
CCACAGGGCAGCCCGACCCCTGACTGTCCCCGCAACCTGGCACAGGCAA	TGCTCCCACCC	Intron 2
CACAGGGCAGCCAGACCCCTGACTCTCCCCCACCCGGCACAGGCAATGCTCCCACCCCA	CACGGCAGCCAGACCCCTGACTC	TRPM5_2R
	TCCAGGCCATCACGAGAACA	

Abbildung 3.14 Polynukleotid-Insertion eines Patienten mit pathogener fT4- und TSH-Reduktion im zweiten Intron von *TRPM5*.

Die beobachtete Polynukleotid-Insertion ist im Kontext der durch die Oligonukleotide TRPM5_2F und TRPM5_2R amplifizierten Region dargestellt. Türkis: Oligonukleotidsequenz von TRPM5_2F, Rot: Exon 2, Gelb: Polynukleotid-Insertion, Rosa: Oligonukleotidsequenz von TRPM5_2R. Unmarkierte Basen zeigen die jeweilig übrige Intronsequenz.

Auch hier zeigte sich kein offensichtlicher Effekt auf das Spleißen des Transkripts. Daneben fanden sich insgesamt neun Polymorphismen im kodierenden Bereich, die alle jeweils einer bei NCBI hinterlegten *Single Nucleotide Polymorphism* Identitätsnummer (SNP ID) zugeordnet werden konnten. Tabelle 3.1 fasst die Gegebenheiten der gefundenen Polymorphismen in einer Übersicht zusammen.

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der gefundenen Polymorphismen im Genbereich von *TRPM5*.

Gegenübergestellt sind Lokalisation der gefundenen Polymorphismen innerhalb des *TRPM5*-Gens und bezüglich Chromosom 11 (*Human Genome Assembly* GRCh38.p10), *Reference SNP ID* laut NCBI, *Minor Allele Frequency* (abgerufen in *Forward* Orientierung des Genoms von www.ensembl.org), Häufigkeit der gefundenen Genotypen in % und, soweit zutreffend, der Effekt des Polymorphismus auf die Aminosäure-Translation. SNP-Allele sind bezüglich des Genoms in reverser Orientierung angegeben. Untersucht wurde ein Kollektiv von neun Patienten. Chr.: Chromosom, eh.: ehemals, SNP ID: *Single Nucleotide Polymorphism* Identitätsnummer, MAF: *Minor Allele Frequency*.

Lokalisation des Polymorphismus	SNP ID	MAF	Häufigkeit des Genotyps im Kollektiv in %		Effekt des Polymorphismus auf Aminosäure
<i>TRPM5</i> Intron 1, Chr. 11:2422864	rs2301699	C = 0,27	G/G C/G C/C	55,56 44,4 0	-
<i>TRPM5</i> Exon 5, Chr. 11:2418537	rs886277 (eh. rs56695969)	A = 0,46	G/G A/G A/A	66,67 33,3 0	G → Serin A → Asparagin
<i>TRPM5</i> Exon 6, Chr. 11:2418326	rs2074235	A = 0,02	G/G A/G A/A	88,89 11,1 0	G → Prolin A → Prolin
<i>TRPM5</i> Exon 6, Chr. 11:2418312	rs3986599	T = 0,16	C/C C/T T/T	88,89 11,1 0	C → Alanin T → Valin
<i>TRPM5</i> Exon 7, Chr. 11:2417733	rs34350821	T = 0,04	G/G G/T T/T	77,78 22,2 0	G → Valin T → Leucin
<i>TRPM5</i> Exon 9, Chr. 11:2415329	rs80326119	A < 0,01	G/G A/G A/A	88,89 11,1 0	G → Arginin A → Histidin
<i>TRPM5</i> Exon 9, Chr. 11:2415234	rs34551253	A = 0,01	G/G A/G A/A	88,89 11,1 0	G → Alanin A → Threonin
<i>TRPM5</i> Exon 11, Chr. 11:2414726	rs4929982 (eh. rs56720767)	G = 0,47	A/A A/G G/G	66,67 33,3 0	A → Glutamin G → Arginin
<i>TRPM5</i> Exon 17, Chr. 11:2411734	rs2074234	G = 0,33	A/A A/G G/G	44,4 44,4 11,1	A → Threonin G → Threonin
<i>TRPM5</i> Exon 18, Chr. 11:2411436	rs34364959	A = 0,05	G/G A/G A/A	88,89 11,1 0	G → Glycin A → Serin

ihren Austausch ausschließlich Aminosäuren vor der ersten Transmembrandomäne betroffen waren.

Zusätzlich sollten die Patienten-DNAs auf den Polymorphismus rs2301699 untersucht werden, welcher bereits mit einem prädiabetischen Phänotyp assoziiert wurde (Ketterer *et al.*, 2011). Dies sollte eine potentiell generelle Prädisposition für Störungen in der Hormonsekretion als Folge des Polymorphismus verifizieren. Dabei zeigten 55,56% der Patienten den homozygoten Genotyp des Wildtyps. 44,4% der Patienten waren heterozygot, während der prädiabetische Polymorphismus bei keinem Patienten homozygot vorlag (Tabelle 3.1). Der Polymorphismus konnte somit nicht eindeutig mit einem präthyreotischen Effekt assoziiert werden.

3.3 Untersuchungen zur Funktion von TRPM5 in der parafollikulären Hormonsekretion

Dot Northern Blot Analysen hatten eine Expression von *TRPM5* im Schilddrüsengewebe nachgewiesen (Prawitt *et al.*, 2000), jedoch konnte in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schilddrüsenepithelzellen keinerlei endogene Expression des Ionenkanals festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.2). Daher stellte sich die Frage, wie die publizierten Daten zu erklären seien. Eine mögliche Erklärung hierfür war, dass *TRPM5* in diesem Gewebe nicht in den wesentlich häufigeren Epithelzellen in der Schilddrüsenhormonsekretion involviert ist, sondern stattdessen eine Rolle in der Hormonsekretion der selteneren parafollikulären C-Zellen spielen könnte. Diese sind insbesondere für die Sekretion des Hormons Calcitonin in Folge eines hohen Blutcalciumspiegels verantwortlich. Daher wurde zunächst RNA aus medullären Schilddrüsenkarzinomen (engl. *medullary thyroid cancer*, MTC) isoliert und nach cDNA-Synthese expressionsanalytisch untersucht. Da sich diese Karzinome aus den C-Zellen entwickeln und sich durch eine erhöhte Calcitonin-Sekretion ausweisen, stellen diese Gewebe ein ideales Untersuchungsmaterial für Korrelationsanalysen bezüglich der Expression von *TRPM5* und *Calcitonin* (*CALCA*) dar. Insgesamt konnten acht Gewebeproben von sieben Patienten mit MTC durch die Endokrine Chirurgie der Universitätsmedizin Mainz unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Musholt zur Verfügung

gestellt und untersucht werden. Dabei handelte es sich in der Mehrzahl der Proben um sporadisch entstandene MTCs. Drei weitere entstammten von Patienten mit dem sogenannten MEN2-Syndrom, welches in der Regel mit der Bildung von MTCs einhergeht und durch eine Keimbahnmutation im *RET*-Protoonkogen verursacht wird. Je nach Begleitsymptomen und Position der Mutation wird dabei zwischen MEN2A und MEN2B unterschieden. Zwei der untersuchten MEN2-Proben stammten von MEN2B-Patienten, während die dritte Probe von einem MEN2A-Patienten entnommen worden war.

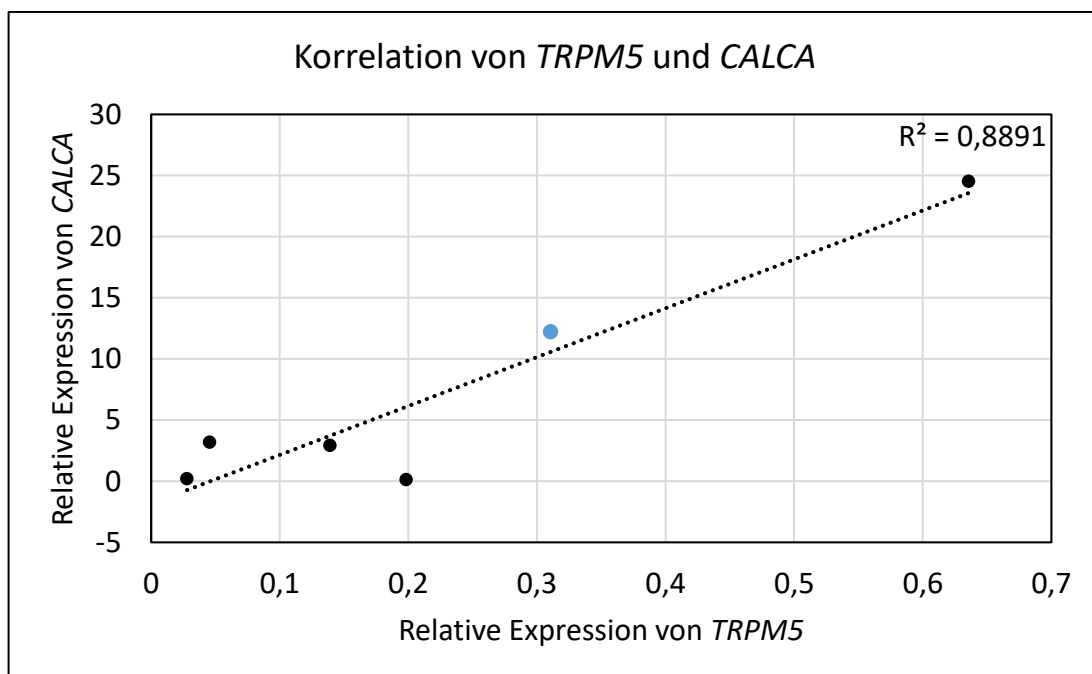


Abbildung 3.16 Korrelationsanalyse bezüglich der Genexpression von *TRPM5* und *CALCA*.

Die Abbildung zeigt die Auswertung der Korrelationsanalyse von sechs MTC-Gewebeproben bezüglich ihrer *TRPM5*- und *CALCA*-Expression. Dazu wurde die Expression der beiden Gene auf die Expression der Haushaltsgene *B2M*, *HPRT*, *TBP*, *ATP5J* und *PPIA* abgeglichen. Analytierte Proben sporadischer Tumore sind durch schwarze Markierungspunkte, die Gewebeprobe des MEN2A-Patienten durch einen blauen Markierungspunkt dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beschreibt den linearen Zusammenhang der analysierten Proben. Die Korrelation konnte so auf eine Genauigkeit von 88,91% bestimmt werden.

Zur Auswertung der qRT-PCR-Analysen wurde auf die Haushaltsgene β 2-Mikroglobulin (*B2M*), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*), TATA-Bindeprotein (*TBP*), F_0F_6 -Untereinheit der ATP-Synthase (*ATP5J*) und Peptidylprolyl-Isomerase A (*PPIA*) normiert. Diese zeigte bei den beiden Gewebeproben der MEN2B-Patienten keinerlei Korrelation zwischen der Genexpression von *TRPM5* und

CALCA (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte die *TRPM5*-Expression in den untersuchten sporadischen Tumoren sowie in der Gewebeprobe des MEN2A-Patienten mit der Expression des *CALCA*-Gens korreliert werden (Abbildung 3.16), was als Indiz für eine physiologische Funktion von *TRPM5* in den C-Zellen diente.

Um diese Funktion besser charakterisieren zu können, wurde nach einer geeigneten humanen Zelllinie parafollikulären Ursprungs gesucht. Eignungskriterien für weitere Analysen waren die Expression von *TRPM5* sowie *CALCA* und die Stimulierbarkeit der Calcitoninsekretion durch CaCl_2 . Hierfür kam die humane Zelllinie TT in Frage, welche aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom hergestellt worden war. Nachdem sie von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen worden war, wurde sie zunächst auf ihre Eignung getestet.

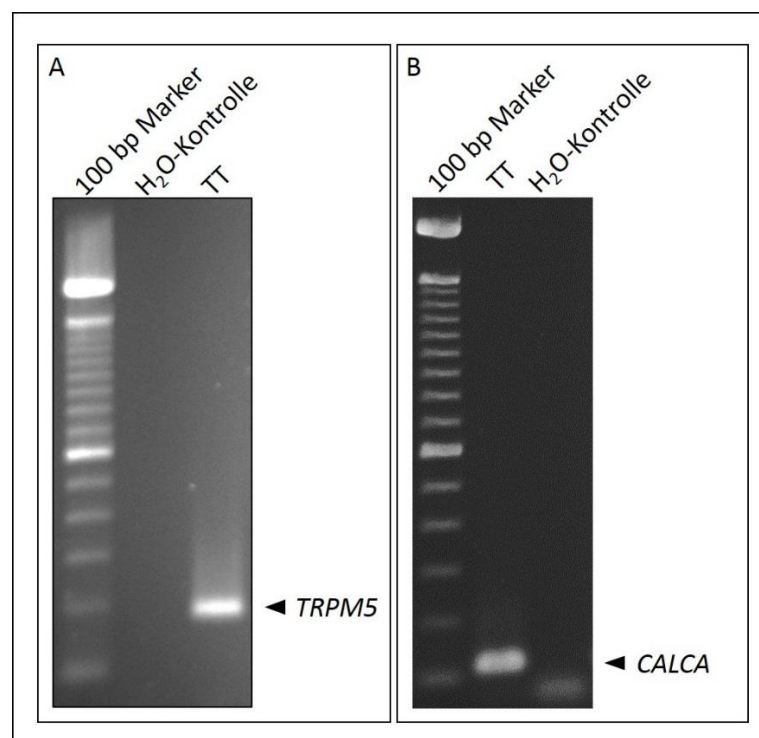


Abbildung 3.17 Expression von *TRPM5* und *CALCA* in TT-Zellen.

Die Abbildung zeigt (A) das mit den Oligonukleotiden *TRPM5*_16F und *TRPM5*_18R generierte qRT-PCR-Produkt von *TRPM5* mit einer Größe von 177 bp und dazugehörige Negativkontrolle, sowie (B) das 110 bp große Produkt des *CALCA*-Gens, das mit den Oligonukleotiden *CT*_F und *CT*_R generiert wurde, und entsprechende Negativkontrolle. Zum Größenvergleich ist der 100 bp Marker aufgetragen. Je 5 μl PCR-Reaktion und Marker sind auf das 1,5% Agarosegel aufgetragen.

qRT-PCR Analysen von zehnfach verdünnter cDNA der Zelllinie wiesen eine relativ

starke Expression des *TRPM5*-Ionenkanals mit einem CP von 27,63 auf. Überprüfung auf einem 1,5% Agarosegel bestätigte das Produkt mit einer erwarteten Bande bei 177 bp (Abbildung 3.17A). Eine sehr starke Expression konnte auch für das Gen *CALCA* nachgewiesen werden, da für zwanzigfach verdünnte cDNA der Zelllinie in der qRT-PCR Analyse ein CP von 17,74 dokumentiert werden konnte. Das auf einem 1,5% Agarosegel aufgetragene Produkt wurde wie erwartet mit einer Größe von 110 bp detektiert und ist in Abbildung 3.17B dargestellt.

Damit waren die Voraussetzungen für eine funktionelle Relevanz von *TRPM5* in der Hormonsekretion dieses Zelltyps erfüllt, sodass die Zelllinie anschließend auf ihre Stimulierbarkeit durch CaCl_2 getestet wurde. Dazu wurden 1×10^5 Zellen im 24-Well Format ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 mM und 6 mM CaCl_2 bzw. keine Zugabe bei der Kontrolle. Nach 0 min, 1 min, 10 min, 20 min und 30 min sowie nach 1 h, 1,5 h, 2 h, 6 h und 24 h erfolgte die Abnahme des Überstands, welcher anschließend im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz bezüglich seiner Calcitonin-Konzentration gemessen wurde. Für die Dauer des gesamten Versuches wurde Phenolrot-freies Medium verwendet, um mögliche Einflüsse auf die nachfolgende Messmethode zu verhindern, sowie Aktivkohle-behandeltes FCS eingesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Daten zeigte unter Verwendung von 6 mM CaCl_2 nach 0 min und 1 min, sowie nach 1,5 h bis 24 h eine deutlich erhöhte Sekretion um ~ 60% - 145%. Die Messwerte der Zeitpunkte 1 h und 6 h wiesen dabei Schwankungen auf. Dagegen hatte der Einsatz von 3 mM CaCl_2 nach 0 min eine um 123% erhöhte Sekretion sowie nach 1 min und 1 h bis 24 h eine gemäßigte Steigerung um ~ 50% - 67% zur Folge (Abbildung 3.18). Mit beiden CaCl_2 -Konzentrationen konnte demnach eine konzentrationsabhängig gesteigerte Calcitonin-Sekretion induziert werden. Damit sind alle vorausgesetzten Eignungskriterien für nachfolgende Analysen zur Rolle von *TRPM5* in der Calcitoninsekretion erfüllt.

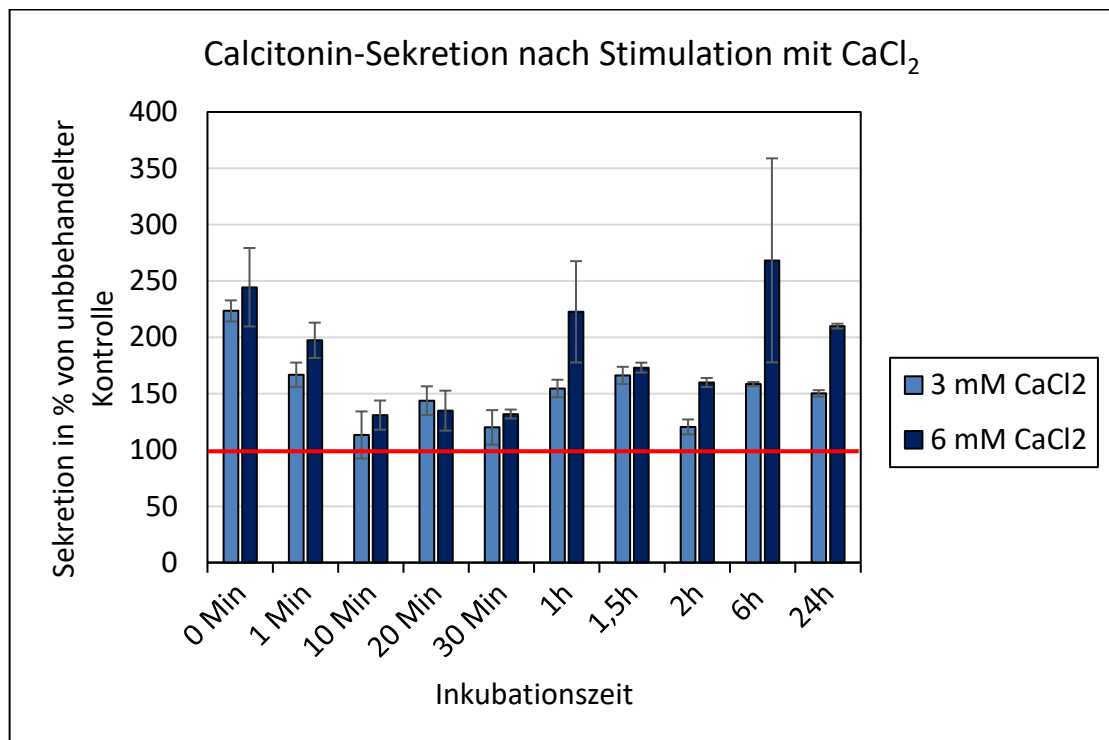


Abbildung 3.18 Sekretion von Calcitonin in nativen TT-Zellen nach Stimulation mit 3 mM und 6 mM CaCl₂.

Dargestellt ist die Calcitonin-Sekretion in % nach Stimulation mit 3 mM und 6 mM CaCl₂. Die Zellen wurden für 0 min, 1 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 6 h und 24 h mit CaCl₂ inkubiert und der Überstand anschließend vom Zentrallabor bezüglich seiner Calcitonin-Konzentration analysiert. Zur Auswertung wurden Messungen von zwei unabhängigen Versuchen einbezogen und auf die Werte der unbehandelten Kontrolle normalisiert (= 100%, rote Linie).

Um diese näher zu untersuchen, sollte der Ionenkanal in dieser Zelllinie stabil überexprimiert werden. Hierfür wurde sich des bereits vorgestellten Konstrukts PLE bedient (siehe Kapitel 3.2.2). Zur Feststellung eines möglichen Effekts durch EGFP wurde parallel der Kontrollvektor PE stabil in diese Zelllinie eingebracht. Um die empfindlichen Zellen nach erfolgter Transfektion möglichst sensitiv mit G418 zu selektionieren, wurde zunächst eine Titrationskurve bezüglich dieses Antibiotikums durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden untransfizierte Zellen im 24-Well Format ausgesät und nach 26 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ mit verschiedenen G418-Konzentrationen behandelt. Dabei wurde die Empfindlichkeit der Zelllinie auf 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml G418 getestet. Um die Wirkung des Antibiotikums aufrecht zu erhalten, wurde alle 2 bis 4 Tage das Selektionsmedium gewechselt. Nach 12 Behandlungstagen wurde die Überlebensrate der Zellen mit Hilfe des Lichtmikroskops bestimmt. Alle G418-Konzentrationen $\geq 0,2$

mg/ml zeigten dabei vollständigen Zelltod (Abbildung 3.19). Deshalb wurde in den nachfolgenden Transfektionen mit 0,2 – 0,5 mg/ml G418 selektioniert.

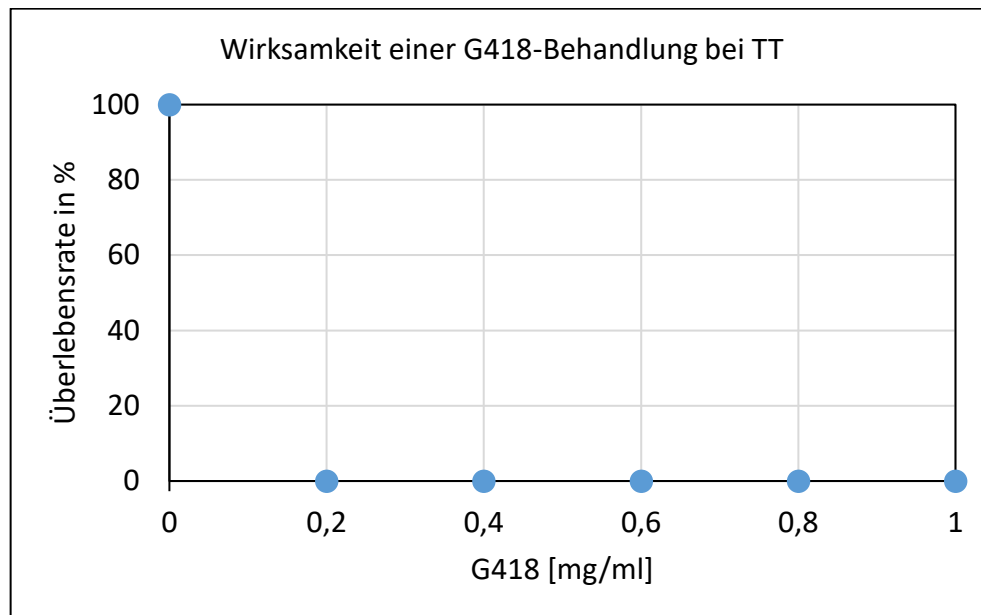


Abbildung 3.19 Überlebenskurve der Zelllinie TT in Abhängigkeit der eingesetzten G418-Konzentration.

Die Abbildung zeigt die Überlebensrate in % von TT nach 12 Tagen Behandlungszeit mit je 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml G418. Sie wurde durch lichtmikroskopische Auswertung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgehalten. Konzentrationen $\geq 0,2$ mg/ml G418 zeigten innerhalb dieses Zeitraums vollständigen Zelltod durch das Antibiotikum.

Nach Bestimmung der optimalen Antibiotika-Konzentration wurde die Zelllinie mit den beiden Konstrukten PE und PLE stabil transfiziert. Zur Durchführung wurden PE und PLE mit dem Restriktionsenzym PvuI linearisiert und mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Fa. QIAGEN aufgereinigt. Nachdem der Verdau auf einem Agarosegel hinsichtlich seiner Effektivität überprüft worden war, wurden die beiden Konstrukte stabil in die TT-Zellen eingebracht. Um ihre Integrationschance nach Bestimmung des optimalen Transfektionsreagenz zu erhöhen, wurden drei verschiedene Transfektionsansätze durchgeführt, die zu einem späteren Zeitpunkt zur Steigerung der Zelldichte vereinigt wurden. Es wurden je $0,5 \times 10^6$ bzw. 1×10^6 und $1,5 \times 10^6$ Zellen im 6-Well Format ausgesät und für 48 h bzw. 5 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Durchführung der Transfektion wurde das Reagenz *Fugene HD* der Fa. Promega verwendet, welches in Vorversuchen an diesen Zellen die höchste Transfektionseffizienz gezeigt hatte (Daten nicht gezeigt). 2 μg des Plasmids wurden

mit Zusatz-freiem Grundmedium auf ein Endvolumen von 100 μ l verdünnt und nach Mischen mit 8 μ l *Fugene HD* versetzt. Nach Vortexen wurden die Ansätze für 15 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. 50 - 72 h nach Transfektion wurde mit der Selektion durch G418 begonnen. Das von Grund auf sehr langsame Wachstum dieser Zelllinie wurde durch den Selektions-bedingten Einbruch der Zelldichte zusätzlich stark verzögert, sodass vorübergehend mit konditioniertem Kulturmedium gearbeitet werden musste. Hierzu wurde Kulturmedium, welches 3 – 5 Tage mit den schneller wachsenden, untransfizierten TT-Zellen inkubiert worden war, sterilfiltriert und mit einem gleichen Volumenanteil an frischem Kulturmedium verdünnt. Dies sollte das Wachstum durch im Medium vermehrt vorhandene Wachstumsfaktoren verstärken. Der Erfolg der Transfektion wurde abschließend am Fluoreszenzmikroskop überprüft und gemeinsam mit der Lokalisation des Proteins am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop bestimmt. Entsprechend der bereits beschriebenen Aufnahmen der Tat1-Zellen konnte PLE in der TT-Zelllinie ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert werden (Abbildung 3.20A). Das Plasmid PE fand sich dahingegen wie zuvor auch überwiegend cytoplasmatisch wieder (Abbildung 3.20B).

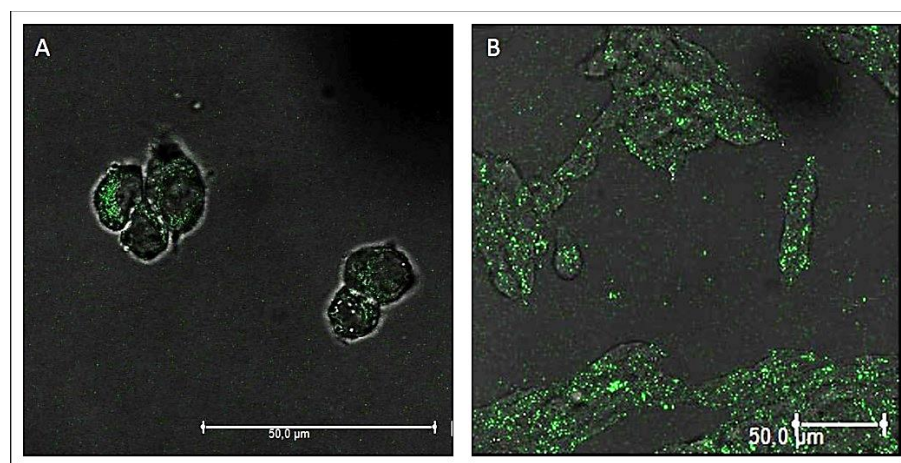


Abbildung 3.20 Lokalisation von PLE und PE in TT-Zellen.

Zu sehen ist die fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop. Sie zeigt den erfolgreichen Verlauf der Transfektion sowie (A) die membranständige Lokalisation von pcDNA3-TRPM5/EGFP und (B) die cytoplasmatische Lokalisation des EGFP-Proteins.

Nachdem die Transfektion erfolgreich durchgeführt worden war, wurden die

transfizierten Zellklone dauerhaft unter Antibiotika-Selektion als Mischpool erhalten und die Funktion von TRPM5 in der Calcitonin-Sekretion untersucht. Dazu wurde die Sekretion des Hormons mittels Gabe von CaCl_2 stimuliert. Da die nativen Zellen über den gesamten Zeitraum von 1 h – 24 h eine anhaltende und konzentrationsabhängige Steigerung der Calcitonin-Sekretion gezeigt hatten (Abbildung 3.18), wurde die Stimulation der stabilen Zellen mit 6 mM CaCl_2 und für 1 h – 24 h durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1×10^5 Zellen im 24-Well Format ausgesät und diese für fünf Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 6 mM CaCl_2 . Nach 0 h, 1 h, 2 h, 6 h und 24 h wurde der Überstand abgenommen und dieser im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz bezüglich seiner Calcitonin-Konzentration analysiert. Während des gesamten Versuches wurde Phenolrot-freies Medium und Aktivkohle-behandeltes FCS verwendet. Außerdem wurde auf die Gabe von Selektionsantibiotikum verzichtet. Zur Auswertung wurden die Werte der stimulierten Zellen jeweils auf die der unbehandelten Zellen normalisiert. Es zeigte sich, dass beide stabilen Zelllinien 1 h nach Stimulationsbeginn trotz Schwankung mit einer Steigerung der Calcitonin-Sekretion reagierten. Diese Steigerung fand in einer vergleichbaren Größenordnung statt, welche bei den PLE-überexprimierenden TT ein minimal geringeres Niveau erreichte. Ein ähnlicher Niveauunterschied zeigte sich nach 2 h Inkubation, jedoch wurden zu diesem Zeitpunkt größere Schwankungen lediglich bei PE-überexprimierenden TT-Zellen verzeichnet. Eine Inkubationszeit von 6 h schien dagegen in beiden stabilen Zelllinien kaum einen Effekt zu erzielen. Nach 24 h Inkubation war eine um 40% erhöhte Steigerung bei den TRPM5-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur PE-Kontrolle zu beobachten (Abbildung 3.21). Der bei 0 h beobachtete Sekretionsunterschied der beiden Konstrukte von ~28% lag unterhalb der unbehandelten Kontrolle, was durch einen Effekt des EGFP verursacht worden sein könnte. Somit konnte sowohl für die PE- als auch für die PLE-überexprimierenden TT-Zellen eine vergleichbare und eindeutige Steigerung der Calcitoninsekretion 1 h nach Behandlung mit CaCl_2 festgestellt werden. Ein deutlicher Niveauunterschied in der Calcitoninsekretion der beiden stabilen Zelllinien zeigte sich nach 24 h Inkubation, welche in PLE-überexprimierenden TT erhöht vorlag.

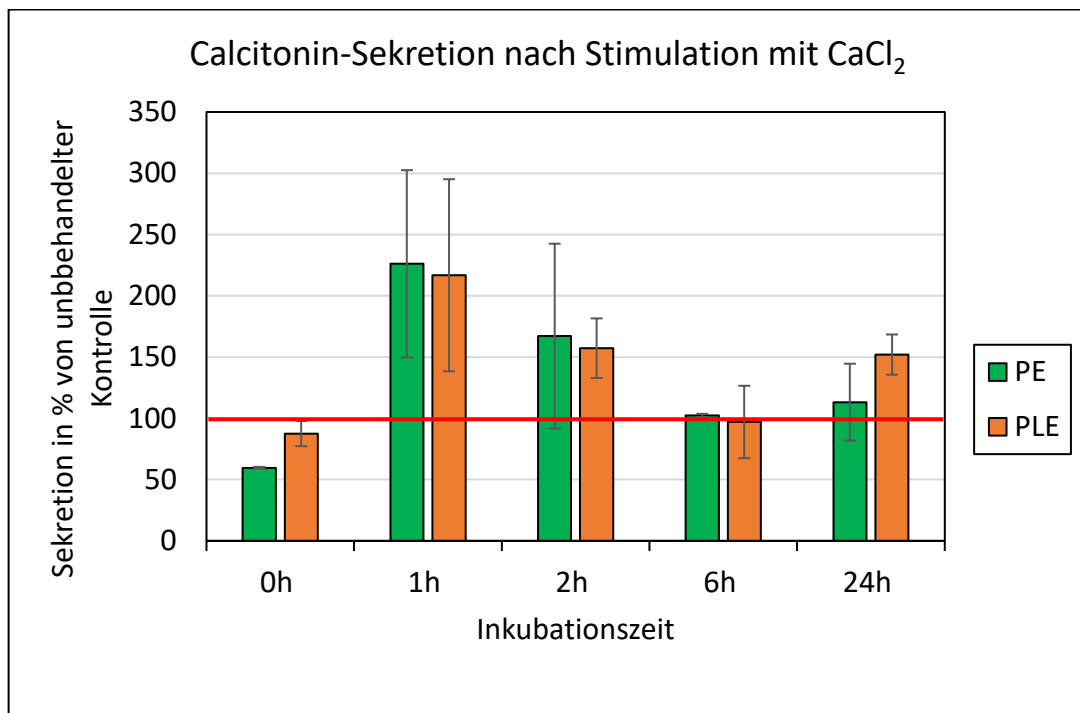


Abbildung 3.21 Sekretion von Calcitonin in PE- und PLE-überexprimierenden TT-Zellen nach Stimulation mit 6 mM CaCl₂.

Gezeigt ist die Calcitonin-Sekretion in % von PE- und PLE-überexprimierenden TT-Zellen nach Stimulation mit 6 mM CaCl₂. Die Zellen wurden für 0 h, 1 h, 2 h, 6 h und 24 h mit CaCl₂ inkubiert, bevor der Überstand abgenommen und vom Zentrallabor bezüglich seiner Calcitonin-Konzentration analysiert wurde. Es wurden Messungen von zwei unabhängigen Versuchen ausgewertet und auf die Werte der unbehandelten Kontrolle normalisiert (= 100%, rote Linie).

4 Diskussion

Nachdem für *TRPM5* eine Expression insbesondere in Leber, Darm, Niere, Drüsengewebe und Geschmacksrezeptorzellen nachgewiesen worden war (Prawitt *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2002; Fonfria *et al.*, 2006), gelang es, den Ionenkanal in einigen dieser Gewebe bezüglich seiner physiologischen Funktion zu charakterisieren. So zeigte sich in den Geschmacksknospen der Zunge sowie in β -pankreatischen Zellen und Becherzellen des Colons ein Sekretions-assoziiertes Mechanismus unter Beteiligung von *TRPM5* (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010; Mitrovic *et al.*, 2013). Dessen Umsetzung erfolgt dabei entweder durch Auslösung eines Depolarisationssignals oder durch einen Protonengradienten. Auf diese Weise wird eine vorangehende Signalkaskade mit der Ausschüttung eines Botenstoffs verknüpft. So bewirkt die Bindung von süßen, bitteren und umami-Liganden an die Geschmacksrezeptoren eine Signalkaskade, die zur Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und Aktivierung des Ionenkanals führt. Die hierdurch ausgelöste Depolarisation der Zellmembran resultiert in der Ausschleusung von ATP, welches das Signal durch Bindung an afferente Nervenfasern an das Gehirn weiterleitet (Liu und Liman, 2003; Zhang *et al.*, 2003a). Auch die β -Zellen des Pankreas nutzen den depolarisierenden Charakter von *TRPM5*, um bei eingehendem Glucose-Stimulus mittels effizienter Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen mit einer optimalen Sekretion von Insulin zu reagieren (Brixel *et al.*, 2010; Colsoul *et al.*, 2010). Dagegen wird das Mucin MUC5AC in den Becherzellen des Colons sezerniert, indem die Bindung von ATP an purinerge Rezeptoren ähnlich der Geschmackswahrnehmung zur Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und damit Aktivierung von *TRPM5* führt. Die über den Ionenkanal transportierten Na^+ -Ionen werden zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt, der über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) im Antiport mit Ca^{2+} -Ionen wieder abgebaut wird. Das auf diese Weise verstärkte Ca^{2+} -Signal ermöglicht letztlich die Sekretion des Mucins (Mitrovic *et al.*, 2013).

Welche weiteren physiologischen Funktionen *TRPM5* im Organismus einnimmt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ausschlaggebend hierfür waren

publizierte Expressionsdaten, welche eine dem Pankreas vergleichbare Expression des Ionenkanals in der Schilddrüse nachwiesen (siehe Abbildung 1.5) (Prawitt *et al.*, 2000). Da es sich hierbei ebenfalls um ein drüsiges Gewebe handelte, wurde die Hypothese entwickelt, dass TRPM5 dort eine der Insulinsekretion vergleichbare Funktion übernimmt. Aufgrund der Verteilungsratio der im Gewebe präsenten Zellen wurde diese in der Sekretion der Schilddrüsenhormone vermutet und untersucht.

4.1 Physiologische Funktion von TRPM5 im thyreotropen Regelkreis

Zur Untersuchung des Einflusses von TRPM5 auf die Schilddrüsenhormonsekretion wurden Seren von *Trpm5 Knockout* (*Trpm5*^{-/-}) Mäusen bezüglich ihrer fT4-Konzentration untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Bereits in den funktionellen Studien zur Rolle von TRPM5 in der Geschmackswahrnehmung und in der Insulinsekretion konnten mit der von Zhang und Mitarbeitern generierten *Knockout* Maus essentielle Zusammenhänge aufgedeckt werden (Zhang *et al.*, 2003a; Brixel *et al.*, 2010; Colsohl *et al.*, 2010). Die sieben untersuchten *Trpm5*^{-/-}-Tiere wiesen eine konstante Reduktion des fT4-Blutserumspiegels um 20% auf, sodass sich bei geringem Standardfehler ein sehr signifikanter Unterschied ergab. Demzufolge scheint ein *Knockout* des *Trpm5*-Gens mit einem hypothyreotischen Effekt einherzugehen. Ein solcher Effekt wurde bislang für keinen Ionenkanal der TRP-Superfamilie beschrieben. Zwar konnte TRPC2 als negativer Regulator der Schilddrüsenfunktion in Zusammenhang gebracht werden (Löff *et al.*, 2012). Dabei scheint der Kanal in seiner Funktion als Ca²⁺-Transporter die Produktion von cAMP, die Expression des *TSHR* sowie Reifung und Sekretion des Thyreoglobulins zu regulieren. Ob TRPC2 auf diese Weise einen zu TRPM5 konträren Effekt auf die fT4-Sekretion ausüben würde, konnte durch die Arbeitsgruppe um Löff und Kollegen jedoch nicht analysiert werden, da die untersuchte Schilddrüsenzelllinie FRTL-5 keine detektierbaren Mengen der beiden Schilddrüsenhormone produziert (Löff *et al.*, 2012). Somit gelang es in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal, einen TRP-Ionenkanal mit einer gestörten Konzentration an Schilddrüsenhormon zu assoziieren. Es war daher von besonderem Interesse, die

molekularen Grundlagen dieses hypothyreotischen Effekts aufzuklären. Hypothyreosen können im Organismus verschiedene Ursachen haben, und werden nach ihrem Ursprung in primäre und zentrale Hypothyreosen unterteilt. Erstere entstehen aufgrund einer Fehlfunktion der Schilddrüse, während zentrale Hypothyreosen eine Folge von Fehlfunktionen der Hypophyse und/ oder des Hypothalamus sind (Chaker *et al.*, 2017). Sie lassen sich daher in der Regel labordiagnostisch gut unterscheiden, da beide Formen der Hypothyreose zwar mit einem erniedrigten fT4-Blutserumspiegel einhergehen, bei einer primären bzw. zentralen Hypothyreose jedoch einen erhöhten bzw. erniedrigten TSH-Spiegel aufweisen. Nur 0,1% der Hypothyreosen werden dabei auf eine zentrale Fehlfunktion zurückgeführt (Persani 2012; Chaker *et al.*, 2017). Daher lag die Vermutung nahe, dass der bei den *Trpm5*^{-/-}-Mäusen beobachtete Effekt auf eine Deregulation in der Schilddrüse zurückzuführen sei. Um dies zu überprüfen, standen die beiden follikulären Zelllinien Nthy-ori 3-1 (Lemoine *et al.*, 1989) und RO82-W-1 (Estour *et al.*, 1989) zur Verfügung. Eignungsuntersuchungen zeigten, dass lediglich Nthy-ori 3-1 über eine basale Expression des *TSHR* und die darüber erfolgende TSH-Stimulation verfügten. RO82-W-1 zeigten dagegen keinerlei endogene Expression des Rezeptors. Da es sich bei beiden Zelllinien um Zellen follikulären Ursprungs handelte, wäre sowohl bei Nthy-ori 3-1 als auch bei RO82-W-1 eine *TSHR*-Expression zu erwarten gewesen, weshalb dieser Unterschied zunächst überraschte. Vermutlich ist dieser durch die unterschiedliche Herkunft der beiden Zelllinien zu erklären. Während Nthy-ori 3-1 aus gesunden Follikelzellen hergestellt wurden, entstammen RO82-W-1 aus Metastasen eines follikulären Karzinoms. Denkbar wäre daher das Vorliegen einer den *TSHR* betreffenden (Epi-)Mutation in RO82-W-1, welche die übliche Expression des Rezeptors verhindert. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, da sowohl RO82-W-1 als auch Nthy-ori 3-1 in Expressionsanalysen keine endogene Expression des *TRPM5*-Ionenkanals aufwiesen. Auch wenn die Zelllinie Nthy-ori 3-1 anfänglich aufgrund physiologischer Stimulierbarkeit geeignet erschien, lässt die fehlende *TRPM5*-Expression in beiden follikulären Zelllinien eine Rolle des Ionenkanals in der Schilddrüsenhormonsekretion bezweifeln. Folglich muss die von Prawitt und Mitarbeitern beobachtete *TRPM5*-Expression im Schilddrüsengewebe auf

den anderen dort vorliegenden Zelltyp der parafollikulären C-Zellen zurückzuführen sein. Die bezüglich dieses Zelltyps erfassten Beobachtungen zu einer möglichen Funktion von TRPM5 werden in Kapitel 4.2 diskutiert. Daneben ermöglicht das Ergebnis der Expressionsanalyse eine Aussage über den hypothyreotischen Status, der in den *Trpm5*^{-/-}-Mäusen beobachtet werden konnte. Eine generell fehlende Expression von *TRPM5* im follikulären Zelltyp der Schilddrüse schließt eine primäre Hypothyreose als Folge des *Trpm5 Knockouts* aus, da TRPM5 in diesem Zelltyp folglich nicht in die Schilddrüsenhormonsekretion involviert sein kann. Dies wurde durch die bei *Trpm5*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verglichenen TSH-Serumspiegel bestätigt. Hier zeigte sich im *Knockout* eine konstante und sehr signifikante Reduktion der Serumspiegel um mehr als 70%. Ein Effekt des *Trpm5 Knockouts*, der eine primäre Hypothyreose zur Folge gehabt hätte, hätte eine Erhöhung des TSH-Serumspiegels als Konsequenz haben müssen. Dass jedoch eine so starke Reduktion an TSH zu beobachten war, lässt sich nur erklären, indem eine zentrale Funktion von TRPM5 im thyreotropen Regelkreis oberhalb der Schilddrüse vorliegt. Kommt es zum Ausfall dieser Funktion, wie z. B. nach einem *Knockout* des Gens, so resultiert dies in einem verringerten TSH-Serumspiegel, und dies wiederum sekundär in einem reduzierten Serumspiegel der Schilddrüsenhormone. Dieses Bild entspricht dem einer zentralen Hypothyreose und ist genau das, was bei den vergleichenden Untersuchungen von *Trpm5*^{-/-}- und *Trpm5*^{+/+}-Mäusen beobachtet werden konnte. Da ein funktioneller *Knockout* von *TRPM5* also den Blutserumspiegel von TSH und fT4 verändert, war es interessant, ob sich genetische Variationen in diesem Gen mit einem präthyreotischen Phänotyp assoziieren lassen. Vergleichsweise konnte bereits insbesondere der Polymorphismus rs2301699 entsprechend der funktionellen Relevanz des Ionenkanals im Pankreas mit einem prädiabetischen Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden (Ketterer *et al.*, 2011). Dabei zeigten Träger des selteneren Allels eine reduzierte Insulinsensitivität, die sich in einem verlangsamten Glucose-Metabolismus und einer erhöhten Insulinsekretion äußerte. Um herauszufinden, ob genetische Veränderungen innerhalb des *TRPM5*-Gens auch mit einem präthyreotischen Phänotyp einhergehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Patienten mit einer zentralen Hypothyreose auf genetische Variationen im kodierenden Bereich

des *TRPM5*-Gens und in den flankierenden Intronsequenzen untersucht. Außerdem wurde überprüft, ob der von Ketterer und Mitarbeitern bereits beschriebene Polymorphismus (Ketterer *et al.*, 2011) eine generalisierte Prädisposition für Hormonsekretionsstörungen darstellt und auch mit einem hypothyreotischen Effekt assoziiert werden kann. Bei der Sequenzierungsanalyse fanden sich 22 Substitutionen, vier Insertionen sowie eine Deletion im Intronbereich. In diesem Bereich würde sich ein Polymorphismus nur dann auswirken, wenn dieser zu einer Veränderung des alternativen Spleißens führen würde. Dies wäre sehr wahrscheinlich der Fall, wenn der Polymorphismus eine für das Spleißen notwendige Sequenz verändern würde. Innerhalb der *Metazoa* liegen diesbezüglich vier konservierte Sequenzen vor. Am 5'-Ende eines Introns befindet sich die sogenannte Spleißdonorsequenz GU, während am 3'-Ende die Spleißakzeptorsequenz AG vorhanden ist. Letzterer geht eine sogenannte *Branch Point Sequence* voran, deren Zusammensetzung geringer konserviert ist. Sie besteht in der Regel aus den Basen YNCURAC (mit Y = Pyrimidin, R = Purin, N = Pyrimidin oder Purin) und beinhaltet stets die Base A. Zwischen dieser Sequenz und der Spleißakzeptorsequenz findet sich zudem ein Polypyrimidintrakt (Will und Lührmann, 2011; Qu *et al.*, 2017). Keine dieser Konsensussequenzen war von den Polymorphismen betroffen, sodass eine andere Isoform des Proteins als Folge des Polymorphismus nach den vorliegenden Daten der DNA-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden kann. Eine veränderte Isoform wäre lediglich durch den Einbau sogenannter Pseudo-Exons denkbar. Ein solches Ereignis findet statt, wenn eine Variation im Intron zur Aktivierung unkonventioneller Spleißsequenzen führt, und hat den Einbau intronischer Sequenz zur Folge (Vaz-Drago *et al.*, 2017). Durch Leserasterverschiebung resultiert dies in der Regel in einem frühzeitigen Stopp-Codon und Degradierung der mRNA (Popp und Maquat, 2013). Auch kann ein solcher „*deep intronic*“ SNP die Einführung eines *Intronic Splicing Enhancers* oder Inaktivierung eines *Intronic Splicing Silencers* bewirken, was ebenfalls in der Integration eines Pseudo-Exons in die mRNA resultiert. Mittlerweile konnte einigen solcher „*deep intronic*“ SNPs daher pathologische Relevanz nachgewiesen werden (Vaz-Drago *et al.*, 2017). Ob die im Rahmen der Dissertation beobachteten Polymorphismen die Integration eines Pseudo-Exons zur Folge haben, müsste durch

eine Sequenzierung von cDNA aus betroffenem Gewebe der untersuchten Patienten überprüft werden. Außerdem müsste eine deutlich größere Anzahl an Probanden untersucht werden, um herauszufinden, ob sich die in dieser Arbeit gefundenen Polymorphismen mit einer Prädisposition für eine Thyreose assoziieren lassen. Einer der untersuchten Patienten zeigte zudem eine bislang nicht beschriebene Insertion von 60 Basen im zwischen dem zweiten und dritten Exon befindlichen Intron. Diese Basenabfolge wurde innerhalb desselben Introns und unmittelbar auf die Insertion folgend mit hoher Übereinstimmung noch zwei weitere Male identifiziert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Insertion eine Basenidentität von ~91,5% bzw. 92,5%. Ähnlich den anderen im Intronbereich gefundenen Polymorphismen hatte diese Insertion keine Auswirkung auf eine der genannten vier für das Spleißen notwendigen Konsensussequenzen. Somit kann anhand der DNA-Sequenzierung keine veränderte Isoform des Proteins aufgrund dieser Insertion in Zusammenhang gebracht werden. Ähnlich den anderen Intronvariationen müsste eine Sequenzierung von cDNA des Patienten durchgeführt werden, um zu identifizieren, ob diese Insertion zu einem Einbau eines Pseudo-Exons führt und daher in einer anderen Isoform resultiert. Daneben konnten insgesamt neun Polymorphismen im kodierenden Bereich des *TRPM5*-Gens identifiziert werden. Sieben der identifizierten Polymorphismen bewirken entweder keine Veränderung der Aminosäure oder eine Veränderung der Aminosäure in eine Aminosäure derselben Eigenschaft. Demzufolge hat keiner dieser Polymorphismen einen Effekt auf die Faltung des Proteins, sodass dieses in seiner nativen Form vorliegen sollte. Somit scheint keiner dieser Polymorphismen mit einem pathogenen Effekt assoziierbar zu sein. Zwei weitere der gefundenen Polymorphismen resultieren dagegen in einer Aminosäure mit einer anderen chemisch-physikalischen Eigenschaft. Dabei kommt es bei Vorhandensein des selteneren Allels bei rs34551253 zum Austausch von Alanin nach Threonin im neunten Exon, sodass eine unpolare Aminosäure durch eine polare Aminosäure ersetzt wird. Demgegenüber bewirkt das seltenere Allel bei rs4929982 einen Austausch von Glutamin nach Arginin in Exon 11, und somit einen Aminosäuretausch von polar nach basisch. Keiner dieser beiden Polymorphismen liegt dabei homozygot für das seltenere Allel vor. Beide betroffenen Aminosäuren befinden sich vor der ersten Transmembrandomäne, sodass zwar keine

für den Ionenkanal offensichtlich essentielle Domäne, wie eine der Transmembrandomänen, die Porenregion oder TRP-Box, von einem möglichen Austausch berührt ist. Dennoch kann aufgrund der bekannten Funktionen des N-Terminus nicht ausgeschlossen werden, dass der Austausch dieser Aminosäuren an dieser Stelle die Fähigkeit des Kanals zur Tetramerisierung und die Regulation der Proteinfunktion beeinflusst und auf diese Weise nachfolgend zu einem hypothyreotischen Effekt beiträgt. Heterozygot vorliegende *Loss of function* Mutationen können zwar häufig durch das zweite Allel kompensiert werden, da meist ausreichende Mengen des normalen Genprodukts zur Verfügung gestellt werden können (Griffiths *et al.*, 2000). Solange das betroffene Allel jedoch als Matrize genutzt würde, könnte der Einbau einer vom betroffenen Allel synthetisierten Untereinheit aufgrund der funktionellen Tetramer-Struktur der TRP-Kanäle dennoch die TRPM5-Funktion blockieren. Ein solch dominant-negativer Effekt zeigt sich in TRPM-Kanälen z. B. durch den Einbau von Untereinheiten der kurzen Spleißform (Xu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003b), und macht einen möglichen dominant-negativen Effekt durch die betroffene Aminosäure somit vorstellbar. Eine Kompensation durch das zweite Allel scheint in diesem Szenario daher nur wahrscheinlich, wenn das vom Austausch betroffene Allel von der Zelle stillgelegt wird. Demgegenüber könnte ein gewebespezifischer Verlust des wildtypischen *TRPM5*-Allels in der Hypophyse während der Ontogenese zu einem vollständigen Verlust der TRPM5-Funktion und nachfolgend zu einem hypothyreotischen Effekt führen. Da im Rahmen der vorliegenden Dissertation ausschließlich Blutproben der analysierten Patienten zur Verfügung standen, kann dieser Aspekt nicht abschließend beurteilt werden. Hierfür müsste DNA aus betroffenem Gewebe dieser Patienten im Vergleich untersucht werden. Ähnlich den beiden beschriebenen Polymorphismen wurde auch das seltenere Allel des bekannten prädiabetischen Polymorphismus rs2301699 nicht homozygot gefunden. Allerdings zeigten 44,4% der untersuchten Patienten heterozygote Ausprägung, sodass eine Assoziation des Polymorphismus mit einem präthyreotischen Phänotyp nicht ausgeschlossen werden kann. Außerdem wäre entsprechend der bei den Polymorphismen rs34551253 und rs4929982 aufgestellten These ein gewebespezifischer Verlust der Heterozygotie denkbar, der eine

präthyreotische Ausprägung des Polymorphismus rs2301699 bewirkt. Daher müsste durch Analyse betroffenen Gewebes geklärt werden, ob durch einen solchen gewebespezifischen Verlust des wildtypischen *TRPM5*-Allels ein präthyreotischer Phänotyp ausgelöst wird. Ob die Polymorphismen rs34551253, rs4929982 und rs2301699 abschließend mit einem präthyreotischen Phänotyp assoziiert werden können, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht eindeutig beurteilt werden. Hierzu müsste ein wesentlich größeres Kollektiv untersucht werden.

Da ein *Knockout* des *Trpm5*-Gens eine zentrale Hypothyreose zur Folge hat, wurde die physiologische Funktion des Ionenkanals mit Hilfe der Hypophysen-Zelllinie Tct1 untersucht, da sie sich durch basale Expression des *Trpm5*-Gens sowie durch starke Expression des *Tshb*-Gens auszeichnete. Zudem wurde das Expressionsverhalten des *Tshb*-Gens nach Stimulation mit TRH untersucht. Ein transkriptionssteigernder Effekt auf die Expression des Gens ist bereits seit Jahrzehnten bekannt (Shupnik *et al.*, 1986). Stimulationen mit 0,1 μ M TRH für 24 h zeigten keinen Effekt auf die Expression des Gens. Dagegen konnte 12 h nach Stimulationsbeginn eine moderate Steigerung der *Tshb*-Expression um 19% beobachtet werden. Eine in Tct1 gesteigerte Transkription nach TRH-Stimulation konnte bereits durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen beobachtet werden. Dabei konnten Zatelli und Mitarbeiter bereits 6 h nach Stimulationsbeginn mit 0,1 μ M TRH eine Erhöhung der *Tshb*-Expression um 30% erfassen, während die gleiche Menge an TRH im von Kim und Mitarbeitern durchgeführten Experiment nach einer zwölfstündigen Inkubation eine nahezu dreifache Steigerung der *Tshb*-Expression bewirkte (Kim *et al.*, 2007; Zatelli *et al.*, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Transkriptionssteigerung des *Tshb*-Gens äußerte sich mit 19% bei zwölfstündiger Stimulation vergleichsweise schwächer. Diese Diskrepanz könnte sich durch die Verwendung des speziellen Nährmediums ergeben, dem ausschließlich Aktivkohle-behandeltes und damit Hormon-freies FCS zugesetzt wurde. Dagegen wurde von den beiden Arbeitsgruppen unbehandeltes FCS verwendet, was mit großer Wahrscheinlichkeit folglich noch mit Hormonen versetzt war. Auch die Verwendung unterschiedlicher Matrigel-Chargen könnte einen solchen Unterschied bedingen. Trotz der vergleichsweise geringeren Transkriptionssteigerung

erschien die Erhöhung der *Tshb*-Expression 12 h nach Stimulationsbeginn ausreichend für weitere Funktionsuntersuchungen, da sie die prinzipielle Stimulierbarkeit dieser Zelllinie bestätigte.

Um den Einfluss des TRPM5-Ionenkanals auf die physiologische Funktion der thyreotropen Zelllinie zu untersuchen, wurde dieser mittels Transfektion stabil in die Zellen eingebracht. Dazu wurde ein pcDNA3-Vektor verwendet, der für ein Fusionsprotein von EGFP und TRPM5 kodierte. Zum Ausschluss eines Effekts durch das EGFP-Protein wurde parallel ein pcDNA3-Vektor eingeschleust, der lediglich für EGFP kodiert, und die so erzeugte stabile Zelllinie stets als Kontrolle mitgeführt. Betrachtung mit Hilfe des konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops nach abgeschlossener Selektion ermöglichte eine Aussage über die Lokalisation des jeweiligen Proteins. Dabei zeigten *TRPM5*-überexprimierende Zellen eine überwiegend membranöse Lokalisation des Proteins, während die Kontrolle vor allem eine cytoplasmatische Verteilung aufwies. Dies deckt sich mit in der Arbeitsgruppe vorher durchgeführten Arbeiten, die eine identische Verteilung der beiden Proteine in HEK293-Zellen zeigten, und lässt eine ähnliche Lokalisation des endogen exprimierten *Trpm5* vermuten. Ob TRPM5 außerdem ähnlich dem Ionenkanal TRPM4 als Reserve in Vesikeln eingelagert wird (Cheng *et al.*, 2007), kann hierbei nicht ausgeschlossen werden. Nachdem eine dauerhafte Überexpression des Ionenkanals in Tat1-Zellen gelungen war, wurde sein Einfluss auf die physiologische Funktion dieser Zellen untersucht. Dafür wurde analysiert, ob diese Überexpression eine Veränderung in der Stimulation der *Tshb*-Expression durch TRH mit sich brachte. Stimulation mit 0,1 μM TRH zeigte nach geringfügiger, anfänglicher Reduktion eine den nativen Zellen vergleichbare Expressionssteigerung nach 12 h in der EGFP-Kontrolle um ca. 18%. Dagegen zeigten *TRPM5*-überexprimierende Zellen bereits nach 4 h eine um 56% erhöhte Transkription des *Tshb*-Gens (Abbildung 3.12). Diese zeigten somit nicht nur eine drastische, nochmalige Steigerung der Genexpression, sondern auch, dass diese bereits zu einem früheren Zeitpunkt in den Zellen stattfindet. Dass es in den ersten Stunden nach Stimulationsbeginn sowohl bei PE als auch bei PLE zu einer geringen Reduktion der Expression kommt, war zunächst überraschend. Es wäre jedoch

denkbar, dass die Zugabe von TRH nicht nur die Expression des *Tshb*-Gens reguliert, sondern parallel auch die weiterer Zielgene, wie z. B. *Tsha*, und es daher aufgrund eines Kompensationseffekts zunächst zu einer verringerten Expression von *Tshb* kommt. Dabei könnte die Expression von *Tshb* zu Gunsten einer anfänglichen Transkriptionssteigerung von *Tsha* vorübergehend reduziert und erst nach ausreichender Synthese von *Tsha* gesteigert werden. Die drastische und verfrühte Transkriptionssteigerung des *Tshb*-Gens bei Überexpression von *TRPM5* lässt auf eine physiologische Funktion des Ionenkanals in der Hypophyse schließen und deckt sich mit den bei den *Knockout* Mäusen angestellten Beobachtungen. Sie könnte somit eine Ursache für den Effekt der dortigen zentralen Hypothyreose darstellen. Bekannterweise führt eine Stimulation mit TRH über zwei verschiedene Signalwege zu einer gesteigerten Transkription des *Tshb*-Gens (Shupnik *et al.*, 1996; Hinkle *et al.*, 2012). Diese sind bislang jedoch noch nicht vollständig verstanden. Dabei bewirkt die Bindung von TRH an den TRHR die Aktivierung eines G-Proteins, dessen α -Untereinheit das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC gewährleistet die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Diese beiden Produkte initiieren nun den Fortgang zweier unterschiedlicher Signalwege. IP_3 bindet zum einen an IP_3 -Rezeptoren des endoplasmatischen Reticulums und löst damit die Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aus. Es folgt eine Depolarisation der Zellmembran, gefolgt von einem Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (engl. *voltage-dependent Ca^{2+} channel*, VDCCs). Dabei zeigt sich die Depolarisation durch Kalium induzierbar, und verursacht in der Regel eine Plateauphase der Ca^{2+} -Antwort. Oszillationen in dieser Phase konnten in primären Hypophysenzellen aus *Sprague-Dawley* Ratten beobachtet werden (Ashworth und Hinkle, 1996). Über Ca^{2+} -abhängige Kinasen erfolgt dann die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren des *Tshb*-Gens und ihrer Coaktivatoren, wie z. B. dem CREB-Bindeprotein (CBP) (Ashworth und Hinkle, 1996; Shupnik *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 2000; Stojilkovic *et al.*, 2010; Hinkle *et al.*, 2012; Tomić *et al.*, 2015). Zum anderen wird zudem das gebildete DAG von der Proteinkinase C (PKC) gebunden, welche mit Hilfe von Ca^{2+} -Ionen ihre Zielproteine phosphoryliert. Hierzu zählen ebenfalls

Transkriptionsfaktoren des *Tshb*-Gens. Insbesondere die beiden Transkriptionsfaktoren Pit-1 und GATA2 scheinen bei der Transkription des Gens eine essentielle Rolle zu spielen (Steinfelder *et al.*, 1992a; Steinfelder *et al.*, 1992b; Mason *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 2011). Die beobachtete Erhöhung der *Tshb*-Transkription bei Überexpression des *TRPM5*-Gens lässt vermuten, dass der Ionenkanal in einen dieser durch TRH stimulierten Signalwege involviert ist. Es wäre denkbar, dass TRPM5 durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert wird und durch Ionen-Transport zur Depolarisation der Zelle beiträgt. Diese könnte im Bereich der Adenohypophyse bislang insbesondere mit einem Transport von K^+ -Ionen in Zusammenhang gebracht werden (Ashworth und Hinkle, 1996; Tomić *et al.*, 2015). Es wäre vorstellbar, dass TRPM5 hieran beteiligt ist. Da das Ca^{2+} -*Signaling* thyreotropher Zellen nicht ausreichend charakterisiert ist (Stojilkovic *et al.*, 2010; Tomić *et al.*, 2015), wäre ein über TRPM5 erfolgreicher Na^+ -Transport als depolarisierende Komponente ebenfalls denkbar. Eine unter Beteiligung von TRPM5 stattfindende Depolarisation könnte schließlich zur Aktivierung der VDCCs beitragen. Die in primären Hypophysenzellen beobachtete oszillatorische Ca^{2+} -Antwort (Ashworth und Hinkle, 1996) lässt sich dabei schlüssig mit den bisherigen Kenntnissen über TRPM5 einordnen, da der Ionenkanal in β -pankreatischen Zellen ebenfalls Oszillationen der Membrandepolarisation und der Ca^{2+} -Antwort bewirkt (Colsoul *et al.*, 2010). Eine zusätzliche Aktivierung von TRPM5 durch den Ca^{2+} -Influx über initial geöffnete VDCCs, wodurch daraufhin ähnlich der Signaltransduktion in der Insulinsekretion eine effiziente Öffnung der VDCCs ermöglicht wird (Brixel *et al.*, 2010), erscheint aufgrund des teilnehmenden VDCCs vom L-Typ ebenfalls denkbar. Dieser stellt einen Vertreter der Kanalkategorie mit langanhaltendem Ionenstrom dar und ist auch in die Signaltransduktion der Insulinsekretion involviert. Außerdem gelang es vor kurzem, eine Aktivierung TRPC-ähnlicher Ionenströme in Neuronen des Thalamus nach Stimulation mit TRH sowohl mit der Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher als auch mit dem Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen über VDCCs des L-Typs zu korrelieren (Kolaj *et al.*, 2016). Jedoch unterscheidet sich der in den Neuronen aktivierte Signalweg dahingehend von dem der Hypophyse, dass in den Neuronen bereits eine sehr frühe Aktivierung dieser VDCCs erfolgt. Dagegen ist diese in endokrinen Zellen

der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher nachgestellt. Eine Aktivierung von TRPM5 durch den raschen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg nach Entleerung der intrazellulären Speicher scheint daher sehr wahrscheinlich. Jedoch kann eine alleinige oder zusätzliche Beteiligung durch die VDCCs nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen müssen daher zeigen, ob TRPM5 durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert wird und ob die VDCCs an dieser Aktivierung beteiligt sind.

Da die Stimulationsanalysen bei *TRPM5*-überexprimierenden Tat1-Zellen nicht nur eine im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Expression des *Tshb*-Gens aufwiesen, sondern diese auch deutlich verfrüht auftrat, lässt dies eine zusätzliche Rolle des Ionenkanals im Sekretionsprozess von TSH vermuten. Bei einer möglichen Steigerung der TSH-Sekretion in Folge einer Überexpression des *TRPM5*-Gens wäre es denkbar, dass die Zellen mit einer adäquaten Nachproduktion des Hormons reagieren und diese daher bereits deutlich früher durchführen müssen. Daher wurde das TSH-Sekretionsverhalten der überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit TRH mittels ELISA untersucht. Die Abweichungen der Einzeluntersuchungen zeigten, dass diese Methode sich bei den verwendeten Zellassays am Rande der Nachweisgrenze für das Hormon befindet. Sie lässt jedoch eine tendenzielle Aussage über das Sekretionsverhalten dieser Zelllinie zu. Dabei zeigte die EGFP-Kontrolle zu beiden untersuchten Zeitpunkten keinerlei Veränderung in der TSH-Sekretion zum Ausgangswert nach Stimulation mit TRH. Dieses Verhalten erscheint zunächst unerwartet, da eine Stimulation mit identischer Menge an TRH in der Literatur nach 5 min zu einer fast dreifachen Steigerung der gemessenen TSH-Konzentration führt (Zatelli *et al.*, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit angestellten Beobachtungen sind jedoch schlüssig mit den Expressionsanalysen des *Tshb*-Gens einzuordnen, da dieses in den ersten Stunden nach Stimulationsbeginn eine schwache Reduktion in der Expression aufweist. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Ursache der unveränderten Sekretionskinetik zu den gemessenen Zeitpunkten. Möglicherweise wäre eine Steigerung daher zu anderen Zeitpunkten messbar. Daneben könnte die Diskrepanz zur Literatur auch durch die Verwendung von Aktivkohle-behandeltem FCS zustande kommen, das somit im Unterschied zu Zatelli und Kollegen Hormon-frei

eingesetzt wurde, wie bereits aufgrund der Expressionsanalysen nativer *Tct1* vermutet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Stimulation der TSH-Sekretion in der Literatur hierdurch und durch die Verwendung einer anderen Matrigel-Charge möglicherweise deutlich verstärkt wurde und eine Stimulation in der vorliegenden Arbeit zu einem nicht gemessenen Zeitpunkt stattgefunden hat. Messungen zu weiteren Zeitpunkten könnten hierüber Aufschluss geben. Unterschiedliche Antikörper-Affinitäten können als Ursache für die Diskrepanz ausgeschlossen werden, da in der vorliegenden Arbeit das nachfolgende Kit zu dem in der Literatur angegebenen verwendet wurde, und beide Kits die Bindung von α - und β -Untereinheit des TSH-Moleküls involvieren. Dagegen zeigten die *TRPM5*-überexprimierenden Zellen nach 15 min Stimulation mit TRH eine Tendenz zu einer gesteigerten TSH-Sekretion. Dieser Zeitpunkt wurde von Zatelli und Mitarbeitern nicht gemessen. Da sie jedoch nach 5 min eine fast dreifache Steigerung in der TSH-Konzentration feststellen konnten, die nach 30 min immernoch fast 200% betrug, wäre mindestens eine Größenordnung zwischen diesen beiden Prozentigkeiten zu erwarten gewesen. Diese Abweichung könnte ebenfalls auf die Verwendung von Aktivkohle-behandeltem FCS zurückzuführen sein. Außerdem weisen die *TRPM5*-überexprimierenden Zellen scheinbar eine stärkere Sekretionsantwort als die Kontrolle auf, sodass es denkbar wäre, dass der *Peak* der TSH-Sekretion zu einem hier nicht gemessenen Zeitpunkt erfolgte. Um dies zu überprüfen, wären Messungen zu weiteren Zeitpunkten erforderlich. Aufgrund der Nachweisgrenze der Methode wäre die Durchführung mit einer sensitiveren Methode, wie z. B. einem Radioimmunassay (RIA), nützlich. Dennoch deckt sich die Tendenz zu einer gesteigerten TSH-Sekretion mit den Expressionanalysen des *Tshb*-Gens. Die verfrühte Transkriptionssteigerung lässt sich somit zusätzlich mit der nur in *TRPM5*-überexprimierenden Zellen stattfindenden Sekretionssteigerung des TSH-Hormons erklären. Folglich scheint der Ionenkanal nach Stimulation mit TRH nicht nur in die Regulation der *Tshb*-Expression, sondern außerdem in die der TSH-Sekretion involviert zu sein. Diese scheint in der Hypophyse durch das bereits beschriebene TRH-Signaling, das auch die Expression des *Tshb*-Gens reguliert, gesteuert zu werden (Ashworth und Hinkle, 1996; Joseph-Bravo *et al.*, 2016). Somit wäre auch in diesem Szenario eine Aktivierung des

Ionenkanals aufgrund des IP_3 -Signalwegs denkbar, sodass das dadurch ausgelöste Depolarisationssignal zur Aktivierung der VDCCs beiträgt. Im weiteren Verlauf des *Signalings* wird mit Hilfe des aktiven Ionenkanals nicht nur die Expression des *Tshb*-Gens, sondern auch die Sekretion des TSH-Hormons mitreguliert. Abbildung 4.1 fasst die nach den vorliegenden Daten mögliche Rolle von TRPM5 in der Hypophysenzelle als Modell graphisch zusammen.

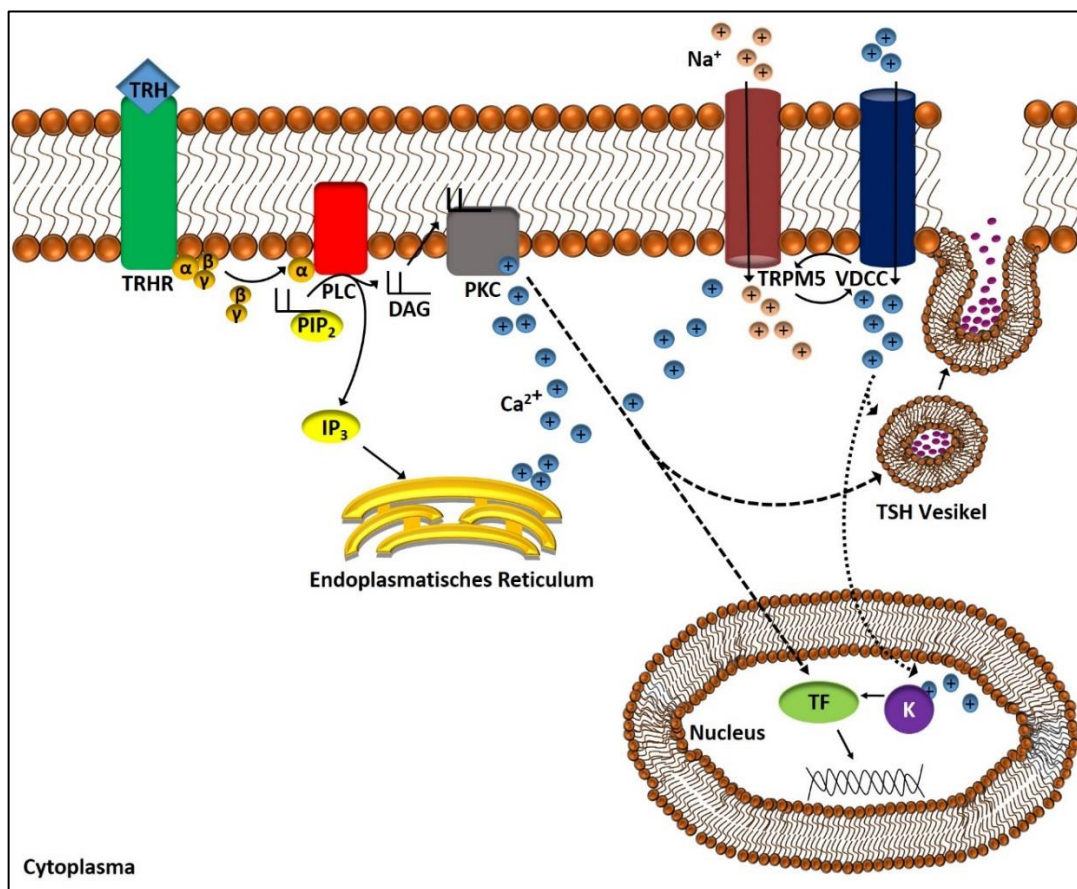


Abbildung 4.1 Modell zur physiologischen Funktion von TRPM5 in der Hypophysenzelle.

Die Abbildung stellt die mögliche Rolle von TRPM5 im TRH *Signaling* der Hypophyse dar. Durch die Bindung von TRH an den purinergen GPCR-Rezeptor TRHR wird das assoziierte G-Protein aktiviert und dissoziiert. Dessen α -Untereinheit aktiviert das Enzym PLC, welches PIP₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum und führt zur Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher. Dieser Schritt ist eng gekoppelt an ein bislang noch nicht vollständig aufgeklärtes Depolarisationssignal der Zelle, welches die Aktivierung von VDCCs auslöst. Durch den raschen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg könnte TRPM5 aktiviert werden und zu diesem Signal beitragen. Auf diese Weise kommt es zu einem anhaltenden Ca²⁺-Anstieg in der Zelle, was eine Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Kinasen bewirkt. Alternativ wäre auch eine durch initial geöffnete VDCCs alleinige oder zusätzlich stattfindende Aktivierung von TRPM5 denkbar. DAG und Ca²⁺-Ionen aktivieren parallel das Enzym PKC. PKC und Ca²⁺-abhängige Kinasen phosphorylieren letztlich Zielproteine, die die Transkription des *Tshb*-Gens und die Sekretion des TSH-Hormons regulieren. (DAG: Diacylglycerin; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; K: Kinase; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; TF: Transkriptionsfaktor; TRHR: TRH-Rezeptor; VDCC: spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle).

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich die Rolle von TRPM5 wie im vorgestellten Modell bestätigt. Die Aufklärung könnte wertvolle diagnostische Hinweise im Zusammenhang mit thyreotischen Erkrankungen, wie z. B. einer zentralen Hypothyreose oder zentralen Hyperthyreose, liefern. Insbesondere Hypophysentumore und eine Resistenz gegenüber der Regulation durch Schilddrüsenhormone konnten als Ursachen für zentrale Hyperthyreosen bestimmt werden (McDermott und Ridgway, 1998). Weitere Ursachen scheinen bislang eher wenig bekannt zu sein. Ihre Therapie erfolgt in der Regel durch den Einsatz von Somatostatin-Analoga, die eine hemmende Wirkung auf die TSH-Sekretion besitzen und den Überschuss an TSH somit reduzieren, sowie partielle oder vollständige Entfernung der Schilddrüse bei erfolgloser Behandlung (McDermott und Ridgway, 1998). Zentrale Hypothyreosen werden in der Regel auf Hypophysentumore, Dysfunktionen der Hypophyse und Resistenzen gegenüber dem Hormon TRH zurückgeführt und per Substitutionstherapie mit Schilddrüsenhormonen behandelt (Persani, 2012; Chaker *et al.*, 2017). Aufgrund des beschriebenen Modells zur physiologischen Funktion von TRPM5 in der Hypophyse wäre es vorstellbar, dass Fehlregulationen des Ionenkanals in beide Richtungen zu einer zentralen Hypothyreose bzw. zentralen Hyperthyreose führen können. Dabei könnte eine *Gain of function* Mutation im *TRPM5*-Gen eine verstärkte Genfunktion bewirken und damit zu einer zentralen Hyperthyreose beitragen, während eine *Loss of function* Mutation im *TRPM5*-Gen durch Verlust der Kanalfunktion eine zentrale Hypothyreose zur Folge hätte. Bei Vorliegen einer Keimbahnmutation wären entsprechend der bekannten Funktionen von TRPM5 auffällige Parameter bezüglich Glucosetoleranz, Mucinsekretion, Geschmackswahrnehmung und der fT4- und TSH-Serumspiegel zu erwarten. Sie würden sich daher nach Festlegung des Parameternormbereichs als schnelles und kostengünstiges *Readout* für eine vorliegende *TRPM5*-Keimbahnmutation eignen, sodass innerhalb kürzester Zeit eine geeignete Therapie eingeleitet werden könnte. Zusätzlich könnte eine Sequenzierung des *TRPM5*-Gens im Blut erfolgen. Als Therapieansatz scheint die Regulation des Ionenkanals TRPM5 selbst aufgrund seiner vielfältigen physiologischen Funktionen schwierig. Insbesondere aufgrund seiner Funktion in der Insulinsekretion könnte die Gabe eines

TRPM5-Aktivators bei Vorliegen einer zentralen Hypothyreose oder eines TRPM5-Inhibitors bei Vorliegen einer zentralen Hyperthyreose nicht nur einer durch den Kanal fehlregulierten TSH-Menge entgegensteuern, sondern auch zu einer unerwünschten Insulindosis nach einer Glucose-Verstoffwechslung führen. Auch wenn eine präventive Kombinationstherapie mit Inhibitoren oder Aktivatoren der K_{ATP} -Kanäle denkbar wäre, so wäre eine bewusst induzierte Fehlregulation der Insulindosis vermutlich zu schwerwiegend, als dass diese wissentlich in Kauf genommen würde. Eine Therapie unter Verwendung von TRPM5-Modulatoren wäre daher nur unter der Voraussetzung einer gewebespezifischen Abgabe des Wirkstoffs, z. B. durch Entwicklung eines Nanopartikel-basierten Systems, vorstellbar.

4.2 Physiologische Funktion von TRPM5 in parafollikulären Zellen

Die bekannte Expression des *TRPM5*-Ionenkanals in der Schilddrüse (Prawitt *et al.*, 2000) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mit dem mit größerer Häufigkeit auftretenden Zelltyp der follikulären Zellen in funktionellen Zusammenhang gebracht werden (siehe Kapitel 4.1). Dies ließ eine physiologische Funktion in dem weitaus selteneren Zelltyp der parafollikulären C-Zellen vermuten, weshalb diese mit Hilfe zweier verschiedener Ansätze näher untersucht wurde. Hierfür wurde zum einen Gewebe von medullären Schilddrüsenkarzinomen (engl. *medullary thyroid cancer*, MTC) bezüglich einer Korrelierbarkeit ihrer Expression von *TRPM5* und *CALCA* untersucht. MTCs zeichnen sich in der Regel durch eine starke Expression des *CALCA*-Gens aus. Sie entwickeln sich entweder aufgrund von sporadischen Mutationen oder im Rahmen eines MEN2-Syndroms aufgrund von Keimbahnmutationen im *RET*-Protoonkogen, welche eine erhöhte Aktivität der RET-Tyrosinkinase (RET-TK) zur Folge haben (Accardo *et al.*, 2017). Diese Aktivitätsteigerung ist durch die Lage der *RET*-Mutation begründet. Als Rezeptor-Tyrosinkinase besteht die RET-TK aus drei Proteindomänen: Einer extrazellulären Liganden-Bindedomäne, einer Transmembrandomäne und einer in die zwei Subdomänen TK1 und TK2 unterteilten, intrazellulären Kinasedomäne (Ceolin *et al.*, 2012). Nach Bindung des Liganden erfolgt unter Dimerisierung der RET-TK ihre

Aktivierung, was die Phosphorylierung von Zielproteinen und die Aktivierung zellulärer Signalkaskaden, wie MEK/ERK und PI3K/Akt, zur Folge hat (Bertazza *et al.*, 2015). Die den MEN2-Syndromen zu Grunde liegenden *RET*-Mutationen führen zu einer Veränderung innerhalb einer dieser Proteindomänen. Bei MEN2A ist dabei die extrazelluläre Cystein-reiche Domäne durch eine Mutation des Codons 634 am häufigsten betroffen. Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Dimerisierung und folglich Aktivierung der RET-TK. Außerdem wurden Mutationen der Codons 611, 618 und 620 beschrieben. Daneben liegt in 95% der MEN2B-Fälle eine Mutation im Codon 918 vor, die eine Konformationsänderung in der intrazellulären TK2-Bindedomäne bewirkt. Dies resultiert in einer konstitutiven Aktivierung der Kinase bei fehlender Dimerisierung und einer veränderten Substratbindung. Eine somatische Mutation dieses Codons ist auch für eine große Anzahl der sporadischen MTC-Tumore verantwortlich (Accardo *et al.*, 2017). Daneben konnten somatische Mutationen in den Codons 618, 603, 634, 768, 804 und 883 identifiziert werden (Ceolin *et al.*, 2012) und können somit sowohl extra- als auch intrazelluläre Domäne betreffen. Für die entsprechenden Analysen der vorliegenden Dissertation standen initial insgesamt acht Gewebeprobe zur Verfügung, die sich auf einen MEN2A-Tumor, zwei MEN2B-Tumore sowie fünf sporadische Tumore verteilten. Dabei konnten in den beiden MEN2B-Tumoren keine Korrelation zwischen der Expression des *CALCA*- und der des *TRPM5*-Gens aufgestellt werden. Alle weiteren sechs MTC-Proben zeigten dagegen eine 88,91%ige Korrelation der beiden Gene. Dass die gesamte Entitätengruppe des MEN2B-Syndroms im Gegensatz zum MEN2A-Syndrom und zu den sporadischen Tumoren keinerlei Korrelation zwischen den beiden untersuchten Genen aufwies, könnte in einer unterschiedlichen Lage der *RET*-Mutation begründet sein. Sie könnte in den Proben des MEN2A-Syndroms und der sporadischen Tumore eine Signalwegaktivierung zur Folge haben, die die *CALCA*-Expression reguliert und *TRPM5* als feinjustierende Komponente involviert, während die Nicht-Korrelation in den beiden MEN2B-Tumoren die Aktivierung eines *TRPM5* nicht-involvierenden Signalwegs suggeriert. Zudem könnte die beobachtete Nicht-Korrelation der beiden Gene in den beiden MEN2B-Tumoren durch die geringe Probenanzahl bedingt sein. Ob diese sich in dieser Tumorentität bewahrheitet, müssen daher Analysen weiterer

Proben zeigen. Die in den weiteren sechs MTC-Proben beobachtete Korrelation der beiden Gene *CALCA* und *TRPM5* wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben und lässt aufgrund des kleinen Probenkollektivs einen zwar nur vorläufigen, aber funktionellen Zusammenhang vermuten. Eine Vergrößerung des Patientenkollektivs mit nachfolgender Expressionsanalyse wäre zur Validierung der Ergebnisse sinnvoll. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weiteren Proben zur Verfügung standen, wurde ein möglicher funktioneller Zusammenhang in einem alternativen Ansatz untersucht. Dies geschah mit Hilfe eines Zellkultursystems. Zum Zeitpunkt der Analysen stand hierfür die einzige verfügbare humane Zelllinie TT zur Verfügung, welche aus einem MTC isoliert und in Kultur genommen worden war (Leong *et al.*, 1981). Charakterisierung dieser Zelllinie zeigte, dass sie trotz eines regulatorischen Einflusses der RET-TK auf die Calcitonin-Expression zelltypspezifische Eigenschaften nicht-transformierter Zellen sowie ihre spezifischen Signalwege aufrechterhält. Sie gilt daher als das verlässlichste Modellsystem zur Untersuchung parafollikulärer Zellen (Freichel *et al.*, 1996; Zabel und Grzeszkowiak, 1997; Akeno-Stuart *et al.*, 2007; Piotrowska *et al.*, 2015). Expressionsanalysen zeigten mit einem CP von 17,74 eine sehr starke Expression des *CALCA*-Gens. Dies war aufgrund der bereits bekannten Aspekte der Zelllinie und der starken *CALCA*-Expression in MTCs zu erwarten und wurde somit bestätigt. Des Weiteren zeigte sich mit einem CP von 27,63 eine für *TRPM5* starke Expression, was auf einen funktionellen Zusammenhang von *TRPM5* in diesem Zelltyp hindeutete. Durchführung einer CaCl_2 -Stimulation zeigte eine deutlich erhöhte Calcitonin-Sekretion unter Verwendung von 6 mM CaCl_2 nach 0 min und 1 min, die danach vorübergehend abfiel, sowie nach 1 h – 24 h wieder anstieg. Dagegen fiel die Stimulation unter Verwendung von 3 mM CaCl_2 wie zu erwarten geringer aus. Zu den Messzeitpunkten 1 h und 6 h zeigten sich zwar nach Stimulation mit 6 mM CaCl_2 größere Schwankungen in den gemessenen Calcitoninmengen. Ihre Ursache könnte in der Aktivität proteolytischer Enzyme begründet sein, da ein Zusammenhang zwischen rapider Degradation des Hormons und Serumproteasen bekannt ist (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2009). Zellen können solche Proteasen sezernieren und auch im verwendeten FCS können Proteasen vorliegen. Möglicherweise wäre die Verwendung von Protease-Inhibitoren ein sinnvolles

Werkzeug, eine mögliche Degradation von Calcitonin und damit Messschwankungen zu umgehen. Nichtsdestotrotz konnte unabhängig von diesen Schwankungen eine gesteigerte Sekretion von Calcitonin nach Gabe von 6 mM CaCl_2 zu den genannten Zeitpunkten beobachtet werden. Die innerhalb der ersten Minute auftretende Sekretionssteigerung zeigt eine scheinbar unmittelbare Stimulationswirkung, deren Aktivität auch zu den späteren Zeitpunkten noch anhält. Dies bestätigt die in der Literatur umstrittene physiologische Stimulierbarkeit der Zellen (Haller-Brem *et al.*, 1987; Raue und Scherübl, 1995; Freichel *et al.*, 1996; Piotrowska *et al.*, 2015). Die vorübergehend geringer ausfallende Sekretionssteigerung nach 10 min – 30 min könnte dadurch bedingt sein, dass die Zellen zuvor ihre gesamten Reserven an Calcitoninvesikeln aufgebraucht haben und diese für weitere Reaktionen erst nachgebildet werden müssen. Daneben könnte die bereits vermutete Aktivität vorhandener Proteasen eine Ursache für die vorübergehend geringer zu beobachtende Sekretionssteigerung darstellen. Durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren könnte bei Wiederholung der Experimente rückgeschlossen werden, welche der beiden Erklärungsansätze sich als Ursache dieser Kinetik bestätigt.

Die Bestätigung der Stimulierbarkeit der Zelllinie bezüglich ihrer Calcitonin-Sekretion führte zu der Frage, inwieweit TRPM5 in diesen Prozess involviert ist. Aus diesem Grund wurde pcDNA3-TRPM5/EGFP (PLE) stabil in diese Zellen eingebracht, sodass der Ionenkanal dauerhaft überexprimiert vorlag. Parallel hierzu wurde pcDNA3-EGFP (PE) in diese Zellen stabil eingeschleust, um diese als Kontrolle mitführen zu können. Die Auswertung am konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop zeigte eine zwar schwache, aber vorhandene und vergleichbare Fluoreszenz der beiden Konstrukte sowie die erwartete Lokalisation. Dabei fand sich PLE überwiegend in den membranösen Strukturen wieder, wohingegen PE cytoplasmatisch verteilt war. Eine ähnliche Lokalisation des endogenen *TRPM5* scheint somit wahrscheinlich und deckt sich mit vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe sowie mit den Beobachtungen in den Tat1-Zellen (siehe Kapitel 4.1). Nachdem die erwartete Proteinlokalisierung nachgewiesen worden war, wurde die Funktion von TRPM5 in der Calcitonin-Sekretion untersucht. Hierzu wurden die stabilen Zellen mit 6 mM CaCl_2 inkubiert. Da nach 1 h – 24 h in den

nativen Zellen eine anhaltende Stimulation durch CaCl_2 zu beobachten war, wurde die Stimulation der überexprimierenden Zellen zu diesen Zeitpunkten durchgeführt. Hierbei zeigte sich größtenteils eine ähnliche Sekretionskinetik in den beiden stabilen Zelllinien, die bei *TRPM5*-überexprimierenden Zellen ein minimal niedrigeres Niveau erzielte. Jedoch unterlagen diese Messungen ähnlich einiger Messwerte der nativen Zellen großen Schwankungen. Daher ist zu den gewählten Zeitpunkten nur eine limitierte Aussage bezüglich des Niveaus möglich. Lediglich bei der Ausgangsmessung und nach 24 h konnte eine erhöhte Sekretion in *TRPM5*-überexprimierenden Zellen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei den beiden stimulierten stabilen Zelllinien in der Ausgangsmessung im Vergleich zu den nicht transfizierten Ausgangszellen eine reduzierte Calcitoninsekretion. Es wäre denkbar, dass diese durch eine negative Wechselwirkung zwischen EGFP und dem Sekretionsinvolvierenden Signalweg für Calcitonin begründet ist, die zum späteren Zeitpunkt aufgrund einer stärkeren Sekretionsantwort überlagert wird. Eine Wechselwirkung zwischen EGFP und anderen Signalwegen wurde bereits beschrieben (Baens *et al.*, 2006) und könnte diese Beobachtung erklären. Baens und Mitarbeiter konnten dabei eine inhibierende Wirkung von EGFP auf die Polyubiquitinylierung beobachten, welche durch die Regulation von Kinasen und die Degradation von Proteinen eine große Anzahl verschiedenster zellulärer Prozesse reguliert. Der in den stabilen Zelllinien beobachtete, reduzierte Sekretions-Effekt war relativ schwächer in den *TRPM5*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Verglichen mit der EGFP-Kontrolle wiesen die *TRPM5*-überexprimierenden Zellen also eine erhöhte Calcitoninsekretion auf. Diese Betrachtungsweise suggeriert eine gesteigerte Calcitonin-Sekretion in *TRPM5*-überexprimierenden Zellen. Eine Untersuchung des Einflusses von *TRPM5* auf die Calcitonin-Sekretion nach wenigen Minuten erscheint aufgrund der vorliegenden Daten in nativen und stabilen Zellen sinnvoll.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der *CALCA*- und *TRPM5*-Expression sowie der vorläufigen Analysen bezüglich der Calcitoninsekretion lassen eine tendenzielle Involvierung des Ionenkanals in der Calcitoninsekretion vermuten. Dieser Prozess ist bislang noch nicht vollständig charakterisiert. Bekannt ist, dass ein extrazellulärer

Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration den Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR) aktiviert. Dabei handelt es sich um einen GPCR, der nach Aktivierung ein Gq-Protein aktiviert und über Phospholipase C (PLC) Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern freisetzt. Daran gekoppelt sind Depolarisation der Zellmembran und Öffnung nonselektiver Kationenkanäle sowie spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VDCC). Sowohl Membrandepolarisation als auch intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg weisen dabei ähnlich den β -pankreatischen Zellen und den Zellen der Hypophyse oszillatorische Eigenschaften auf, sodass TRPM5 schlüssig in den Signalweg involviert sein könnte. Die Öffnung der VDCCs führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen, was eine Freisetzung der Calcitonin-haltigen Vesikel bewirkt. Diese beinhalten neben Calcitonin auch das Hormon Serotonin. Die Sekretion von Serotonin wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestimmt, jedoch erscheint eine dem Calcitonin entsprechende Sekretionskinetik aufgrund der gemeinsamen Vesikelverpackung wahrscheinlich (McGehee *et al.*, 1997). Die angestellten Beobachtungen sollten daher auch auf die Sekretion von Serotonin übertragbar sein. Möglicherweise stellt die Messung dieses Hormons eine sinnvolle Alternative für weitere funktionelle Untersuchungen bezüglich TRPM5 dar, sollte die vermutete proteolytische Degradation von Calcitonin bestätigt werden und unter Verwendung von Protease-Inhibitoren nicht zu unterbinden sein. Neben dem vorgestellten PLC-Signalweg scheint die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ebenfalls an der Sekretionsantwort beteiligt zu sein (Zabel, 1984; Freichel *et al.*, 1996; Raue und Scherübl, 1995; McGehee *et al.*, 1997; Piotrowska *et al.*, 2015). Offene Fragen beinhalten neben den an der Depolarisation beteiligten Kationenkanälen auch die Involvierung der PLC. McGehee und Mitarbeiter konnten unter Verwendung von PLC-Inhibitoren zeigen, dass eine Phosphatidylcholin-spezifische PLC (PC-PLC) an der Sekretionsantwort beteiligt ist. Dagegen konnten sie unter Verwendung des Inhibitors U73122 keine Beteiligung der Phosphatidylinositol-spezifischen PLC (PI-PLC) zeigen. Dies ließ die Autoren auf eine ausschließliche Beteiligung der PC-PLC schließen. Die Verwendung des Inhibitors U73122 ist mittlerweile bezüglich seiner Spezifität und Aktivität jedoch umstritten (Klein *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). Außerdem legt die sonst übliche Aktivierung des PI-PLC-Signalwegs durch den Gq-gekoppelten CaSR sowie die PLC-vermittelte Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher

(Conigrave und Ward, 2013; Piotrowska *et al.*, 2015) den Schluss nahe, dass die Sekretionsantwort beide spezifischen PLCs involviert. Denkbar ist nicht nur eine Aktivierung von PI-PLC durch das G-Protein, sondern auch durch ein Spaltprodukt der PC-PLC. Diese hydrolysiert Phosphatidylcholin zu DAG und Phosphatidsäure. Letztere konnte in Zusammenhang mit einer positiven Regulation der Phospholipase C- β und einem Anstieg von IP₃ sowie der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gebracht werden (Liu *et al.*, 1999; Litosch, 2003; Litosch, 2009). Ähnlich dem Modell in der Hypophyse könnte TRPM5 durch den PI-PLC-bedingten intrazellulären Ca²⁺-Anstieg aktiviert werden und durch einen Beitrag zur Membrandepolarisation an der Aktivierung der VDCCs teilhaben. Vorstellbar wären drei Aktivierungsszenarien für TRPM5: Alleinige Aktivierung durch Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher, alleinige Aktivierung durch initial geöffnete VDCCs oder eine kombinatorische Aktivierung durch die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher und initial geöffnete VDCCs. Abbildung 4.2 stellt die mögliche Funktion von TRPM5 in der Calcitoninsekretion modellhaft zusammen. Diese muss durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

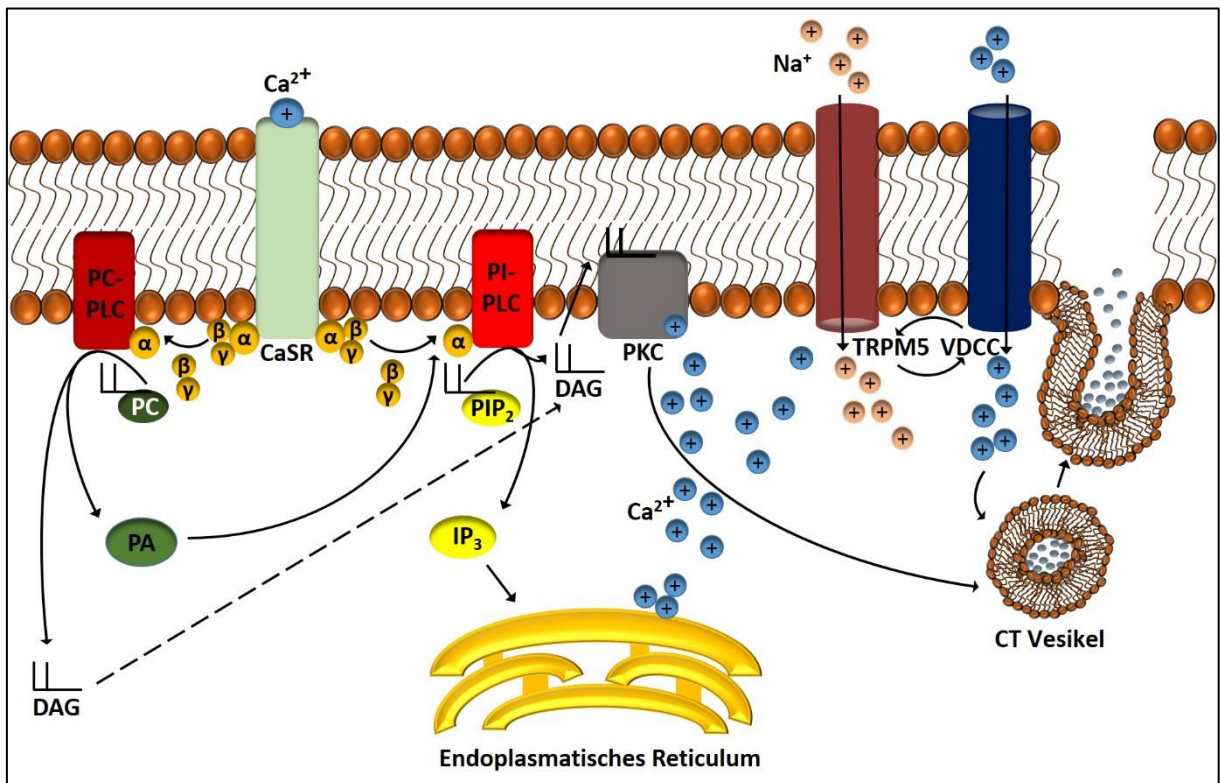


Abbildung 4.2 Modell zur physiologischen Funktion von TRPM5 in der parafollikulären C-Zelle.

Die Abbildung stellt die mögliche Rolle von TRPM5 im Ca²⁺-Signaling der parafollikulären C-Zelle dar. Dabei bindet Ca²⁺ an den purinergen GPCR-Rezeptor CaSR, was zur Aktivierung und Dissoziation des assoziierten G-Proteins führt. Dies aktiviert vermutlich zwei verschiedene PLC-Enzyme. PI-PLC katalysiert die Hydrolyse von PIP₂ zu DAG und IP₃. Durch die Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum werden intrazelluläre Ca²⁺-Speicher freigesetzt. Dieser Schritt löst ein Depolarisationssignal der Zelle aus, welches nonselektive Kationenkanäle involviert. Dies ermöglicht die Aktivierung von VDCCs. Durch den raschen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg könnte TRPM5 aktiviert werden und zu diesem Signal als Kationenkanal beitragen. Daneben ist auch eine durch initial geöffnete VDCCs alleinige oder zusätzlich stattfindende Aktivierung von TRPM5 vorstellbar. Außerdem aktivieren DAG und Ca²⁺-Ionen parallel das Enzym PKC, welches durch die Phosphorylierung von Zielproteinen die Sekretion des Calcitonin-Hormons regulieren. Neben der Aktivierung der PI-PLC durch das G-Protein erfolgt außerdem die Aktivierung der PC-PLC. Diese hydrolysiert Phosphatidylcholin zu DAG und Phosphatidsäure. DAG kann weitere PKCs aktivieren, wohingegen Phosphatidsäure einen positiven Einfluss auf die PLC und die nachfolgende Bildung von IP₃ auszuüben scheint. (CaSR: Ca²⁺-sensitiver Rezeptor; CT: Calcitonin; DAG: Diacylglycerin; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; K: Kinase; PA: Phosphatidsäure; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PC-PLC: Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C; PI-PLC: Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C; VDCC: spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle).

Seit seiner Entdeckung in den 60er Jahren wird die pathophysiologische Bedeutung des Calcitonin-Hormons immer wieder diskutiert und konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Klar ist, dass Calcitonin den Blutcalciumspiegel senkt, indem es im Knochen die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen durch Osteoklasten verhindert und die Reabsorption von Ca²⁺-Ionen in der Niere sowie Darm unterbindet (Davey und Findlay, 2013; Felsenfeld und Levine, 2015). Während Schwangerschaft und Laktation

scheint es außerdem einen zu hohen Ca^{2+} -Verlust durch Transfer von der Mutter auf das Kind zu blockieren (Woodrow *et al.*, 2006; Felsenfeld und Levine, 2015). Auf diese Weise verleiht das Hormon Schutz gegen Hypercalcämie und scheint eine Relevanz in der Calcium-Homöostase des Körpers zu besitzen. Da die Hormonsekretion der C-Zellen sich nicht nur durch Ca^{2+} , sondern auch durch TSH induzieren lässt (Barasch *et al.*, 1988), wird außerdem eine physiologische Funktion im thyreotropen Regelkreis diskutiert. Demgegenüber stehen pathophysiologische Beobachtungen, welche verdeutlichen, dass die Rolle des Hormons noch nicht vollständig verstanden ist. So findet man unter Patienten mit Calcitonin-Defizienz oder –Überschuss teilweise unter MTC-Erkrankungen lediglich diarrhöische Symptome (Felsenfeld und Levine, 2015). Eine Thyreoidektomie scheint diesbezüglich ebenfalls nahezu symptomlos zu verlaufen (Davey und Findlay, 2013). Dies lässt einen kompensatorischen Mechanismus vermuten, der eine Beeinträchtigung insbesondere des Ca^{2+} -homöostatischen Systems verhindert. Dagegen sind die Folgen während Schwangerschaft und Laktation beachtlich, da Calcitonin-defiziente Mäuse eine größere Abnahme an Knochenmineralien aufweisen und das Erreichen des Knochenmineral-Normwerts mehr Zeit in Anspruch nimmt als beim Wildtyp (Woodrow *et al.*, 2006). Ein besseres Verständnis zur Physiologie des Hormons ist daher unerlässlich, um seine Funktion im Ca^{2+} -Haushalt nachzuvollziehen. Eine diesbezüglich erweiterte Kenntnislage würde auch die Möglichkeit bieten, die Folgen einer fehlregulierten Menge an *TRPM5* einzuschätzen. Nach dem in der Arbeit aufgestellten Modell könnte eine Hoch- bzw. Runterregulation des Kanals in einer Hypo- bzw. Hypercalcämie resultieren. Überprüfung der Expression des Ionenkanals mit Hilfe einer Schilddrüsenbiopsie könnte hierauf Hinweise liefern und insbesondere während Schwangerschaft und Laktation eine Möglichkeit bieten, eine solche Fehlregulation frühzeitig zu erkennen. Für die Diagnostik von MTC-Tumoren scheint die *TRPM5*-Expression dagegen weniger entscheidend zu sein, da diese in der Regel durch Mutationen im *RET*-Gen ausgelöst werden.

Ein möglicherweise unterrepräsentierter Forschungsansatz bezüglich der parafollikulären Zellfunktion ist die Hypothese, dass C-Zellen nicht nur den Ca^{2+} -

Haushalt im Körper regulieren, sondern auch Einfluss auf die nah angrenzenden Schilddrüsenfollikel nehmen (Gershon *et al.*, 1978; Fernández-Santos *et al.*, 2012). Die entsprechende Nähe der beiden unterschiedlichen Zelltypen wäre somit anatomisch sinnvoll. Dies wird dadurch bestärkt, dass C-Zellen insbesondere dort prädominieren, wo die aktivsten Follikel der Schilddrüse vorliegen (Kalisnik *et al.*, 1989). Dass es regulatorische Mechanismen zwischen parafollikulärer und follikulärer Zelle gibt, bestätigen systematische Untersuchungen. Dabei ist interessanterweise zu vermerken, dass parafollikuläre Zellen eine gemeinsame Verpackung von Calcitonin und Serotonin aufweisen (Barasch *et al.*, 1987; Tamir und Gershon, 1990;). Eine gemeinsame Sekretion scheint daher mehr als plausibel und wird durch gemeinsam genutzte Signalwege gestützt, welche der Hormonsekretion vorangehen (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). Eine veränderte Sekretion der parafollikulären Vesikel ändert daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht nur die sezernierte Menge an Calcitonin, sondern auch die an Serotonin. Welche Wirkung das dort sezernierte Serotonin besitzt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Sowohl Calcitonin als auch Serotonin konnten jedoch in Zusammenhang mit einem Einfluss auf Schilddrüsenhormone gebracht werden. Es scheint, dass Calcitonin alleine keinen Einfluss auf die Sekretion ebendieser nimmt, jedoch einen inhibitorischen Effekt auf ihre Sekretion besitzt, wenn es in Kombination mit den ebenfalls von den C-Zellen synthetisierten Calcitonin-Derivaten CGRP und Katalcalcin ausgeschüttet wird (Ahrén, 1989). Dagegen scheint Serotonin die Synthese der Schilddrüsenhormone zu stimulieren (Tamir *et al.*, 1992; Fernández-Santos *et al.*, 2012). Zudem konnte durch die Zugabe einer niedrigen Serotoninmenge (5 μM) proliferatives Verhalten der follikulären Zellen und durch die Zugabe einer hohen Serotoninmenge ($\geq 50 \mu\text{M}$) apoptotisches Verhalten der follikulären Zellen induziert werden (Cerulo *et al.*, 2014). Auch die Expression des *TSHR* sowie die Stimulierbarkeit der Calcitonin- und Serotoninsekretion nicht nur durch Ca^{2+} , sondern auch durch TSH, unterstützen eine funktionelle Rolle der C-Zellen im thyreotropen Regelkreis (Barasch *et al.*, 1988; Morillo-Bernal *et al.*, 2009). Somit wäre es denkbar, dass eine Fehlregulation von TRPM5 nicht nur einen direkten Effekt auf die Schilddrüsenhormonsekretion aufgrund einer subsequenter Fehldosis an TSH besitzt (siehe Kapitel 4.1), sondern diese zusätzlich durch indirekten Effekt *via* C-

Zellen beeinflusst werden. Durch Nutzen von TRPM5 als diagnostischen Marker könnte ein solcher Doppelleffekt mit Hilfe einer Schilddrüsenbiopsie oder im Rahmen einer Keimbahnmutation mit Hilfe einer Colon-Stanze frühzeitig aufgedeckt werden. Anschließend könnte die entsprechende Therapie eingeleitet werden. Bei ihrer Durchführung müsste eine systemische Aktivierung oder Inhibierung des Ionenkanals aufgrund seiner funktionellen Rolle im Pankreas und nach den vorliegenden Daten auch im thyreotropen Regelkreis vermieden werden. Stattdessen könnte eine Therapie mittels eines Nanopartikel-basierten *Drug Targeted Delivery Systems* in Frage kommen, welches die gewebespezifische Abgabe eines Aktivators bzw. Inhibitors bei Unter- bzw. Überfunktion von TRPM5 gewährleistet.

4.3 Ausblick

Der Mechanismus der Sekretionsantwort ist sowohl in der Hypophyse wie auch in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse bislang nicht vollständig verstanden. TRPM5 scheint diesbezüglich ein vielversprechendes Verbindungsstück zu sein, der Signalweg und Sekretion mit Hilfe eines Depolarisationssignals verbindet. In den bisherigen Kenntnisstand bezüglich des Zell-Signalings lässt der Ionenkanal sich mit den vorliegenden Daten schlüssig einordnen und lässt eine generalisierte Rolle in der Hormonsekretion vermuten. Insbesondere elektrophysiologische Untersuchungen müssen verbliebene offene Fragen klären. Initial könnte hierfür eine Dialyse der TRPM5-überexprimierenden Zellen mit Ca^{2+} -Ionen mit anschließender Messung des Ca^{2+} -Stroms durchgeführt werden, um den Einfluss des Ionenkanals auf die VDCCs zu verifizieren. Depletion von extrazellulären Na^{+} - bzw. K^{+} -Ionen dürfte klären, mit welchen der beiden Ionen TRPM5 zur Sekretionsantwort beiträgt. Zusätzlich sollte der zur TRPM5-Aktivierung führende Mechanismus in diesen Zellen überprüft werden, für welchen nach den aufgestellten Modellen drei Szenarien in Frage kommen: Alleinige Aktivierung durch Entleerung intrazellulärer Speicher, alleinige Aktivierung durch initial geöffnete VDCCs oder eine kombinatorische Aktivierung der beiden Mechanismen. L-Kanal-Blocker, wie Nimodipin oder Nifedipin, und Ca^{2+} -Depletion intrazellulärer Speicher durch Gabe von Thapsigargin könnten diese Fragen beantworten. Da in TT-

Zellen scheinbar Ca^{2+} -Kanäle des T-Typs prädominieren (Biagi *et al.*, 1992), könnte alternativ die Auswirkung ihrer Blockade mit Mibefradil getestet werden. Dieser Kanaltyp wird im Vergleich zu VDCCs vom L-Typ bereits bei geringerer Depolarisation der Zelle aktiviert. Da außerdem eine direkte Rolle von TRPM5 im Fusionsprozess der Vesikel mit der Zellmembran β -pankreatischer Zellen vermutet wird (Brixel *et al.*, 2010), könnte eine passive Depolarisation von isolierten *Trpm5*^{-/-}-Hypophysen bzw. – C-Zellen mittels Arginin die Untersuchungen abrunden. Ihre Auswirkung müsste durch elektrophysiologische Tests sowie durch Messung der Überstände bezüglich ihrer TSH- bzw. Calcitonin-Konzentration zur Analyse des Effekts auf die Hormonsekretion bestimmt werden. Funktionelle Analysen weiterer Drüsengewebe könnten zudem klären, ob sich die vermutete generalisierte Rolle des Ionenkanals in der Hormonsekretion auf weitere Sekretionsmechanismen erweitern lässt. Diesbezüglich lässt die bekannte Expressionsstärke von *TRPM5* (Prawitt *et al.*, 2000) eine funktionelle Rolle des Ionenkanals auch in Prostata und Nebenniere vermuten, sodass Funktionsstudien dieser Gewebe hierfür in Frage kämen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein im Mausmodell fehlender TRPM5-Ionenkanal in Zusammenhang mit einer adenohipophysär bedingten zentralen Hypothyreose gebracht werden. Nachfolgende transkriptionelle Analysen wie auch Analysen bezüglich der Hormonsekretion zeigten Hinweise auf eine Involvierung von TRPM5. Der in der Literatur bekannte Signalweg des TRH-*Signalings* beeinflusst jedoch nicht nur Transkription und Sekretion des TSH-Hormons, sondern auch seine Glykosylierung (Weintraub *et al.*, 1989; Joseph-Bravo *et al.*, 2016). Daher sollten zusätzliche Untersuchungen zu einem möglichen Effekt von TRPM5 auch auf Glykosylierung des TSH-Hormons durchgeführt werden. Zudem ließe sich das gezeigte Bild der zentralen Hypothyreose durch TRH-Stimulation und anschließender TSH-Bestimmung im Serum von *Trpm5*^{-/-}-Mäusen vervollständigen. Interessanterweise geht eine zentrale Hypothyreose meist nicht nur mit einer veränderten TSH-Sekretion einher, sondern zeigt auch Betroffenheit anderer hypophysärer Hormone (engl. *combined pituitary hormone deficiency*, CPHD) (Persani, 2012). Eine Serumbestimmung der *Trpm5*^{-/-}-Mäuse bezüglich der Hormone

Somatotropin (engl. *growth hormone*, GH), Prolaktin (PRL), luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Adrenocorticotropin (ACTH) wäre daher sinnvoll. Außerdem zeigt sich eine zentrale Hypothyreose aufgrund eines Defekts in der Hypophyse meist in Kombination mit einer Störung im Hypothalamus (Persani, 2012). Ob TRPM5 dort ebenfalls eine Involvierung in die Hormonsekretion zeigt, sollte in den *Knockout*-Mäusen durch Bestimmung des TRH-Serumspiegels adressiert werden.

Neben einer möglichen Rolle von TRPM5 in der Hypophyse konnte in der vorliegenden Arbeit auch ein Zusammenhang in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse hergestellt werden. Der Sekretionsmechanismus von Calcitonin ist in diesen Zellen zu großen Teilen noch ungeklärt. Ob die PI-PLC für die Signalkaskade entscheidend ist, konnte bislang noch nicht abschließend festgestellt werden. Nach Fertigstellung der elektrophysiologischen Untersuchungen könnte daher der Einfluss von PI-PLC auf die Aktivierung von TRPM5 und subsequenter Calcitoninsekretion überprüft werden. Hierfür würde sich aufgrund der beschriebenen Problematik einer unspezifischen Inhibitor-Wirkung auf PI-PLC ein RNAi-vermittelter *Knockdown* der PI-PLC eignen. Neben dem noch bruchstückhaft geklärten Sekretionsmechanismus ist auch die physiologische Rolle von Calcitonin bis heute noch nicht vollständig verstanden. Während Schwangerschaft und Laktation wird dem Hormon jedoch eine große Rolle zugeschrieben, die einen zu großen Verlust des Knochen- Ca^{2+} durch Transfer auf das Kind verhindert. Patientenproben schwangerer oder laktierender Mütter mit einem Defekt in dieser Blockade könnten deshalb auf Fehlregulationen des TRPM5-Kanals untersucht werden. Im Rahmen einer Keimbahnmutation wären auffällige Parameter in der Sekretion von Insulin, MUC5AC, TSH, fT4 und Calcitonin und darüber hinaus ein Defekt im Schmecken der Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami zu erwarten. So könnten die hormonellen Parameter nach Bestimmung der Parameter-Richtlinien ins Blutbild aufgenommen und diagnostisch nutzbar gemacht werden. Außerdem könnte TRPM5 schließlich durch einfache und kostengünstige Geschmackstests als diagnostischer Marker genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Der Ionenkanal TRPM5 trägt durch seinen nichtselektiven Transport von monovalenten Kationen dazu bei, in spezifischen Geweben Signalkaskaden der Zelle durch ein Depolarisationssignal mit der Ausschüttung eines zelltypischen Proteins zu verknüpfen. Auf diese Weise beteiligt TRPM5 sich z. B. an der Feinregulation der Insulinsekretion. Neben den β -Zellen des Pankreas zeigt der Ionenkanal auch in weiteren Drüsengeweben eine starke Expression, was eine allgemeine Funktionalität des Kanals im drüsigen Gewebetyp suggeriert. Dies veranlasste in der vorliegenden Arbeit dazu, die physiologische Relevanz von TRPM5 im thyreotropen Regelkreis und den parafollikulären Zellen zu untersuchen. Serumanalysen von *Trpm5*^{-/-}-Mäusen wiesen reduzierte fT4- sowie reduzierte TSH-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp auf, und zeigten somit Symptome einer zentralen Hypothyreose. Gleichzeitig konnte in follikulären Zelllinien keine endogene Expression des Ionenkanals nachgewiesen werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass TRPM5 in follikulären Zellen der Schilddrüse keine funktionelle Rolle zu spielen scheint, und daher eine physiologische Relevanz in Hypophyse und parafollikulären Zellen zu erwarten ist. Zelllinien beider Gewebe zeigten eine endogene Expression für *TRPM5* und unterstützten diese Annahme. Mutationsanalysen des *TRPM5*-Gens von Patienten mit reduziertem fT4- und reduziertem TSH-Spiegel wiesen keine offensichtlichen Effekte auf essentielle Domänen des Translationsprodukts auf, sodass keine eindeutige Assoziation zwischen Polymorphismen/ Mutationen des Gens und einem präthyreotischen Phänotyp beschrieben werden konnte. Überexpression des Ionenkanals in der murinen Hypophysenzelllinie Tat1 führte nach TRH-Stimulation zu einer verfrühten Expressionssteigerung des *Tshb*-Gens sowie einer tendenziellen Steigerung der TSH-Sekretion. Somit scheint eine Beteiligung des Ionenkanals an den bisher identifizierten Signalwegen wahrscheinlich. Die Regulation der verantwortlichen Signalwege erfolgt über die Aktivierung eines G-Proteins, welche über PLC zu einem Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ führt. Über eine Depolarisation, zu der die Aktivierung von TRPM5 beitragen könnte, ist dieser Weg an die Öffnung von VDCCs gekoppelt und ermöglicht parallel zur aktivierten PKC die Transkription und Sekretion des TSH-Hormons.

Die Analyse zur physiologischen Relevanz von TRPM5 in parafollikulären Zellen zeigte bei zwei von drei MTC-Entitäten eine starke Korrelation der Expression von *CALCA* und *TRPM5*. Zudem konnte eine starke Expression des Ionenkanals in der humanen Zelllinie TT nachgewiesen werden. Beides ließ eine physiologische Rolle von TRPM5 in diesem Zelltyp vermuten. Diese wurde durch Überexpression des Kanals in TT und anschließender Stimulation der Calcitoninsekretion untersucht. Zu bestimmten Zeitpunkten konnte eine erhöhte Calcitoninsekretion in *TRPM5*-überexprimierenden Zellen beobachtet werden, was die Hypothese zur physiologischen Relevanz von TRPM5 in diesem Zelltyp stützte. Dabei ist ein Beitrag des Ionenkanals zur Zelldepolarisation denkbar, welcher einen der Hypophyse sehr ähnlichen Signalweg mit der Aktivierung von VDCCs und nachfolgender Hormonsekretion verknüpft. Es kann diskutiert werden, ob TRPM5 eine generalisierte Rolle in der Öffnung von VDCCs hormoneller Gewebe und damit in der Feinregulation der Hormonsekretion durch Depolarisation spielt.

6 Literaturverzeichnis

A

Abdullah L. H., Davis S. W., Burch L., Yamauchi M., Randell S. H., Nettesheim P., Davis C. W. (1996). P2u purinoceptor regulation of mucin secretion in SPOC1 cells, a goblet cell line from the airways. *Biochem J.* 316, 943-951.

Abdullah L. H., Conway J. D., Cohn J. A., Davis C. W. (1997). Protein kinase C and Ca²⁺ activation of mucin secretion in airway goblet cells. *Am J Physiol.* 273, L201-210.

Abel E. D., Ahima R. S., Boers M. E., Elmquist J. K., Wondisford F. E. (2001). Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 107, 1017-1023.

Accardo G., Conzo G., Esposito D., Gambardella C., Mazzella M., Castaldo F., Di Donna C., Polistena A., Avenia N., Colantuoni V., Giugliano D., Pasquali D. (2017). Genetics of medullary thyroid cancer: An overview. *Int J Surg.* 41 Suppl 1, S2-S6. Review.

Ahrén B. (1989). Effects of calcitonin, katalcalcin, and calcitonin gene-related peptide on basal and TSH-stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand.* 135, 133-137.

Akeno-Stuart N., Croyle M., Knauf J. A., Malaguarnera R., Vitagliano D., Santoro M., Stephan C., Grosios K., Wartmann M., Cozens R., Caravatti G., Fabbro D., Lane H. A., Fagin J. A. (2007). The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Res.* 67, 6956-6964.

Alarid E. T., Windle J. J., Whyte D. B., Mellon P. L. (1996). Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 122, 3319-3329.

Algeciras-Schimnich A., Preissner C. M., Theobald J. P., Finseth M. S., Grebe S. K. (2009). Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 94, 861-868.

Allelein S., Feldkamp J., Schott M. (2017). Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen. *Internist*

58, 47-58.

Ashworth R., Hinkle P. M. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology* 137, 5205-5212.

B

Bae Y. J., Schaab M., Kratzsch J. (2015). Calcitonin as Biomarker for the Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 204, 117-137. Review.

Baens M., Noels H., Broeckx V., Hagens S., Fevery S., Billiau A. D., Vankelecom H., Marynen P. (2006). The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One* 1, e54.

Barasch J. M., Tamir H., Nunez E. A., Gershon M. D. (1987). Serotonin-storing secretory granules from thyroid parafollicular cells. *J Neurosci.* 7, 4017-4033.

Barasch J., Gershon M. D., Nunez E. A., Tamir H., al-Awqati Q. (1988). Thyrotropin induces the acidification of the secretory granules of parafollicular cells by increasing the chloride conductance of the granular membrane. *J Cell Biol.* 107, 2137-2147.

Bargal R., Avidan N., Ben-Asher E., Olender Z., Zeigler M., Frumkin A., Raas-Rothschild A., Glusman G., Lancet D., Bach G. (2000). Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV. *Nature Genetics* 26, 118-123.

Bassi M. T., Manzoni M., Monti E., Pizzo M. T., Ballabio A., Borsani G. (2000). Cloning of the Gene Encoding a Novel Integral Membrane Protein, Mucopolipidin - and Identification of the Two Major Founder Mutations Causing Mucopolipidosis Type IV. *American Journal of Human Genetics* 67, 1110–1120.

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

Bautista D. M., Siemens J., Glazer J. M., Tsuruda P. R., Basbaum A. I., Stucky C. L., Jordt S. E., Julius D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.

Bertazza L., Barollo S., Radu C. M., Cavedon E., Simioni P., Faggian D., Plebani M.,

Pelizzo M. R., Rubin B., Boscaro M., Pezzani R., Mian C. (2015). Synergistic antitumour activity of RAF265 and ZSTK474 on human TT medullary thyroid cancer cells. *J Cell Mol Med.* 19, 2244-2252.

Bertrand C. A., Danahay H., Poll C. T., Laboisie C., Hopfer U., Bridges R. J. (2004). Niflumic acid inhibits ATP-stimulated exocytosis in a mucin-secreting epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286, C247-255.

Biagi B. A., Mlinar B., Enyeart J. J. (1992). Membrane currents in a calcitonin-secreting human C cell line. *Am J Physiol.* 263, C986-994.

Bou-Hanna C., Berthon B., Combettes L., Claret M., Laboisie C. L. (1994). Role of calcium in carbachol- and neurotensin-induced mucin exocytosis in a human colonic goblet cell line and cross-talk with the cyclic AMP pathway. *Biochem J.* 299, 579-585.

Brent G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 122, 3035-3043. Review.

Brixel L. R., Monteilh-Zoller M. K., Ingenbrandt C. S., Fleig A., Penner R., Enklaar T., Zabel B. U., Prawitt D. (2010). TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflugers Arch.* 460, 69-76.

Brożyna A. A., Guo H., Yang S. E., Cornelius L., Linette G., Murphy M., Sheehan C., Ross J., Slominski A., Carlson J. A. (2017). TRPM1 (melastatin) expression is an independent predictor of overall survival in clinical AJCC stage I and II melanoma patients. *J Cutan Pathol.* 44, 328-337.

C

Carr F. E., Shupnik M. A., Burnside J., Chin W. W. (1989). Thyrotropin-releasing hormone stimulates the activity of the rat thyrotropin beta-subunit gene promoter transfected into pituitary cells. *Mol Endocrinol.* 3, 717-724.

Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J.D., Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeitz K. R.,

- Koltzenburg M., Basbaum A. I., Julius D. (2000).** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.
- Ceolin L., Siqueira D. R., Romitti M., Ferreira C. V., Maia A. L. (2012).** Molecular basis of medullary thyroid carcinoma: the role of RET polymorphisms. *Int J Mol Sci.* 13, 221-239. Review.
- Cerulo G., Tafuri S., De Pasquale V., Rea S., Romano S., Costagliola A., Della Morte R., Avallone L., Pavone L. M. (2014).** Serotonin activates cell survival and apoptotic death responses in cultured epithelial thyroid cells. *Biochimie* 105, 211-215.
- Chaker L., Bianco A. C., Jonklaas J., Peeters R. P. (2017; im Druck).** Hypothyroidism. *The Lancet.* doi: 10.1016/S0140-6736(17)30703-1.
- Chase L. R., Aurbach G. D. (1967).** Parathyroid function and the renal excretion of 3'5'-adenylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 58, 518–525.
- Cheng H., Beck A., Launay P., Gross S. A., Stokes A. J., Kinet J. P., Fleig A., Penner R. (2007).** TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 41, 51-61.
- Cheng L. E., Song W., Looger L. L., Jan L. Y., Jan Y. N. (2010).** The role of the TRP channel NompC in *Drosophila* larval and adult locomotion. *Neuron* 67, 373–380.
- Chubanov V., Waldegger S., Mederos y Schnitzler M., Vitzthum H., Sassen M. C., Seyberth H. W., Konrad M., 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 USA* 101, 2894-2899.
- Clapham D. E. (2003).** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524. Review.
- Colsool B., Schraenen A., Lemaire K., Quintens R., Van Lommel L., Segal A., Owsianik G., Talavera K., Voets T., Margolske R. F., Kokrashvili Z., Gilon P., Nilius B., Schuit F. C., Vennekens R. (2010).** Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 5208-5213.
- Conigrave A. D., Ward D. T. (2013).** Calcium-sensing receptor (CaSR): pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 27, 315-331.

Review.

Copp D. H., Cameron E. C., Cheney B. A., Davidson A. G., Henze K. G. (1962). Evidence for Calcitonin- A New Hormone from the Parathyroid That Lowers Blood Calcium. *Endocrinology* 70, 638-649.

D

Davey R. A., Findlay D. M. (2013). Calcitonin: Physiology or fantasy? *Journal of Bone and Mineral Research* 28, 973–979. Review.

de Wet J. R., Wood K. V., Helinski D. R., DeLuca M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7870-7873.

Duncan L. M., Deeds J., Hunter J., Shao J., Holmgren L. M., Woolf E. A., Tepper R. I., Shyjan A. W. (1998). Down-Regulation of the Novel Gene *Melastatin* Correlates with Potential for Melanoma Metastasis. *Cancer Res* 58, 1515-1520.

Duncan L. M., Deeds J., Cronin F. E., Donovan M., Sober A. J., Kauffman M., McCarthy J. J. (2001). *Melastatin* Expression and Prognosis in Cutaneous Malignant Melanoma. *J Clin Oncol* 19, 568-576.

E

Ehre C., Zhu Y., Abdullah L. H., Olsen J., Nakayama K. I., Nakayama K., Messing R. O., Davis C. W. (2007). nPKCepsilon, a P2Y2-R downstream effector in regulated mucin secretion from airway goblet cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293, C1445-1454.

Engelke M., Friedrich O., Budde P., Schäfer C., Niemann U., Zitt C., Jüngling E., Rocks O., Lückhoff A., Frey J. (2002). Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* 523, 193-199.

Enklaar T., Esswein M., Oswald M., Hilbert K., Winterpacht A., Higgins M., Zabel B., Prawitt D. (2000). Mtr1, a novel biallelically expressed gene in the center of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, is a member of the Trp gene family. *Genomics* 15, 179-187.

Estour B., Van Herle A. J., Juillard G. J., Totanes T. L., Sparkes R. S., Giuliano A. E., Klandorf H. (1989). Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA

RO 82 W-1). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 57, 167-174.

F

Fang D., Setaluri V. (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of *melastatin*, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 279, 53-61.

Felsenfeld A. J., Levine B. S. (2015). Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clin Kidney J.* 8, 180-187. Review.

Fernández-Santos J. M., Morillo-Bernal J., García-Marín R., Utrilla J. C. and Martín-Lacave I. (2012). Paracrine Regulation of Thyroid-Hormone Synthesis by C Cells. In: Dr. N.K. Agrawal (Hrsg.). *Thyroid Hormone.* InTech, 51-84. Review.

Finger T. E., Kinnamon S. C. (2011). Matters of Taste. *The Scientist* Ausgabe November. Basierend auf: Finger T. E., Kinnamon S. C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biology Reports* 3, 20. Review.

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

Foster G. V., Macintyre I., Pearse A. G. (1964). Calcitonin production and the Mitochondrion-rich cells of the dog thyroid. *Nature* 203, 1029-1030.

Freichel M., Zink-Lorenz A., Holloschi A., Hafner M., Flockerzi V., Raue F. (1996). Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion. *Endocrinology* 137, 3842-3848.

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., 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.

G

Garcia-Sanz N., Fernández-Carvajal A., Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Fajardo-Sánchez E., Fernández-Ballester G., Ferrer-Montiel A. (2004). Identification of a

tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24, 5307-5314.

Gershon M. D., Kanarek D., Nunez E. A. (1978). Calcium-induced release of 5-hydroxytryptamine from thyroid lobes in vitro and accompanying ultrastructural changes in parafollicular and follicular cells. *Endocrinology* 103, 1128-1143.

Green B., Leake R. E. (1987). *Steroid Hormones: A Practical Approach*. IRL Press, 213-214.

Greka A., Navarro B., Oancea E., Duggan A., Clapham D. E. (2003). TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6, 837-845.

Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C., and Gelbart W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis. Mutant types*. W. H. Freeman, 7. Auflage.

H

Haller-Brem S., Muff R., Petermann J. B., Born W., Roos B. A., Fischer J. A. (1987). Role of cytosolic free calcium concentration in the secretion of calcitonin gene-related peptide and calcitonin from medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrinology* 121, 1272-1277.

Hara Y., Wakamori M., Ishii M., Maeno E., Nishida M., Yoshida T., Yamada H., Shimizu S., Mori E., Kudoh J., Shimizu N., Kurose H., Okada Y., Imoto K., Mori Y. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death. *Molecular Cell* 9, 163-173.

Harris A. R. C., Christianson D., Smith M. S., Fang S., Braverman L. E., Vagenakis, A. G. (1978). The Physiological Role of Thyrotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Thyroid-Stimulating Hormone and Prolactin Secretion in the Rat. *Journal of Clinical Investigation* 61, 441–448.

Hashimoto K., Zanger K., Hollenberg A. N., Cohen L. E., Radovick S., Wondisford F. E. (2000). cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J Biol Chem* 275, 33365-33372.

Hinkle P. M., Gehret A. U., Jones B. W. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front Neurosci.* 6, 180. Review.

Hoenderop J. G., Voets T., Hoefs S., Weidema F., Prenen J., Nilius B., Bindels R. J. (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22, 776-785.

Hofmann T., Chubanov V., Gudermann T., Montell C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* 13, 1153-1158.

Huang W., Barrett M., Hajicek N., Hicks S., Harden T. K., Sondek J., Zhang Q. (2013). Small molecule inhibitors of phospholipase C from a novel high-throughput screen. *J Biol Chem* 288, 5840-5848.

I

Ikegami K., Liao X., Hoshino Y., Ono H., Ota W., Ito Y., Nishiwaki-Ohkawa T., Sato C., Kitajima K., Iigo M., Shigeyoshi Y., Yamada M., Murata Y., Refetoff S., Yoshimura, T. (2014). Tissue-specific post-translational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Reports* 9, 801–809.

J

Jin X., Touhey J., Gaudet R. (2006). Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* 281, 25006-25010.

Joseph-Bravo P., Jaimes-Hoy L., Charli J. L. (2016). Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 17, 545-558. Review.

K

Kalisnik M., Vraspir-Porenta O., Kham-Lindtner T., Logonder-Mlinsek M., Pajer Z., Stiblar-Martincic D., Zorc-Pleskovic R., Trobina M. (1989). The interdependence of the follicular, parafollicular, and mast cells in the mammalian thyroid gland: a review and a synthesis. *Am J Anat.* 183, 148-157. Review.

Kedei N., Szabo T., Lile J. D., Treanor J. J., Olah Z., Iadarola M. J., Blumberg P. M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276, 28613-28619.

Ketterer C., Müssig K., Heni M., Dudziak K., Randrianarisoa E., Wagner R., Machicao F.,

Stefan N., Holst J. J., Fritsche A., Häring H. U., Staiger H. (2011). Genetic variation within the TRPM5 locus associates with prediabetic phenotypes in subjects at increased risk for type 2 diabetes. *Metabolism* 2011 60, 1325-1333.

Kim K. K., Song S. B., Kang K. I., Rhee M., Kim K. E. (2007). Activation of the thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene by LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Endocrinology* 148, 3468-3476.

Kita M., Ahmad L., Marians R. C., Vlase H., Unger P., Graves P. N., Davies T. F. (1999). Regulation and transfer of a murine model of thyrotropin receptor antibody mediated Graves' disease. *Endocrinology* 140, 1392-1398.

Kleeman C. R., Massry S. G., Coburn J. W. (1971). The clinical physiology of calcium homeostasis, parathyroid hormone, and calcitonin. I. *California Medicine* 114, 16–43.

Klein R. R., Bourdon D. M., Costales C. L., Wagner C. D., White W. L., Williams J. D., Hicks S. N., Sondak J., Thakker D. R. (2011). Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *J Biol Chem.* 286, 12407-12416.

Kolaj M., Zhang L., Renaud L. P. (2016). L-type calcium channels and MAP kinase contribute to thyrotropin-releasing hormone-induced depolarization in thalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 310, R1120-1127.

Kruse M., Schulze-Bahr E., Corfield V., Beckmann A., Stallmeyer B., Kurtbay G., Ohmert I., Schulze-Bahr E., Brink P., Pongs O. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest.* 119, 2737-2744.

L

Launay P., Fleig A., Perraud A. L., Scharenberg A. M., Penner R., Kinet J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397 – 407.

Launay P., Cheng H., Srivatsan S., Penner R., Fleig A., Kinet J. P. (2004). TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* 306, 1374-1377.

Lee G., Connell C. R., Woo S. L., Cheng R. D., McArdle B. F., Fuller C. W., Halloran N. D.,

- Wilson R. K. (1992).** DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* 20, 2471-2483.
- Lemoine N. R., Mayall E. S., Jones T., Sheer D., McDermid S., Kendall-Taylor P., Wynford-Thomas D. (1989).** Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* 60, 897-903.
- Leong S. S., Horoszewicz J. S., Shimaoka K., Freidman M., Kawinski E., Song M. J., Zeigel R., Chu T. M., Baylin S., Mirand E. A. (1981).** A new cell line for study of human medullary thyroid carcinoma. In: Andreoli M., Monaco F., Robbins J. (Hrsg.) *Advances in Thyroid Neoplasia 1981*. Field Educational Italia, Rome, 95-108.
- Leybold B. G., Yu C. R., Leinders-Zufall T., Kim M. M., Zufall F., Axel R. (2002).** Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6376-6381.
- Li Y., Jia Y. C., Cui K., Li N., Zheng Z. Y., Wang Y. Z., Yuan X. B. (2005).** Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434, 894-898.
- Liang X., Madrid J., Saleh H. S., Howard J. (2011).** NOMPC, a Member of the TRP Channel Family, Localizes to the Tubular Body and Distal Cilium of *Drosophila* Campaniform and Chordotonal Receptor Cells. *Cytoskeleton* 68, 1–7.
- Litosch I. (2003).** Regulation of Phospholipase C- β Activity by Phosphatidic Acid: Isoform Dependence, Role of Protein Kinase C, and G Protein Subunits. *Biochemistry* 42, 1618–1623.
- Litosch I. (2009).** Phosphatidic acid potentiates G(α)q stimulation of phospholipase C-beta1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 390, 603-607.
- Liu P., Xu Y., Hopfner R. L., Gopalakrishnan V. (1999).** Phosphatidic acid increases inositol-1,4,5,-trisphosphate and $[Ca^{2+}]_i$ levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1440, 89-99.
- Liu K., Hsiung S., Adlersberg M., Sacktor T., Gershon M. D., Tamir H. (2000).** Ca^{2+} -evoked serotonin secretion by parafollicular cells: roles in signal transduction of phosphatidylinositol 3'-kinase, and the gamma and zeta isoforms of protein kinase C. *J Neurosci.* 20, 1365-1373.

Liu D., Liman E. R. (2003). Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15160-15165.

Liu K. P., Russo A. F., Hsiung S. C., Adlersberg M., Franke T. F., Gershon M. D., Tamir H. (2003). Calcium receptor-induced serotonin secretion by parafollicular cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Neurosci.* 23, 2049-2057.

Liu X., Bandyopadhyay B. C., Singh B. B., Groschner K., Ambudkar I. S. (2005). Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem* 280, 21600-21606.

Liu H., El Zein L., Kruse M., Guinamard R., Beckmann A., Bozio A., Kurtbay G., Mégarbané A., Ohmert I., Blaysat G., Villain E., Pongs O., Bouvagnet P. (2010). Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 3, 374-385.

Löf C., Sukumaran P., Viitanen T., Vainio M., Kemppainen K., Pulli I., Näsman J., Kukkonen J. P., Törnquist K. (2012). Communication between the calcium and cAMP pathways regulate the expression of the TSH receptor: TRPC2 in the center of action. *Mol Endocrinol.* 26, 2046-2057.

Lorenz W. W., McCann R. O., Longiaru M., Cormier M. J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4438-4442.

M

Maruta S., Greer M. A. (1988). Evidence that thyroxine inhibits either basal or TRH-induced TSH secretion only after conversion to triiodothyronine. *Proc Soc Exp Biol Med* 187, 391-397.

Mason M. E., Friend K. E., Copper J., Shupnik M. A. (1993). Pit-1/GHF-1 binds to TRH-sensitive regions of the rat thyrotropin beta gene. *Biochemistry* 32, 8932-8938.

Matsui T., Kuramitsu N., Yano H., Kawashima R. (1983). Suppressive Effect of Calcitonin on Intestinal Absorption of Calcium and Phosphorus in Sheep. *Endocrinol. Japon* 30, 485-490.

McCleverty C. J., Koesema E., Patapoutian A., Lesley S. A., Kreusch A. (2006). Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci* 15, 2201-2206.

- McDermott M. T., Ridgway E. C. (1998).** Central hyperthyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 27, 187-203.
- McGehee D. S., Aldersberg M., Liu K. P., Hsuing S., Heath M. J., Tamir H. (1997).** Mechanism of extracellular Ca²⁺ receptor-stimulated hormone release from sheep thyroid parafollicular cells. *J Physiol.* 502.1, 31-44.
- McKemy D. D., Neuhauser W. M., Julius D. (2002).** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.
- McNamara C. R., Mandel-Brehm J., Bautista D. M., Siemens J., Deranian K. L., Zhao M., Hayward N. J., Chong J. A., Julius D., Moran M. M., Fanger C. M. (2007).** TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13525-13530.
- Mei Z. Z., Xia R., Beech D. J., Jiang L. H. (2006).** Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. *J Biol Chem* 281, 38748-38756.
- Mei Z. Z., Jiang L. H. (2009).** Requirement for the N-terminal coiled-coil domain for expression and function, but not subunit interaction of, the ADPR-activated TRPM2 channel. *J Membr Biol.* 230, 93-99.
- Minke B., Wu C., Pak W. L. (1975).** Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84-87.
- Mitrovic S., Nogueira C., Cantero-Recasens G., Kiefer K., Fernández-Fernández J. M., Popoff J. F., Casano L., Bard F. A., Gomez R., Valverde M. A., Malhotra V. (2013).** TRPM5-mediated calcium uptake regulates mucin secretion from human colon goblet cells. *eLife* 2, e00658.
- Montell C. (2005).** The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* 2005, re3. Review.
- Morillo-Bernal J, Fernández-Santos J. M., Utrilla J. C., de Miguel M., García-Marín R., Martín-Lacave I. (2009).** Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: new insights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Anat.* 215, 150-158.

N

- Niwattisaiwong S., Burman K. D., Li-Ng M. (2017).** Iodine deficiency: Clinical implications.

Cleve Clin J Med. 84, 236-244.

O

Ohba K., Sasaki S., Matsushita A., Iwaki H., Matsunaga H., Suzuki S., Ishizuka K., Misawa H., Oki Y., Nakamura H. (2011). GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. PLoS One 6, e18667.

P

Parmentier M., Libert F., Maenhaut C., Lefort A., Gérard C., Perret J., Van Sande J., Dumont J. E., Vassart G. (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. Science 246, 1620-1622.

Pastan I., Roth J., Macchia V. (1966). Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. Proc Natl Acad Sci USA 56, 1802-1809.

Patt H. M., Luckhardt A. B. (1942). Relationship of a low blood calcium to parathyroid secretion. Endocrinology 31, 384-392.

Pearse A. G. (1966). The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. Proc R Soc Lond B Biol Sci 164, 478-487.

Pérez C. A., Huang L., Rong M., Kozak J. A., Preuss A. K., Zhang H., Max M., Margolskee R. F. (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. Nat Neurosci. 2002 5, 1169-1176.

Perraud A. L., Fleig A., Dunn C. A., Bagley L. A., Launay P., Schmitz C., Stokes A. J., Zhu Q., Bessmann M. J., Penner R., Kinet J. P., Scharenberg A. M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. Nature 411, 595-599.

Perraud A. L., Takanishi C. L., Shen B., Kang S., Smith M. K., Schmitz C., Knowles H. M., Ferraris D., Li W., Zhang J., Stoddard B. L., Scharenberg A. M. (2004). Accumulation of Free ADP-ribose from Mitochondria Mediates Oxidative Stress-induced Gating of TRPM2 Cation Channels. The Journal of Biological Chemistry 280, 6138-6148.

Persani L. (2012). Central Hypothyroidism: Pathogenic, Diagnostic, and Therapeutic Challenges. J Clin Endocrinol Metab 97, 3068-3078. Review.

Peters D. J. M., Spruit L., Saris J. J., Ravine D., Sandkuijl L. A., Fossdal R., Boersma J., van Eijk R., Nørby S., Constantinou-Deltas C. D., Pierides A, Briessenden J. E., Frants R., van Ommen G., Breuning M. H. (1993). Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genetics* 5, 359-362.

Petrus M., Peier A. M., Bandell M., Hwang S. W., Huynh T., Olney N., Jegla T., Patapoutian A. (2007). A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol. Pain* 3, 40.

Piotrowska U., Adler G., Kozicki I. (2015). Phosducin regulates secretory activity in TT line of thyroid parafollicular C cells. *Horm Metab Res.* 47, 114-118.

Popp M. W., Maquat L. E. (2013). Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet.* 47, 139-165. Review.

Prawitt D., Enklaar T., Klemm G., Gärtner B., Spangenberg C., Winterpacht A., Higgins M., Pelletier J., Zabel B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet.* 9, 203-216.

Prawitt D., Monteilh-Zoller M. K., Brixel L., Spangenberg C., Zabel B., Fleig A., Penner R. (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15166-15171.

Q

Qu W., Cingolani P., Zeeberg B. R., Ruden D. M. (2017; im Druck). A Bioinformatics-Based Alternative mRNA Splicing Code that May Explain Some Disease Mutations Is Conserved in Animals. *Frontiers in Genetics* 8, 38.

R

Raue F., Scherübl H. (1995). Extracellular calcium sensitivity and voltage-dependent calcium channels in C cells. *Endocr Rev.* 16, 752-764. Review.

Rivas M., Santisteban P. (2003). TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 213, 31-45. Review.

Rohacs T., Lopes C. M., Michailidis I., 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.

Rondeel J. M., de Greef W. J., Klootwijk W., Visser T. J. (1992). Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 130, 651-656.

Runnels L. W., Yue L., Clapham D. E. (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291, 1043-1047.

Ryazanova L. V., Dorovkov M. V., Ansari A., Ryazanov A. G. (2004). Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J. Biol. Chem.* 279, 3708-3716.

Ryazanova L. V., Rondon L. J., Zierler S., Hu Z., Galli J., Yamaguchi T. P., Mazur A., Fleig A., Ryazanov A. G. (2010). TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. *Nat Commun.* 1, 109-.

S

Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Schlingmann K. P., Weber S., Peters M., Niemann Nejsum L., Vitzthum H., Klingel K., Kratz M., Haddad E., Ristoff E., Dinour D., Syrrou M., Nielsen S., Sassen M., Waldegger S., Seyberth H. W., 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.

Schmid K. W. (2015). Histopathology of C Cells and Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 204, 41-60. Review.

Segerson T. P., Kauer J., Wolfe H. C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I. M., Lechan R. M.

(1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238, 78-80.

Shimojo N., Kohno Y., Yamaguchi K., Kikuoka S., Hoshioka A., Niimi H., Hirai A., Tamura Y., Saito Y., Kohn L. D., Tahara K. (1996). Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11074-11049.

Shin J. B., Adams D., Paukert M., Siba M., Sidi S., Levin M., Gillespie P. G., Gründer S. (2005). *Xenopus* TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12572-12577.

Shuman S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.

Shupnik M. A., Chin W. W., Habener J. F., Ridgway E. C. (1985). Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260, 2900-2903.

Shupnik M. A., Greenspan S. L., Ridgway E. C. (1986). Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture. *J Biol Chem.* 261, 12675-12679.

Shupnik M. A., Weck J., Hinkle P. M. (1996). Thyrotropin (TSH)-releasing hormone stimulates TSH beta promoter activity by two distinct mechanisms involving calcium influx through L type Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Mol Endocrinol.* 10, 90-99.

Sidi S., Friedrich R. W., Nicolson T. (2003). NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 301, 96-99.

Stallmeyer B., Zumhagen S., Denjoy I., Duthoit G., Hébert J. L., Ferrer X., Maugenre S., Schmitz W., Kirchhefer U., Schulze-Bahr E., Guicheney P., Schulze-Bahr E. (2012). Mutational spectrum in the Ca(2+)-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat.* 33, 109-117.

Steinfelder H. J., Hauser P., Nakayama Y., Radovick S., McClaskey J. H., Taylor T., Weintraub B. D., Wondisford F. E. (1991). Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc Natl Acad Sci USA*

88,3130-3134.

Steinfelder H. J., Radovick S., Mroczynski M. A., Hauser P., McClaskey J. H., Weintraub B. D., Wondisford F. E. (1992a). Role of a pituitary-specific transcription factor (pit-1/GHF-1) or a closely related protein in cAMP regulation of human thyrotropin-beta subunit gene expression. *J Clin Invest.* 89, 409-419.

Steinfelder H. J., Radovick S., Wondisford F. E. (1992b). Hormonal regulation of the thyrotropin beta-subunit gene by phosphorylation of the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5942-5945.

Stojilkovic S. S., Tabak J., Bertram R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev.* 31, 845-915. Review.

Stowers L., Holy T. E., Meister M., Dulac C., Koentges G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493-1500.

Sun M., Goldin E., Stahl S., Falardeau J. L., Kennedy J. C., Acierno J. S. Jr, Bove C., Kaneski C. R., Nagle J., Bromley M. C., Colman M., Schiffmann R., Slaugenhaupt S. A. (2000). Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet.* 9, 2471-2478.

T

Tamir H., Gershon M. D. (1990). Serotonin-storing secretory vesicles. *Ann N Y Acad Sci.* 600, 53-66.

Tamir H., Hsiung S. C., Yu P. Y., Liu K. P., Adlersberg M., Nunez E. A., Gershon M. D. (1992). Serotonergic signalling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT₂ receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse* 12, 155-168.

Togashi K., Hara Y., Tominaga T., Higashi T., Konishi Y., Mori Y., Tominaga M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* 25, 1804-1815.

Tomić M., Bargi-Souza P., Leiva-Salcedo E., Nunes M. T., Stojilkovic S. S. (2015). Calcium signaling properties of a thyrotroph cell line, mouse TαT1 cells. *Cell Calcium* 58, 598-605.

Tsuruda P. R., Julius D., Minor D. L. Jr. (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-

activated TRP channel. *Neuron* 51, 201-212.

V

Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. (2017; im Druck). Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* doi: 10.1007/s00439-017-1809-4.

Venkatachalam K., Montell C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387-417. Review.

Vriens J., Owsianik G., Hofmann T., Philipp S. E., Stab J., Chen X., Benoit M., Xue F., Janssens A., Kerselaers S., Oberwinkler J., Vennekens R., Gudermann T., Nilius B., Voets T. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482-94.

W

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

Walker R. G., Willingham A. T., Zuker C. S. (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287, 2229-2234.

Warshawsky H., Goltzman D., Rouleau M. F., Bergeron J. J. (1980). Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat. *J Cell Biol* 85, 682-694.

Weber K. S., Hildner K., Murphy K. M., Allen P. M. (2010). Trpm4 differentially regulates Th1 and Th2 function by altering calcium signaling and NFAT localization. *J Immunol.* 185, 2836-2846.

Weintraub B. D., Gesundheit N., Taylor T., Gyves P. W. (1989). Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. *Ann N Y Acad Sci.* 553, 205-213.

Will C. L., Lührmann R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003707.

Williams G. R. (2008). Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid

hormone. *J Neuroendocrinol.* 20, 784-794. Review.

Woodrow J. P., Sharpe C. J., Fudge N. J., Hoff A. O., Gagel R. F., Kovacs C. S. (2006). Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology* 147, 4010-4021.

Wu L., Sweet T., Clapham D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381-404. Review.

X

Xu X. Z., Moebius F., Gill D. L., Montell C. (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10692-10697.

Y

Yamaguchi H., Matsushita M., Nairn A. C., Kuriyan J. (2001). Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol. Cell.* 7, 1047-1057.

Yamamoto S., Shimizu S., Kiyonaka S., Takahashi N., Wajima T., Hara Y., Negoro T., Hiroi T., Kiuchi Y., Okada T., Kaneko S., Lange I., Fleig A., Penner R., Nishi M., Takeshima H., Mori Y. (2008). TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med.* 14, 738-747.

Z

Zabel M. (1984). Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem J.* 16, 1265-1272.

Zabel M., Grzeszkowiak J. (1997). Characterisation of thyroid medullary carcinoma TT cell line. *Histol Histopathol.* 12, 283-289.

Zatelli M. C., Gentilin E., Daffara F., Tagliati F., Reimondo G., Carandina G., Ambrosio M. R., Terzolo M., Degli Uberti E. C. (2010). Therapeutic concentrations of mitotane (o,p'-DDD) inhibit thyrotroph cell viability and TSH expression and secretion in a mouse cell line model. *Endocrinology* 151, 2453-2461.

Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C. S., Ryba N. J. (2003a). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301.

Zhang W., Chu X., Tong Q., Cheung J. Y., Conrad K., Masker K., Miller B. A. (2003b). A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem.* 278, 16222-16229.

Zitierte und weiterführende Internetquellen

<http://www.ensembl.org> (abgerufen am 08.05.2017, zur Angabe der SNP-Lokalisation nach GRCh38.p10 und der MAFs in Tabelle 3.1)

http://research.uni-leipzig.de/pharma/main/research/schaefer/TRP_multimerisation.html
(abgerufen am 29.03.2017)

<http://www.schildddruesenkrebs.de/schildddruese/hormonregler-tsh/> (abgerufen am 19.04.2017)

Zitierte und weiterführende Lehrbücher

Campbell N. A., Reece J. B., Mitchell L.G. (1999). *Biology* (5. Auflage). Benjamin Cummings Addison Wesley Longman. (Abbildung 1.8 abgedruckt mit Erlaubnis von Pearson Education, Inc., New York, New York.)

Martini F. H., Nath J. L., Bartholomew, E. F. (2012). *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (9. Auflage). Pearson Education Inc. Benjamin Cummings. (Abbildung 1.6 abgedruckt mit Erlaubnis von Pearson Education, Inc., New York, New York.)

Stathatos N. (2006). *Anatomy and Physiology of the Thyroid Gland. Clinical Correlates to Thyroid Cancer.* In: Wartofsky L., Van Nostrand D., Hrsg. *Thyroid Cancer. A Comprehensive Guide to Clinical Management* (2. Auflage). Humana Press Inc., 3-7.

Wenig B. M. (2016). *Atlas of Head and Neck Pathology* (3. Auflage). Elsevier, 1193-1201.