

# **Funktionelle Charakterisierung des *TRPM5*-Gens**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

**Lili Brixel**

geboren am 16.02.1976 in Düsseldorf

**Mainz, 2009**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Mündliche Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die TRP (<i>transient receptor potential</i>)-Familie .....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Geschichte der TRPs .....	2
1.1.1.1	Der TRP-Kanal von <i>Drosophila melanogaster</i> als Gründer der TRP-Familie.....	2
1.1.1.2	TRP-Kanäle als Kandidaten für SOCE ( <i>store-operated calcium entry</i> ).....	4
1.1.2	Struktur der TRP-Proteine und Aufbau von TRP-Signalkomplexen.....	6
1.1.2.1	Charakteristische Proteindomänen .....	6
1.1.2.2	Assoziation der TRP-Proteine zu Ionenkanälen .....	7
1.1.2.3	Integration der TRP-Kanäle in Signalkomplexe.....	8
1.1.2.4	Spannungsabhängigkeit der TRP-Kanäle .....	9
1.1.3	Funktion der TRP-Kanäle.....	9
1.1.3.1	TRPs in der Sinneswahrnehmung.....	9
1.1.3.2	Aktivierung und Regulation der TRP-Kanäle.....	9
1.1.4	TRP-Subfamilien.....	11
1.1.4.1	TRPC – Klassische oder kanonische TRPs (TRPC1-7) .....	11
1.1.4.2	TRPV – Vanilloidrezeptor-verwandte TRPs (TRPV1-6).....	12
1.1.4.3	TRPA – ANKTM1-ähnliche TRPs (TRPA1).....	13
1.1.4.4	TRPML – Mucolipin-verwandte TRPs (TRPML1-3) .....	13
1.1.4.5	TRPN – NOMPC-ähnliche TRPs (TRPN1) .....	14
1.1.4.6	TRPP – Polyzystin-ähnliche TRPs (TRPP1-5).....	14
1.1.4.7	TRPM – Melastatin-verwandte TRPs (TRPM1-8).....	15
<b>1.2</b>	<b>TRPM5.....</b>	<b>17</b>
1.2.1	Die Chromosomenregion 11p15.5 und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom.....	17
1.2.2	Das <i>TRPM5</i> -Gen .....	17
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Material und Reagenzien .....</b>	<b>20</b>
2.1.1	Antikörper .....	20
2.1.2	Bakterienstämme .....	20
2.1.3	Chemikalien und Fertiglösungen.....	20
2.1.4	Enzyme .....	22
2.1.5	Geräte .....	22
2.1.6	Größenstandards.....	24
2.1.7	Kits .....	24
2.1.8	Oligonukleotide .....	24
2.1.9	Plasmide und Vektoren.....	27
2.1.10	Puffer und Lösungen .....	27
2.1.11	Radioisotope.....	31
2.1.12	Tiere.....	31
2.1.13	Verbrauchsmaterialien.....	31
<b>2.2</b>	<b>Arbeiten mit DNA und RNA.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Standardmethoden .....	32
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	32
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen .....	33

2.2.1.3	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	33
2.2.1.4	Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	33
2.2.1.5	DNaseI-Verdau von RNA-Proben.....	33
2.2.1.6	Isolierung von RNA aus Mausgeweben .....	34
2.2.1.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.1.8	Aufreinigung von DNA-Proben.....	35
2.2.1.9	Fällung von DNA .....	35
2.2.1.10	Agarosegelelektrophorese.....	35
2.2.1.11	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	36
2.2.1.12	Sequenzierung von DNA .....	36
2.2.2	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	37
2.2.2.1	<i>Annealing</i> von Oligonukleotiden .....	37
2.2.2.2	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
2.2.2.3	Dephosphorylierung von Vektorenden.....	37
2.2.2.4	Ligation.....	37
2.2.2.5	Herstellung chemokompetenter Bakterien.....	37
2.2.2.6	Herstellung elektrokompetenter Bakterien .....	38
2.2.2.7	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock .....	38
2.2.2.8	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation .....	38
2.2.2.9	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen.....	39
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i> ).....	39
2.2.4	Reverse Transkription (RT).....	40
2.2.5	Hybridisierungstechniken auf Filtermembranen .....	40
2.2.5.1	Radioaktive Markierung von Sonden .....	40
2.2.5.2	Radioaktive Markierung von siRNA-spezifischen Sonden .....	41
2.2.5.3	DNA-DNA-Hybridisierung ( <i>Southern</i> -Hybridisierung).....	41
2.2.5.4	DNA-RNA-Hybridisierung ( <i>Northern</i> -Hybridisierung).....	42
2.2.5.5	DNA-RNA-Hybridisierung zur siRNA-Detektion .....	43
<b>2.3</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen.....</b>	<b>44</b>
2.3.1	Isolierung von Proteinen aus Zellkulturen.....	44
2.3.2	Isolierung von Proteinen aus Mausgeweben .....	44
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	45
2.3.4	Fällung von Proteinen.....	45
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	45
2.3.6	<i>Western Blot</i> .....	46
2.3.7	ELISA.....	47
2.3.8	Coimmunpräzipitation.....	47
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>48</b>
2.4.1	Verwendete Zelllinien .....	48
2.4.2	Kultivierung von Zellen .....	49
2.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	49
2.4.4	Transiente Transfektion von Zellen.....	49
2.4.5	Stabile Transfektion von Zellen .....	50
2.4.6	Transfektion von Zellen mit siRNA.....	50
2.4.7	Fixierung von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	51
2.4.8	Fixierung und Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse.....	51
2.4.9	Zellproliferationsassay .....	52
2.4.10	Insulinsekretionstest mit pankreatischen Betazellen .....	52
<b>2.5</b>	<b>Histologische Methoden .....</b>	<b>53</b>

2.5.1	Herstellung von Gefrierschnitten .....	53
2.5.2	Herstellung von Paraffinschnitten .....	53
2.5.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten.....	53
2.5.4	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten .....	54
<b>2.6</b>	<b>Arbeiten mit Mäusen .....</b>	<b>54</b>
2.6.1	Geschmackstest ( <i>Two-bottle preference</i> -Assay) .....	54
2.6.2	Glukosetoleranztest .....	55
2.6.3	Insulintoleranztest.....	55
2.6.4	Präparation von Langerhans' sehen Inseln.....	55
2.6.5	Insulinsekretionstest mit isolierten Langerhans' sehen Inseln .....	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>TRPM5-Expressionsanalysen.....</b>	<b>57</b>
3.1.1	TRPM5-Expression in verschiedenen Zelllinien .....	57
3.1.2	Trpm5-Expression in verschiedenen Mausgeweben .....	58
<b>3.2</b>	<b>TRPM5-überexprimierende HEK 293-Zelllinie .....</b>	<b>59</b>
3.2.1	Generierung einer TRPM5-überexprimierenden Zelllinie.....	59
3.2.2	Charakterisierung der TRPM5-überexprimierenden Zelllinie M1 .....	60
3.2.2.1	Zellzyklusanalyse .....	60
3.2.2.2	Zellproliferationsanalyse .....	61
3.2.2.3	In vivo-Untersuchung der tumorigenen Eigenschaften.....	62
<b>3.3</b>	<b>Generierung und Testen TRPM5-spezifischer Antikörper .....</b>	<b>63</b>
3.3.1	Western Blots mit TRPM5-spezifischen Antikörpern .....	65
3.3.2	Immunhistochemische Analysen mit TRPM5-spezifischen Antikörpern .....	68
<b>3.4</b>	<b>Zelluläre Lokalisation der humanen TRPM5-Spleißvarianten.....</b>	<b>72</b>
3.4.1	Herstellung TRPM5/EGFP-überexprimierender Zelllinien .....	72
3.4.2	Zelluläre Lokalisation von TRPM5-long und TRPM5-short .....	73
<b>3.5</b>	<b>Elektrophysiologische Charakterisierung des TRPM5-Kanals.....</b>	<b>74</b>
3.5.1	Aktivierung der TRPM5-Kanäle .....	75
3.5.2	Selektivität und Permeabilität der TRPM5-Kanäle .....	77
3.5.3	Aktivierung von TRPM5 in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs.....	79
3.5.4	Eigenschaften der TRPM5-Einzelkanäle.....	81
<b>3.6</b>	<b>Funktion der kurzen Spleißvariante TRPM5-short .....</b>	<b>82</b>
3.6.1	Coexpression von TRPM5-long und TRPM5-short.....	83
3.6.2	Zelluläre Lokalisation von TRPM5-long bei Coexpression mit TRPM5-short .....	84
3.6.3	Elektrophysiologische Charakterisierung des heteromeren TRPM5-Kanals .....	85
<b>3.7</b>	<b>Interaktionsanalyse von TRPM5 und TRPM4 .....</b>	<b>86</b>
3.7.1	Coexpression von TRPM5 und TRPM4 in HEK 293-Zellen.....	86
3.7.2	Coimmunpräzipitation von TRPM5 und TRPM4 .....	86
<b>3.8</b>	<b>Knock down von TRPM5 durch RNAi.....</b>	<b>87</b>
3.8.1	Der RNAi-Mechanismus .....	87
3.8.2	Knock down des humanen und murinen TRPM5-Gens in Zellkultur.....	89
3.8.2.1	Auswahl der TRPM5-spezifischen siRNA-Sequenzen .....	89
3.8.2.2	RNAi-Konstrukte.....	91
3.8.2.3	Knock down von TRPM5 mit siRNA-Molekülen und dem RNAi-Plasmid pTER ..	94
3.8.2.4	Knock down-Effizienz der pTER-Konstrukte.....	95

3.8.3	Generierung und Charakterisierung transgener <i>Trpm5-knock down</i> -Mauslinien.....	99
3.8.3.1	Generierung transgener <i>Trpm5-knock down</i> -Mauslinien.....	99
3.8.3.2	Identifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere.....	100
3.8.3.3	<i>Knock down</i> -Effizienz in verschiedenen pTER-Mauslinien.....	101
3.8.3.4	Quantifizierung der transgenen DNA in verschiedenen pTER-Mauslinien .....	103
3.8.3.5	Phänotypische Charakterisierung der <i>Trpm5-knock down</i> -Mäuse.....	104
<b>3.9</b>	<b>Funktion von TRPM5 in pankreatischen Betazellen.....</b>	<b>107</b>
3.9.1	Endogene <i>Trpm5</i> -Ströme in pankreatischen INS-1-Zellen .....	108
3.9.2	TRPM5-short-überexprimierende INS-1-Zellen .....	109
3.9.2.1	Insulinsekretion in TRPM5-short-überexprimierenden INS-1-Zellen.....	109
3.9.3	Insulinsekretion in der <i>Trpm5-knock out</i> -Maus.....	110
3.9.3.1	Insulinsekretion in Langerhans'schen Inseln der <i>Trpm5-knock out</i> -Maus .....	112
3.9.3.2	Immortalisierung von pankreatischen Betazellen.....	115
3.9.3.3	Glukosetoleranztest.....	117
3.9.3.4	Insulintoleranztest.....	120
3.9.3.5	Bestimmung des Langzeitblutzuckerwertes .....	122
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>124</b>
4.1	Expression von <i>TRPM5</i> .....	124
4.2	Etablierung TRPM5-spezifischer Antikörper.....	125
4.3	Charakterisierung der <i>TRPM5</i> -überexprimierenden HEK 293-Zelllinie .....	127
4.3.1	Auswirkung der <i>TRPM5</i> -Überexpression auf die Zellproliferation .....	127
4.3.2	Elektrophysiologische Eigenschaften des TRPM5-Kanals .....	128
4.4	Zelluläre Lokalisation der TRPM5-Spleißvarianten und Funktion von TRPM5-short.....	130
4.5	Interaktion von TRPM5 und TRPM4.....	132
4.6	<i>Trpm5-knock down</i> -Mäuse .....	133
4.6.1	Generierung der transgenen <i>Trpm5-knock down</i> -Mauslinien.....	136
4.6.2	Initiale Charakterisierung der <i>Trpm5-knock down</i> -Mauslinien.....	137
4.6.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>Trpm5-knock down</i> -Mäuse .....	139
4.6.3.1	Funktion von TRPM5 bei der Geschmacksperzeption .....	139
4.6.3.2	Geschmackstests mit <i>Trpm5-knock down</i> - und <i>Trpm5-knock out</i> -Mäusen .....	141
4.7	Funktion von TRPM5 in pankreatischen Betazellen.....	143
4.7.1	Insulinsekretion in TRPM5-short-exprimierenden INS-1-Zellen .....	143
4.7.2	Blutglukose- und Insulinhaushalt der <i>Trpm5-knock out</i> -Maus .....	145
4.7.3	Regulation der glukoseinduzierten Insulinsekretion .....	147
4.7.4	TRP-Kanäle in der Insulinsekretion .....	149
4.7.4.1	Modell für die Funktion des TRPM5-Kanals in der pankreatischen Betazelle .....	150
4.7.4.2	Mögliche Folgen einer TRPM5-Fehlregulation in der pankreatischen Betazelle..	151
4.8	Ausblick .....	159
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>162</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>187</b>
7.1	Lebenslauf .....	187
7.2	Publikationen und Kongressbeiträge.....	187
7.3	Danksagung.....	189

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Mechanismus des speicherabhängigen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms SOCE ( <i>store-operated calcium entry</i> ).....	5
Abbildung 1.2: Schematische Struktur der TRP-Proteine.....	7
Abbildung 1.3: Aufbau eines TRP-Ionenkanals aus vier Untereinheiten. ....	8
Abbildung 3.1: Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der <i>Trpm5</i> -Expression in verschiedenen Mausgeweben. ....	59
Abbildung 3.2: Nachweis der <i>TRPM5</i> -Überexpression in HEK 293-Klonen mittels RT-PCR und <i>Northern Blot</i> . ....	60
Abbildung 3.3: Zellzyklusanalyse der <i>TRPM5</i> -überexprimierenden Zelllinie M1.....	61
Abbildung 3.4: Zellproliferationsanalyse der <i>TRPM5</i> -überexprimierenden Zelllinie M1.....	62
Abbildung 3.5: Die humane und murine <i>TRPM5</i> -Aminosäuresequenz mit den Zielsequenzen der verwendeten <i>TRPM5</i> -spezifischen Antikörper. ....	64
Abbildung 3.6: <i>Western Blot</i> mit <i>TRPM5</i> -1909 zur Detektion des <i>Trpm5</i> -Proteins in MIN6-Zellen..	65
Abbildung 3.7: <i>Western Blot</i> mit <i>TRPM5</i> -1909 zur Detektion von <i>Trpm5</i> in murinen Geweben. ....	66
Abbildung 3.8: <i>Western Blot</i> und RT-PCR zum Nachweis von <i>Trpm5</i> in pHGCX- <i>Trpm5</i> -transfizierten Zellen. ....	67
Abbildung 3.9: <i>Western Blot</i> zum Testen verschiedener Antikörper gegen humanes <i>TRPM5</i> . ....	68
Abbildung 3.10: HE-gefärbte Paraffinschnitte des murinen Pankreas.....	69
Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten des murinen Pankreas zum Testen <i>Trpm5</i> -spezifischer Antikörper. ....	70
Abbildung 3.12: Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten des murinen Pankreas zum Testen <i>Trpm5</i> -spezifischer Antikörper. ....	71
Abbildung 3.13: Klonierung der <i>TRPM5</i> /EGFP-Fusionskonstrukte. ....	73
Abbildung 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der <i>TRPM5</i> /EGFP-exprimierenden HEK 293-Zellen.....	74
Abbildung 3.15: <i>Patch-clamp</i> -Ganzzellableitungen zum Testen der Ca <sup>2+</sup> -Aktivierbarkeit von <i>TRPM5</i> .....	77
Abbildung 3.16: <i>Patch-clamp</i> -Ganzzellableitungen zur Untersuchung der Permeabilität von <i>TRPM5</i> .....	78
Abbildung 3.17: <i>Patch-clamp</i> -Ganzzellableitungen zur Untersuchung der <i>TRPM5</i> -Aktivierungskinetik.....	80
Abbildung 3.18: Ableitung von <i>TRPM5</i> -Einzelkanalströmen in der <i>Inside-out</i> -Konfiguration.....	82
Abbildung 3.19: RT-PCR zum Nachweis der Coexpression von <i>TRPM5</i> -long/EGFP und <i>TRPM5</i> -short in HEK 293-Klonen. ....	84
Abbildung 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der <i>TRPM5</i> -long/EGFP- und <i>TRPM5</i> -short-coexprimierenden Zellen. ....	84
Abbildung 3.21: <i>Patch-clamp</i> -Ganzzellableitungen zur Untersuchung der <i>TRPM5</i> -Aktivität bei Coexpression von <i>TRPM5</i> -long und <i>TRPM5</i> -short.....	85
Abbildung 3.22: <i>Western Blot</i> zur Untersuchung der Interaktion von <i>TRPM5</i> und <i>TRPM4</i> . ....	87
Abbildung 3.23: Herunterregulation der Genexpression mittels RNAi in Säugetierzellen. ....	89

Abbildung 3.24: <i>TRPM5</i> -spezifische siRNAs und ihre Zielsequenzen in der humanen und murinen cDNA. ....	91
Abbildung 3.25: Tetrazyklin-regulierbare shRNA-Expression mit dem pTER-Plasmid. ....	93
Abbildung 3.26: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von <i>TRPM5</i> mit siRNA. ....	94
Abbildung 3.27: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von <i>TRPM5</i> mit dem pTER-Konstrukt. ....	95
Abbildung 3.28: Generierung des pcDNA3-Trpm5/FLAG-Konstruktes. ....	96
Abbildung 3.29: Semiquantitative RT-PCR und <i>Western Blot</i> zum Nachweis der Herunterregulation von Trpm5/FLAG mit pTER-Konstrukten. ....	97
Abbildung 3.30: RT-PCR und <i>Northern Blot</i> zum Nachweis der <i>Trpm5</i> -Herunterregulation und siRNA-Expression durch pTER-Konstrukte. ....	98
Abbildung 3.31: PCR-Oligonukleotide und <i>Southern Blot</i> -Sonde zur Genotypisierung der transgenen <i>Trpm5-knock-down</i> -Mäuse. ....	99
Abbildung 3.32: PCR zur Identifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere. ....	100
Abbildung 3.33: <i>Southern Blot</i> zur Verifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere. ....	100
Abbildung 3.34: RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von <i>Trpm5</i> in <i>Trpm5-knock-down</i> -Mäusen. ....	102
Abbildung 3.35: PCR zur Ermittlung der Transgenkopienanzahl in den pTER-Linien 3620, 3621 und 3623. ....	103
Abbildung 3.36: <i>Two-bottle test</i> mit <i>Trpm5-knock out</i> -Mäusen. ....	105
Abbildung 3.37: <i>Two-bottle test</i> mit <i>Trpm5-knock down</i> -Mäusen. ....	106
Abbildung 3.38: RT-PCR zum Nachweis der <i>TRPM5</i> -Expression in humanen Langerhans'schen Inseln. ....	108
Abbildung 3.39: <i>Patch-clamp</i> -Ganzzellaufnahmen zum Nachweis der <i>Trpm5</i> -Funktion in INS-1-Zellen. ....	109
Abbildung 3.40: Insulinsekretion in <i>TRPM5</i> -short-überexprimierenden INS-1-Zellen. ....	110
Abbildung 3.41: Genotypisierung der <i>Trpm5-knock out</i> -Mäuse mittels PCR. ....	112
Abbildung 3.42: Kultivierung der isolierten Langerhans'schen Inseln in Transwell-Gefäßen. ....	114
Abbildung 3.43: Insulinsekretion in isolierten Langerhans'schen Inseln der <i>Trpm5-knock out</i> -Maus. ....	115
Abbildung 3.44: Insulinsekretion in der murinen Betazelllinie C69. ....	117
Abbildung 3.45: Glukosetoleranztest mit homozygoten und heterozygoten <i>Trpm5-knock out</i> -Mäusen. ....	119
Abbildung 3.46: Glukosetoleranz der jungen und alten <i>Trpm5-knock out</i> -Mäuse im Vergleich. ....	120
Abbildung 3.47: Insulintoleranztest mit homozygoten und heterozygoten <i>Trpm5-knock out</i> -Mäusen. ....	122
Abbildung 4.1: Generierung von <i>Knock down</i> - und <i>Knock out</i> -Mäusen. ....	135
Abbildung 4.2: Die zwei Phasen der glukoseinduzierten Insulinsekretion. ....	145
Abbildung 4.3: Kontrolle der glukoseinduzierten Insulinsekretion in der pankreatischen Betazelle. ....	148
Tabelle 3.1: <i>TRPM5</i> - und <i>TRPM4</i> -Expression in verschiedenen Zelllinien. ....	58
Tabelle 3.2: Fructosaminwerte der <i>Trpm5-knock out</i> -Mäuse. ....	123



## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Coulomb
Ca	Kalzium
ca.	zirka
CCE	<i>Capacitative calcium entry</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
g	Gramm; bei Zentrifugation Erdschwerebeschleunigung
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i> )
h	Stunde
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Trisphosphat
kb	Kilobasenpaar
KD	<i>Knock down</i>
KO	<i>Knock out</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
m	Meter
Mg	Magnesium
min	Minute
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C

RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
s	Sekunde
SERCA	<i>Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOC	<i>Store-operated Ca<sup>2+</sup>-channel</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
Temp.	Temperatur
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
U	Einheiten (engl. <i>units</i> )
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

#### **Abkürzungen für Aminosäuren**

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

#### **Abkürzungen für Nukleotidbasen**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## 1 EINLEITUNG

Die Fähigkeit, Reize wahrzunehmen und weiterzuleiten, ist für die Kommunikation einer Zelle mit ihrer Umwelt essentiell und für das Bestehen der Zelle in einem Zellverband unerlässlich. Als Abgrenzung gegen ihre äußere Umgebung besitzt die Zelle eine aus vorwiegend Phospholipiden und Glykolipiden bestehende Zellmembran, welche eine für wasserlösliche Substanzen weitgehend undurchlässige Lipiddoppelschicht bildet. Diese Barriere ermöglicht der Zelle zwar einerseits ein intrazelluläres Milieu aufrechtzuerhalten, das sich von dem extrazellulären Milieu unterscheidet, andererseits erfordert sie Mechanismen, die eine Kommunikation mit der Außenwelt ermöglichen. Zu diesem Zweck befinden sich in der Zellmembran integrale Membranproteine, die für einen kontrollierten Austausch von Information und Molekülen sorgen. Zu den Membranproteinen gehören zum einen Rezeptoren, welche spezifische Signale aufnehmen und in die Zelle übermitteln. Zum anderen ist die Zellmembran mit Proteinen wie Membrantransportern und Ionenkanälen besetzt, die Molekülen und Ionen Durchtritt durch die Membran gewähren.

Ionen besitzen eine elektrische Ladung, die ihnen eine hydrophile Eigenschaft verleiht; diese verhindert eine einfache Diffusion durch die hydrophobe Zellmembran. Die unterschiedliche Verteilung der Ionen zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellulärraum führt zu einer fortwährenden Anstrengung der Ionen diesen Unterschied auszugleichen. Dadurch entsteht an der Zellmembran ein elektrochemischer Gradient, der den Unterschied in der Ionenkonzentration und in der elektrischen Ladung beschreibt. Die ungleiche elektrische Ladung wird als Membranspannung oder Membranpotential bezeichnet. Das Zellinnere, das Zytosol, ist im Vergleich zum Extrazellulärraum negativ geladen, so dass das Membranpotential einer ruhenden Nerven- oder Muskelzelle  $-70$  bis  $-90$  mV beträgt. Für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten sind Transportproteine in der Zellmembran verantwortlich; diese sind in der Lage, einen aktiven Ionentransport entgegen dem elektrochemischen Gradienten zu leisten, verbrauchen jedoch für diese Aufgabe zelluläre Energie. Ionenkanäle funktionieren wiederum, indem sie den elektrochemischen Gradienten nutzen, um Ionen entlang ihres Gefälles zu leiten. Die Kanäle werden lediglich durch spezifische Reize stimuliert und öffnen oder schließen daraufhin ihre ionenleitende Pore. Zu solchen Reizen, die Ionenkanäle wahrnehmen können, gehören neben Signalmolekülen auch Veränderungen des Membranpotentials, der Temperatur oder des pH-Wertes, sowie die mechanische Stimulation der Zellmembran.

Ionenkanäle werden seit ihrer Entdeckung in den 40er Jahren mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Ist die Funktion eines Ionenkanals gestört, so ist die Kommunikation der Zelle mit ihrer Umwelt ebenfalls beeinträchtigt – Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck, Epilepsie, Diabetes und multiple Sklerose können Folgen solcher Funktionsstörungen sein. Ionenkanäle bieten sich vor allem aufgrund ihrer meist leichten extrazellulären Zugänglichkeit sowie der Möglichkeit, ihre Funktion auf Molekülebene und in Echtzeit zu erforschen, als geeignete Therapieziele an (Pardo und Stühmer, 2008). Ein relativ neues Forschungsgebiet unter den Ionenkanälen, und somit ein attraktives Ziel für neue therapeutische Ansätze, stellen die TRP-Kanäle dar (Okuhara *et al.*, 2007), die sowohl in elektrisch erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen an der Wahrnehmung und Weiterleitung von Sinnesreizen beteiligt sind.

## **1.1 Die TRP (*transient receptor potential*)-Familie**

### **1.1.1 Geschichte der TRPs**

#### **1.1.1.1 Der TRP-Kanal von *Drosophila melanogaster* als Gründer der TRP-Familie**

Die TRP-Ionenkanäle wurden ursprünglich bei der Photorezeption der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Der Name „TRP“ der Familie leitet sich von einer spontan auftretenden *Drosophila*-Mutante ab, die auf kontinuierliche Lichtstimulation mit einem transienten Rezeptorpotential reagiert. Bereits 1969 fiel in Verhaltenstests auf, dass sich die TRP-Mutante bei schwacher Beleuchtung phototaktisch normal verhält, aber erblindet, wenn sie längere Zeiten hellem Licht ausgesetzt wird (Cosens und Manning, 1969). An den Photorezeptorzellen der mutanten Fliege wurden nach der Lichtstimulation statt der üblichen, lang anhaltenden Membranpotentialänderungen (Rezeptorpotentiale), die zur Depolarisierung der Zellmembran führen, lediglich transiente Antworten gemessen.

Den ersten Hinweis darauf, dass der TRP-Kanal im Kalzium-Signalling der Zelle eine Rolle spielt, brachten Untersuchungen an Pigmentkörperchen, die sich in den Photorezeptorzellen befinden. Diese Pigmentgranulae vollziehen nach einer Lichtstimulation typische Migrationsbewegungen – ein Vorgang, dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit bereits bekannt war. In der TRP-Mutante war die Verlagerung der Pigmentgranulae nur von transientser Natur (Lo und Pak, 1981). Die Klonierung und molekulare Charakterisierung des *TRP*-Gens durch Craig Montell und Gerald Rubin ermöglichte schließlich erste strukturelle Voraussagen über das Protein. Es wurden zwar keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen in Proteindatenbanken gefunden, aber die Aminosäuresequenz von TRP deutete auf ein integrales Membranprotein mit mindestens sechs membrandurchspannenden Bereichen hin.

TRP zeigte somit gewisse Ähnlichkeiten zu Kationenkanälen, die über die Membranspannung oder durch *Second messenger* aktiviert werden (Montell und Rubin, 1989).

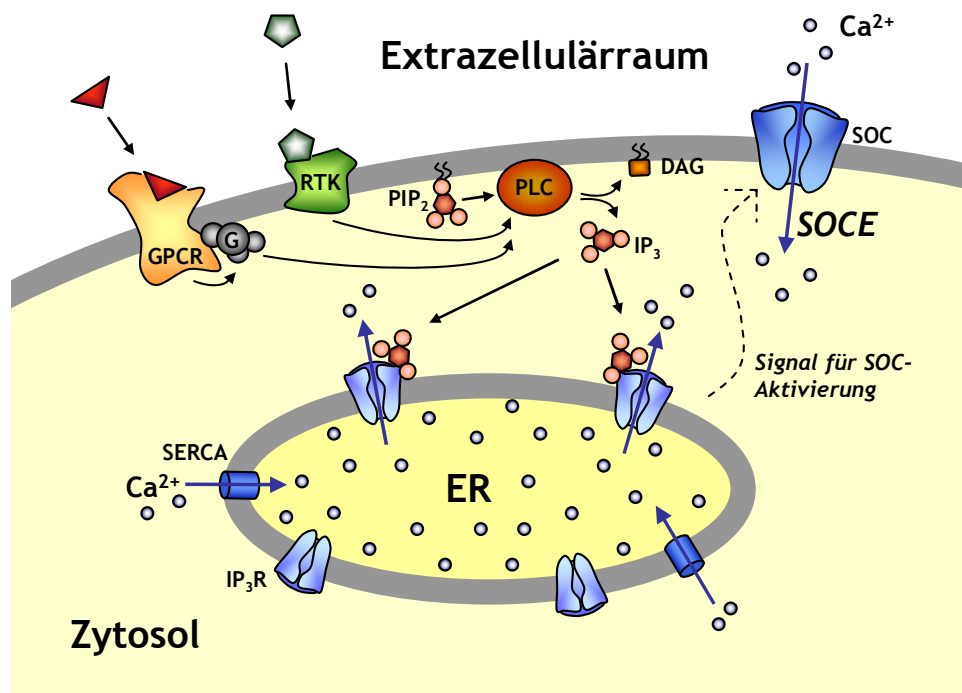
Die Funktion des TRP-Proteins konnte erst nach der Entwicklung und Etablierung der *Patch-clamp*-Technik gezielt untersucht werden. Diese Methode ermöglicht es mit Hilfe einer *Patch*-Pipette eine vorgegebene Spannung an eine sehr kleine Membranfläche (engl. *patch*) anzulegen (sogenannte Spannungsklemme, engl. *voltage clamp*) und den Strom zu messen, der dabei durch die Membran fließt. Da die zu untersuchende Membranfläche einen Durchmesser von lediglich einen bis wenigen Mikrometern besitzt, kann der Strom eines einzigen Kanals bestimmt werden, der im Verlauf von weniger als einer Millisekunde gemessen wird und lediglich wenige Pikoampere beträgt. Erwin Neher und Bert Sakmann, die bereits in den 70er Jahren an der Entwicklung der *Patch-clamp*-Technik arbeiteten, erhielten 1991 für ihre Arbeit den Nobelpreis für Medizin. Mit Hilfe der *Patch-clamp*-Technik konnte in isolierten Photorezeptorzellen von *Drosophila* gezeigt werden, dass der lichtinduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei der TRP-Mutante um ein Zehnfaches geringer ist als bei der Wildtypfliege (Hardie und Minke, 1992), und in heterologen Expressionssystemen konnte die Funktion des TRP-Proteins als  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal bestätigt werden (Vaca *et al.*, 1994). Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom Grundvoraussetzung für die Lichtadaptation der Photorezeptorzellen ist, konnte die Erblindung der TRP-Mutante letztendlich durch die fehlende Adaptation an lang andauernde Lichtsignale erklärt werden. In *Drosophila* wurden später noch zwei weitere TRP-ähnliche Proteine, TRPL (TRP-like, Phillips *et al.*, 1992) und TRP $\gamma$  (Xu *et al.*, 2000) identifiziert, die ebenfalls für die visuelle Wahrnehmung wichtig sind.

Nicht nur in *Drosophila*, sondern auch in anderen Organismen wurden seit der Erstbeschreibung von TRP Proteine mit ähnlicher Struktur gefunden. Von der einzelligen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* über den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen sind bisher zahlreiche verwandte Proteine identifiziert und charakterisiert worden, die als TRP-Familie zusammengefasst werden (Clapham *et al.*, 2005). Für *Drosophila* sind insgesamt 13, für Säugetiere bereits 28 verschiedene Mitglieder der Familie beschrieben worden (Montell, 2005). Heute geht man davon aus, dass sowohl Wirbeltiere als auch Wirbellose in nahezu jeder Zelle ein spezifisches Muster an verschiedenen TRP-Proteinen besitzen (Owsianik *et al.*, 2006a).

### 1.1.1.2 TRP-Kanäle als Kandidaten für SOCE (*store-operated calcium entry*)

Kalzium ist in zahlreichen zellulären Ereignissen, wie der Regulation von enzymatischen Aktivitäten und metabolischen Prozessen, als intrazellulärer *Messenger* involviert. Speziell bei der Exozytose, Genexpression, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose spielen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine wichtige Rolle. Damit diese Prozesse geordnet ablaufen können, ist die Kontrolle der zeitlichen und räumlichen Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen innerhalb einer Zelle besonders wichtig. Da hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen generell sehr toxisch sind, können schon kleinste Unregelmäßigkeiten in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zum Tod der Zelle führen (Berridge *et al.*, 2000). Im Ruhezustand ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Zelle um ein 20 000-faches niedriger als im Extrazellulärraum.

Die TRP-Kanäle werden in der Literatur oft irreführend als SOCs (*store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels*) bezeichnet. SOCs sind  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle, die nicht durch die Bindung eines Liganden, durch *Second messenger* oder durch die Membranspannung reguliert werden, sondern über die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (engl.  *$\text{Ca}^{2+}$ -stores*) kontrolliert werden. SOCs bewirken einen Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle, nachdem zuvor intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Vorräte in das Zytoplasma entleert wurden (Putney, 1977 und 1990). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt bei diesem Vorgang also in zwei Schritten an; zunächst aufgrund der Speicherentleerung und kurz darauf durch die Aktivierung der SOCs, die einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Bereich bewirken (Abbildung 1.1). Der Mechanismus des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, genannt SOCE (*store-operated calcium entry*) oder auch CCE (*capacitative calcium entry*), dient zum einen der Wiederauffüllung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Vorräten; zum anderen verstärkt und verlängert er das vorausgegangene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Obwohl das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* der Zelle intensiv erforscht wird, ist der genaue SOCE-Mechanismus noch heute unklar (Parekh und Putney, 2005).



**Abbildung 1.1: Mechanismus des speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms SOCE (store-operated calcium entry).**

Die Ca<sup>2+</sup>-Speicher der Zelle befinden sich hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER). Für die Auffüllung dieser Speicher sind ATP-betriebene Ca<sup>2+</sup>-Pumpen (SERCA, *sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) zuständig, die sich in der Membran des ER befinden. Der Reiz erreicht die Zelle in diesem Beispiel in Form von Signalmolekülen, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK) binden und diese aktivieren. Das Signal wird weiter an Phospholipase C (PLC) übermittelt, diese hydrolysiert Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu membrangebundenen Diacylglycerol (DAG) und diffundierbarem Inositol (1,4,5)-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bindet an seine in der ER-Membran liegenden Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R), welche Ca<sup>2+</sup>-Kanäle darstellen und nach IP<sub>3</sub>-Bindung Ca<sup>2+</sup> aus dem ER freisetzen. Die Abnahme der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im ER aktiviert durch einen bisher unbekanntem Mechanismus SOC-Kanäle in der Zellmembran, die einen Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum bewirken (SOCE).

Den bekanntesten Ca<sup>2+</sup>-speicherabhängigen Strom stellt I<sub>CRAC</sub> (*calcium release-activated calcium current*) dar (Prakriya und Lewis, 2003). I<sub>CRAC</sub> wurde 1992 von Markus Hoth und Reinhold Penner in Mastzellen des hämatopoetischen Systems charakterisiert, er kommt jedoch in verschiedenen Zelltypen vor. Er zeichnet sich unter anderem durch eine hohe Ca<sup>2+</sup>-Selektivität, eine Spannungsunabhängigkeit sowie einen niedrigen, einwärts gerichteten Strom aus (Hoth und Penner, 1992). In elektrisch nicht-erregbaren Zellen, denen spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle fehlen, stellt I<sub>CRAC</sub> den wichtigsten Mechanismus des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms dar. Er sorgt für die Wiederauffüllung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher und ist an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt, zum Beispiel an der Generierung von Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen in T-Zellen und an der Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen bei allergischen Reaktionen (Lewis, 2001; Parekh und Penner, 1997). Patienten, denen I<sub>CRAC</sub> in den T-Zellen fehlt, leiden an SCID (*severe combined immunodeficiency*), einer schweren Immundefizienzerkrankung (Feske *et al.*, 2005).

Obwohl die charakteristischen Eigenschaften und physiologischen Funktionen von  $I_{CRAC}$  schon früh detailliert beschrieben wurden, blieb die molekulare Identität des zuständigen Kanals lange Zeit unbekannt. Aus diesem Grunde wurden vielen TRPs im Zuge der initialen Charakterisierung Eigenschaften eines speicherabhängigen Kanals zugeschrieben, und in der anfänglichen Euphorie wurden einige TRPs als SOC oder gar als CRAC bezeichnet. Obwohl einige der TRP-Kanäle durch Faktoren reguliert werden, die der Speicherentleerung entweder vor- oder nachgeschaltet sind, können bisher keinem TRP-Kanal alle Eigenschaften eines speicherabhängigen Kanals zugeschrieben werden (Nilius, 2004). Wenn die TRPs am SOCE-Mechanismus beteiligt sind, dann nur in Verbindung mit anderen Komponenten, die den TRP-Kanälen SOC-spezifische Aktivierungs- und Permeabilitätseigenschaften verleihen (Ramsey *et al.*, 2006).

## **1.1.2 Struktur der TRP-Proteine und Aufbau von TRP-Signalkomplexen**

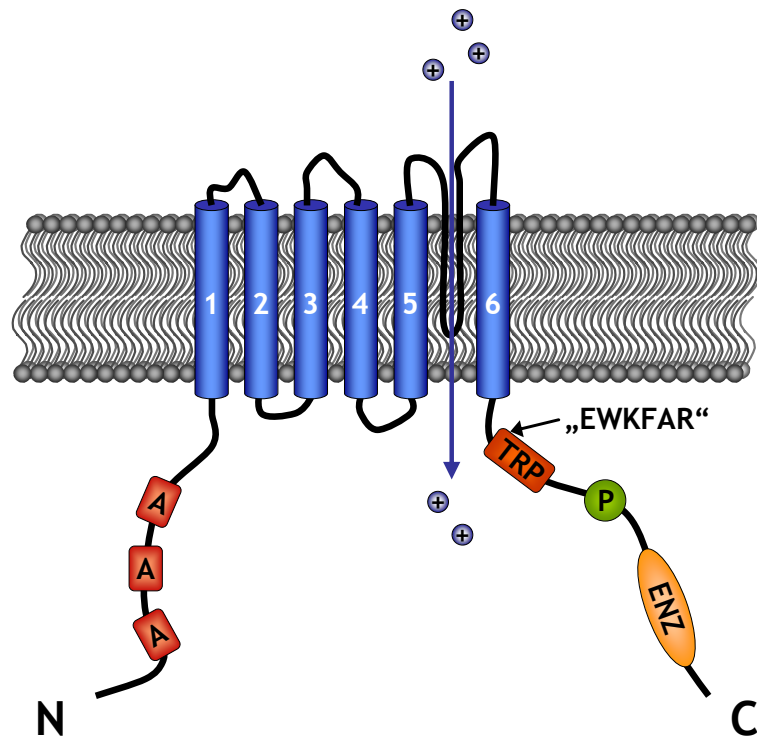
### **1.1.2.1 Charakteristische Proteindomänen**

Die TRP-Proteine sind integrale Membranproteine mit sechs membrandurchspannenden Bereichen, wobei die N- und C-terminalen Enden intrazellulär liegen (Abbildung 1.2). Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne befindet sich eine unter den TRPs hochkonservierte Aminosäuresequenz, die einen Teil der hydrophilen Pore des Ionenkanals bildet (Vannier *et al.*, 1998). Eine Ausnahme zu dieser allgemeinen Struktur stellen einige Mitglieder der TRPP-Subfamilie dar, die statt der üblichen sechs elf Transmembrandomänen besitzen.

Die Bereiche der höchsten Homologie befinden sich neben der Porenregion im Bereich der fünften und sechsten Transmembrandomäne (Ramsey *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist für die TRP-Proteine die sogenannte TRP-Domäne charakteristisch; diese erstreckt sich über 25 Aminosäuren C-terminal zur letzten Transmembrandomäne. Die TRP-Domäne beinhaltet die hochkonservierte „TRP-Box“ mit der Konsensussequenz EWKFAR (Clapham, 2003; Montell, 2005). Welche Funktion die TRP-Domäne besitzt, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, jedoch wurden bei einigen TRPs gerade in diesem Bereich Bindestellen für das Phospholipid  $PIP_2$  identifiziert, die auf eine Regulation dieser Kanäle durch  $PIP_2$  hindeuten (Rohacs *et al.*, 2005). Lediglich den Subfamilien TRPA und TRPP fehlt die TRP-Domäne gänzlich. Die Mitglieder der Subfamilien TRPC, TRPV, TRPA und TRPN besitzen an ihren N-Termini Ankyrin-*Repeats*, die für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind. Für die Subfamilien TRPC und TRPM sind wiederum C-terminal zur TRP-Domäne prolinreiche



Sequenzen charakteristisch, die auch als „TRP-Box 2“ bezeichnet werden (Clapham *et al.*, 2005; Montell, 2005).



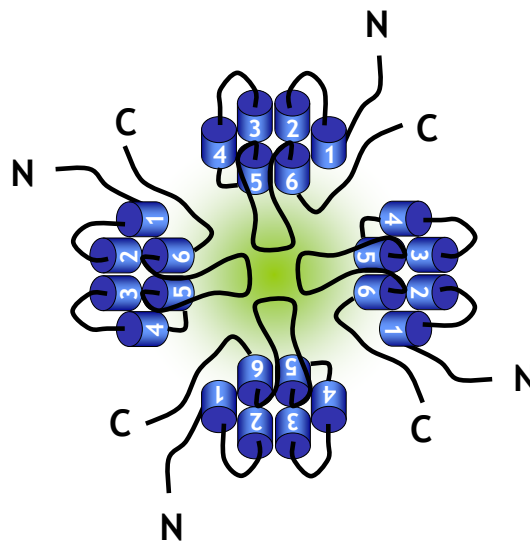
**Abbildung 1.2: Schematische Struktur der TRP-Proteine.**

Die TRP-Proteine besitzen sechs Transmembrandomänen. Der Bereich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne bildet einen Teil der Ionenpore eines TRP-Kanals. Die intrazellulären Proteinenden besitzen verschiedene Domänen, die unter den TRP-Proteinen unterschiedlich stark konserviert sind und teilweise nur für bestimmte TRP-Subfamilien charakteristisch sind. Am N-Terminus können mehrere Ankyrin-Repeats (A) vorhanden sein, die eine Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen. C-terminal liegt die für die TRPs charakteristische TRP-Domäne (TRP), welche die hochkonservierte „TRP-Box“ mit der Konsensussequenz EWKFAR enthält. Der C-Terminus kann darüber hinaus prolinreiche Sequenzen (P) aufweisen oder eine enzymatische Domäne (ENZ) besitzen, welche einzigartig unter den bekannten Ionenkanälen ist.

### 1.1.2.2 Assoziation der TRP-Proteine zu Ionenkanälen

Die Proteinstruktur mit sechs membrandurchspannenden Bereichen kommt häufig bei Proteinen liganden- und spannungsabhängiger Ionenkanäle vor, die sowohl bei Säugetieren als auch bei Bakterien und Pflanzen weit verbreitet sind (Clapham *et al.*, 2005). Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine zeigen zwar keine Homologien zu den TRPs, doch ist die allgemeine Proteinstruktur jener der TRPs sehr ähnlich. Da sich diese Kanäle aus vier Proteinuntereinheiten zusammensetzen, wird auch für die TRP-Kanäle ein Aufbau aus vier Untereinheiten vermutet (Hoenderop *et al.*, 2003b; Yu und Catterall, 2004). Jede TRP-Untereinheit könnte in diesem Falle zur Ionenselektivität der Kanalpore und zu den Aktivierungseigenschaften des TRP-Kanals beitragen, so dass die Funktion des Kanals letztendlich durch die Gesamtheit seiner Untereinheiten bestimmt würde (Abbildung 1.3).

Demzufolge könnte eine Assoziation entweder zu Homo- oder zu Heterotetrameren die Kanaleigenschaften variieren.



**Abbildung 1.3: Aufbau eines TRP-Ionenkanals aus vier Untereinheiten.**

Der TRP-Ionenkanal setzt sich höchstwahrscheinlich aus vier gleichen oder unterschiedlichen TRP-Proteinen zusammen. Die Kanalpore (grün dargestellt) wird aus Proteinbereichen, die zwischen den 5. und 6. Transmembrandomänen liegen, gebildet. Jede TRP-Untereinheit trägt somit zur Ionenselektivität der Pore bei und beeinflusst die Aktivierungseigenschaften des Kanals. Verändert nach [http://www.uni-leipzig.de/~pharma/main/research/schaefer/TRP\\_multimerisation.html](http://www.uni-leipzig.de/~pharma/main/research/schaefer/TRP_multimerisation.html).

### 1.1.2.3 Integration der TRP-Kanäle in Signalkomplexe

In den Photorezeptorzellen von *Drosophila* sind die TRP-Kanäle in Signalkomplexe integriert, welche durch das Gerüstprotein INAD (*inactivation no afterpotential D*) stabilisiert werden (Harteneck, 2003). INAD enthält fünf sogenannte PDZ-Domänen, die mit verschiedenen Komponenten der Phototransduktionskaskade, wie Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C, interagieren. INAD hat neben der Aufgabe, verschiedene Komponenten der Signalkaskade in räumliche Nähe zu bringen, auch regulatorische Eigenschaften.

Während der Aufbau der TRP-Signalkomplexe bei *Drosophila* weitestgehend aufgeklärt ist, konnte bisher lediglich für einige wenige Säugetier-TRPs eine Lokalisation in solchen Proteinkomplexen nachgewiesen werden; so zum Beispiel für TRPC4 und TRPC5, die mit dem PDZ-Protein NHERF assoziieren (Tang *et al.*, 2000). Da die TRP-Kanäle häufig in Signalkaskaden mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen und PLC zusammen vorkommen, ist eine Assoziation dieser Proteine zu einem Signalkomplex und die Lokalisation solcher Komplexe in der Zellmembran über Gerüstproteine wie NHERF oder andere Proteine wie Homer (Yuan *et al.*, 2003) oder PLC- $\gamma$  (Van Rossum *et al.*, 2005) sehr wahrscheinlich.

#### **1.1.2.4 Spannungsabhängigkeit der TRP-Kanäle**

Proteine spannungsabhängiger Kationenkanäle, die ebenso wie die TRP-Proteine sechs Transmembrandomänen enthalten, besitzen als Sensor für Membranpotentialänderungen in ihrer vierten Transmembrandomäne eine Folge von konservierten Argininen. Diese Sequenz ist in den TRP-Proteinen nicht vorhanden; trotzdem kann bei vielen TRP-Kanälen eine gewisse Spannungsabhängigkeit beobachtet werden (Montell, 2005). Die Spannungssensitivität der TRP-Kanäle wird jedoch häufig erst nach einer Phosphorylierung, Ligandenbindung oder Temperaturveränderung in physiologische Spannungsbereiche verschoben. Das bedeutet, dass eine Membranpotentialänderung nicht alleine den TRP-Kanal unter physiologischen Bedingungen aktivieren kann, sondern eine weitere Modulation des Kanals stattfinden muss (Nilius *et al.*, 2005b).

Die für die Spannungsabhängigkeit der TRPs zuständigen Proteindomänen sind bisher nicht bekannt. Für TRPM4 konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Deletion von C-terminalen Proteinbereichen, die für die Ligandenbindung und Phosphorylierung wichtig sind, auch die Spannungssensitivität des Kanals verändert (Nilius *et al.*, 2005a).

### **1.1.3 Funktion der TRP-Kanäle**

#### **1.1.3.1 TRPs in der Sinneswahrnehmung**

Ähnlich wie das „Gründer-TRP“ von *Drosophila* sind auch andere Mitglieder der TRP-Familie für die zelluläre Kommunikation wichtig, indem sie bei der Aufnahme von Sinneseindrücken wie Licht, Druck und Schmerz oder bei der Übermittlung von Umgebungsbedingungen, beispielsweise Temperatur und Osmolarität eine Rolle spielen (Owsianik *et al.*, 2006a). Dabei sind die TRPs entweder selbst für die Aufnahme der verschiedenen physikalischen und chemischen Reize zuständig, oder sie sind an den nachfolgenden zellulären Prozessen beteiligt, die das Signal verstärken und weiterleiten. Die Signalamplifikation kann auf zwei Arten geschehen: Über eine Depolarisation der Zellmembran, welche daraufhin weitere zelluläre Signalkaskaden initiiert, oder – im Falle von  $\text{Ca}^{2+}$ -leitenden Kanälen – über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (Ramsey *et al.*, 2006). Jedes einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion besitzt ein wesentliches Signalpotential, das an  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine in der Zelle weitergegeben werden kann.

#### **1.1.3.2 Aktivierung und Regulation der TRP-Kanäle**

Versuche mit heterologen Expressionssystemen haben gezeigt, dass jeder TRP-Kanal individuelle Aktivierungseigenschaften besitzt. Obwohl die TRP-Kanäle generell auf viele experimentelle Reize reagieren, bestimmt letztendlich der jeweilige zelluläre Kontext, ob ein

Aktivierungsstimulus physiologisch relevant ist oder nicht. Auch der Phosphorylierungsstatus und die Anwesenheit von interagierenden Proteinen und Liganden sind dabei von besonderer Bedeutung (Ramsey *et al.*, 2006). Aufgrund der Fülle von verschiedenen wirksamen Stimuli lässt sich der Unterschied zwischen Kanalaktivator und -modulator nicht immer eindeutig definieren. So können zum Beispiel posttranslationelle Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, einige TRP-Kanäle konstitutiv aktivieren oder inaktivieren, während sie bei anderen Kanälen lediglich die Aktivität modulieren.

Zu den üblichen Aktivatoren bzw. Regulatoren der TRP-Kanäle gehören Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Calmodulin. PIP<sub>2</sub> kommt als membrangebundenes, polares Phospholipidmolekül nahezu ubiquitär vor und funktioniert in Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden oft als Regulator von Transporter- und Kanalproteinen (Hilgemann *et al.*, 2001). Während einige TRP-Kanäle, hauptsächlich Mitglieder der TRPM-Subfamilie, durch PIP<sub>2</sub> stimuliert werden, werden andere durch PIP<sub>2</sub> inhibiert (Rohacs, 2007). Das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Calmodulin (CaM) ist ein zweiter häufiger Regulator von Ionenkanälen (Saimi und Kung, 2002). Mitglieder der TRPC-Familie besitzen mehrere CaM-Bindestellen an ihren N- und C-Enden; diese können mit IP<sub>3</sub>R-Bindestellen überlappen, wodurch eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Konkurrenz von CaM und IP<sub>3</sub>R um diese Bindestellen entsteht (Tang *et al.*, 2001; Zhu, 2005). Zu den spezifischeren Liganden der TRP-Kanäle zählen einige exogene organische Moleküle synthetischer oder natürlicher Herkunft, wie zum Beispiel Capsaicin, Menthol und Icilin (Caterina *et al.*, 1997; McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002).

Während einige TRP-Kanäle hauptsächlich durch chemische Stimuli reguliert werden, werden andere durch physiologische Stimuli, beispielsweise Änderungen in der Temperatur oder Osmolarität, oder durch mechanische Stimuli, wie Druck, Dehnung oder Kopplung an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren aktiviert. Diese Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unerforscht und schließen eine Beteiligung von *Second messengern* nicht aus (Vriens *et al.*, 2004). Auch indirekte Regulationsmechanismen wurden beschrieben; so kann beispielsweise die Anzahl von funktionellen Kanälen in der Zellmembran variieren. Für mehrere Mitglieder der TRP-Familie konnte gezeigt werden, dass sie in Vesikeln gelagert werden und bei Bedarf in die Zellmembran integriert werden (Bezzarides *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Van Buren *et al.*, 2005). Durch diesen Mechanismus wird zum einen die Sensitivität gegenüber aktivierenden Stimuli gesteigert und zum anderen das TRP-vermittelte Signal verstärkt.

### 1.1.4 TRP-Subfamilien

Obwohl die Mitglieder der TRP-Familie eine charakteristische Proteinstruktur und TRP-typische Proteindomänen besitzen (siehe Kapitel 1.1.2.1), findet man dennoch vor allem in den terminalen Bereichen, die in das Zytosol hineinragen, deutliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sich die TRP-Proteine in sieben Subfamilien einteilen. Im folgenden Abschnitt werden die TRP-Subfamilien der Säugetiere vorgestellt und die charakteristischen Merkmale ihrer Mitglieder erläutert. Umfangreiche Übersichtsartikel zu den TRP-Subfamilien bieten Clapham *et al.*, 2005, Nilius und Voets, 2005 sowie Ramsey *et al.*, 2006.

#### 1.1.4.1 TRPC – Klassische oder kanonische TRPs (TRPC1-7)

Die klassischen TRP-Proteine zeigen die größte Sequenzhomologie (30-40 %) zu dem Familiengründer-TRP von *Drosophila melanogaster*. Sie werden anhand ihrer Struktur und Funktion in die drei Gruppen C1/C4/C5, C3/C6/C7 und C2 eingeteilt. Die TRPCs werden generell durch eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade aktiviert, wobei TRPC1 als mechanosensitiver Kanal zusätzlich auf die Dehnung der Zellmembran reagiert (Maroto *et al.*, 2005).

**TRPC1** kann mit **TRPC4**, **TRPC5** sowie anderen TRPCs heteromere Kanäle bilden, die unterschiedliche Spannungsabhängigkeiten und Ionenselektivitäten besitzen. Obwohl es das erste bei Säugetieren identifizierte TRP-Protein ist, sind seine Eigenschaften bisher nicht eindeutig definiert (Wes *et al.*, 1995). Homomere TRPC4-Kanäle sind für die Vasorelaxation und für die mikrovaskuläre Permeabilität in der Lunge zuständig, wie Versuche mit der *Trpc4-knock out*-Maus belegen (Freichel *et al.*, 2001; Tiruppathi *et al.*, 2002). TRPC5 ist an der Regulation der Wachstumskegelmorphologie und an der Gehirnentwicklung beteiligt (Greka *et al.*, 2003).

Auch **TRPC3**, **TRPC6** und **TRPC7** können Homomere und Heteromere bilden. Sie besitzen eine Sequenzhomologie von bis zu 75 % und werden vor allem in der glatten Muskulatur stark exprimiert. Wie für TRPC6 bereits gezeigt werden konnte, besitzt diese Gruppe wahrscheinlich neben vasomotorischen Funktionen in Blutgefäßen regulatorische Aufgaben bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Prozessen, beispielsweise bei der Proliferation und Adhäsion von glatten Muskelzellen in den Atemwegen und in der Lunge (Corteling *et al.*, 2004).

Der **Trpc2**-Kanal kommt bei der Maus unter anderem in Spermien vor; dort ist er als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vermutlich an der Akrosomenreaktion beteiligt (Jungnickel *et al.*, 2001). Im

Vomeronasalorgan der Maus ist *Trpc2* für die Wahrnehmung von Pheromonen zuständig (Liman *et al.*, 1999), aus diesem Grunde können männliche *Trpc2-knock out*-Mäuse nicht zwischen Männchen und Weibchen unterscheiden (Stowers *et al.*, 2002). Beim Menschen ist *TRPC2* ein Pseudogen (Vannier *et al.*, 1999).

#### 1.1.4.2 TRPV – Vanilloidrezeptor-verwandte TRPs (TRPV1-6)

Die sechs Mitglieder der TRPV-Familie werden in die Gruppen V1/V2/V3/V4 und V5/V6 eingeteilt, wobei innerhalb dieser zwei Gruppen diverse Subfamilienmitglieder miteinander interagieren können. Die erste Gruppe beinhaltet thermosensible Kanäle, die durch Hitzeeinwirkung aktiviert werden können. Inwieweit die Temperatur eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung spielt, hängt jedoch von dem jeweiligen Expressionsort ab, denn die Kanäle kommen neben sensorischen Neuronen auch in Geweben vor, die keinen dramatischen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

Der Name TRPV der Subfamilie leitet sich von dem Vanilloidrezeptor 1 (**TRPV1**) ab. TRPV1 ist ein spannungsabhängiger Kanal, der unter anderem durch Capsaicin, dem scharfen Vanilloid der roten Chilischoten, durch Protonen und durch schmerzhafte Hitze (ab 43°C) aktiviert wird (Caterina *et al.*, 1997). Versuche mit isolierten sensorischen Neuronen der *Trpv1-knock out*-Maus zeigen beeinträchtigte Antworten auf all diese Reize, wohingegen ein mechanisch verursachter Schmerzreiz normale Reaktionen hervorruft (Caterina *et al.*, 2000). Verhaltenstests belegen, dass vor allem die Empfindlichkeit gegenüber entzündungsverursachten thermalen Schmerzreizen gänzlich fehlt (Davis *et al.*, 2000). TRPV1 wird folglich mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes in Verbindung gebracht (Geppetti und Trevisani, 2004; Nathan *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass TRPV1 in solch unterschiedlichen Ereignissen wie dem Hörvorgang (Zheng *et al.*, 2003), der Einstellung des Sättigungsgefühls (Ahern, 2003) und der Funktion der Harnblase (Birder *et al.*, 2002) involviert ist.

Auch **TRPV2**, **TRPV3** und **TRPV4** können durch Hitze aktiviert werden (ab 52°C, 33°C bzw. 25°C). Während die *Trpv3-knock out*-Maus eine veränderte Temperaturwahrnehmung aufweist (Moqrich *et al.*, 2005), zeigen Versuche mit der *Trpv4-knock out*-Maus, dass *Trpv4* neben der Temperatur (Todaka *et al.*, 2004) auch auf Druck- (Suzuki *et al.*, 2003) und Osmolaritätsänderungen (Liedtke und Friedman, 2003) reagiert und außerdem bei dem Hörsinn (Tabuchi *et al.*, 2005) eine Rolle spielt. TRPV2 stellt in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen einen Sensor für die Zellmembrandehnung dar (Muraki *et al.*, 2003).

Die zweite Gruppe, die **TRPV5** und **TRPV6** umfasst, besitzt die höchste Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unter den TRP-Kanälen. Diese Kanäle kommen in den Epithelzellen der Niere (TRPV5) und des Dünndarms (TRPV6) vor und sorgen dort für die durch Vitamin D stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Hoenderop *et al.*, 2005). Bei der *Trpv5-knock out*-Maus führt die reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption in der Niere zur Hypercalciurie; darüber hinaus kommen Defekte in der Knochenstruktur vor (Hoenderop *et al.*, 2003a). TRPV6 wird als prognostischer Marker für Prostatakrebs diskutiert (Fixemer *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.3 TRPA – ANKTM1-ähnliche TRPs (TRPA1)

Die TRPA-Familie besteht aus einem einzigen Mitglied, **TRPA1** (früher ANKTM1, *Ankyrin-like with transmembrane domains protein 1*). Ursprünglich wurde dem TRPA1-Kanal die Wahrnehmung von schmerzhaften Kältereizen in sensorischen Neuronen zugeschrieben (Story *et al.*, 2003). Heute ist bekannt, dass der Kanal auch auf kräftige Geschmacksstoffe wie Isothiocyanate reagiert, die in Zwiebeln, Knoblauch, Meerrettich und Senföl vorkommen. Auch das in Zwiebeln und im Knoblauch vorhandene Allicin sowie das Tetrahydrocannabinol (THC) des Hanfes aktivieren den Kanal (Bandell *et al.*, 2004; Jordt *et al.*, 2004; Macpherson *et al.*, 2005). In den Haarsinneszellen des Innenohrs bildet TRPA1 vermutlich einen mechanosensitiven Kanal und ist für die Transduktion von auditiven Signalen wichtig (Corey *et al.*, 2004). Die zahlreichen *Ankyrin-Repeats* am N-Terminus des Proteins sind wahrscheinlich für die Übertragung des Signals an Proteine des Zytoskeletts verantwortlich (Sotomayor *et al.*, 2005).

#### 1.1.4.4 TRPML – Mucolipin-verwandte TRPs (TRPML1-3)

**TRPML1**, **TRPML2** und **TRPML3** sind relativ kleine Proteine, die aus weniger als 600 Aminosäuren bestehen. Sie kommen vermutlich ausschließlich in intrazellulären Vesikeln vor (Bach, 2005). Mutationen im *Mucolipin*-Gen (*TRPML1*) verursachen Mucolipidose Typ IV, eine neurodegenerative lysosomale Speichererkrankung, die unter anderem zu Sehstörungen und psychomotorischer Retardierung führt (Bargal *et al.*, 2000; Bassi *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000). Der TRPML1-Kanal ist in späten Endosomen und Lysosomen für Transport- und Sortierungsvorgänge verantwortlich. Er ist konstitutiv aktiv und wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert und durch niedrige pH-Werte inhibiert (Raychowdhury *et al.*, 2004). Sowohl TRPML1 als auch TRPML2 sind in der Lage, die Lokalisation des TRPML3-Proteins zu verändern, denn während sich TRPML3-Homomere im endoplasmatischen Retikulum befinden, verursacht die Heteromerisierung von TRPML3 mit TRPML1 oder TRPML2 eine Verlagerung der Kanäle in die Lysosomen (Venkatachalam *et al.*, 2006).

Die Funktion des *Trpm3*-Kanals wirkt sich auf den Hör- und Gleichgewichtssinn aus und spielt bei der Regulation der Pigmentierung eine Rolle, denn das Mausmodell *Varitint-waddler*, welches eine *Trpm3*-Mutation besitzt, leidet unter Hörverlust und Gleichgewichtsstörungen und ist durch ein dreifarbiges, fleckiges Fell gekennzeichnet (Di Palma *et al.*, 2002).

#### 1.1.4.5 TRPN – NOMPC-ähnliche TRPs (TRPN1)

Der einzige Vertreter dieser Familie, **TRPN1** (früher NOMPC, *no mechanoreceptor potential C*), kommt bei *Drosophila*, *C. elegans* und beim Zebrafisch vor; ein orthologes *TRPN1*-Gen wurde bei Säugetieren bisher nicht identifiziert. Für das TRPN1-Protein ist ein langer N-Terminus aus ca. 1150 Aminosäuren charakteristisch, der 29 Ankyrin-*Repeats* bildet. Der mechanosensitive Kanal ist für den Hör- und Gleichgewichtssinn wichtig (Sidi *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2000).

#### 1.1.4.6 TRPP – Polyzystin-ähnliche TRPs (TRPP1-5)

Die TRPPs werden in die TRPP1-ähnlichen und die TRPP2-ähnlichen Proteine eingeteilt. **TRPP1** besitzt 11 Transmembrandomänen und einen sehr langen N-Terminus aus ca. 2500 Aminosäuren, der aus der Zelle in den Extrazellulärraum hineinragt. Die TRP-ähnliche Struktur beschränkt sich also lediglich auf die C-terminalen Bereiche des Proteins. TRPP1 kann ohne Interaktionspartner wie **TRPP2** vermutlich keine funktionellen Ionenkanäle bilden; solche TRPP1/TRPP2-Heteromere wurden vor allem in den Zilien verschiedener Zelltypen nachgewiesen. In Nierenepithelzellen bilden sie mechanosensitive Kationenkanäle, die über die Flüssigkeitsbewegung reguliert werden (Nauli *et al.*, 2003) und in Granulosazellen des Ovars spielen sie vermutlich bei der Follikelreifung eine Rolle (Teilmann *et al.*, 2005). TRPP1 und TRPP2 werden auch als Polyzystine oder PKD1 und PKD2 bezeichnet, weil Mutationen in den Genen dieser Kanalproteine zur polyzystischen Nierenerkrankung ADPKD (*autosomal dominant polycystic kidney disease*) führen, welche ein Nierenversagen verursachen kann. Da *TRPP1* und *TRPP2* in zahlreichen Organen exprimiert werden, können durch ADPKD verursachte flüssigkeitsgefüllte Zysten nicht nur in der Niere, sondern auch in der Leber, im Pankreas und in der Milz vorkommen (Wu und Somlo, 2000). Bei *Trpp2-knock out*-Mäusen kommen darüber hinaus Defekte in der Herzscheidewand vor (Wu *et al.*, 1998). Sowohl *Trpp1*- als auch *Trpp2-knock out*-Mäuse sterben noch vor der Geburt.

TRPP2 und seine strukturell verwandten Proteine **TRPP3** und **TRPP5** besitzen einen TRP-typischen Aufbau aus sechs Transmembrandomänen. Für diese Gruppe sind lange extrazelluläre Proteinbereiche zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne



charakteristisch. Für TRPP3 wird eine Funktion bei der Entwicklung der Niere und der Retina angenommen, da die Deletion des murinen Orthologs zu Defekten in diesen Organen führt (Nomura *et al.*, 1998).

Die TRPP1-ähnlichen Proteine (PKDREJ bzw. **TRPP4**, PKD1L1, PKD1L2 und PKD1L3) werden aufgrund der oben erwähnten strukturellen Besonderheiten nicht immer zu den TRPs gezählt (Ramsey *et al.*, 2006).

#### **1.1.4.7 TRPM – Melastatin-verwandte TRPs (TRPM1-8)**

Die acht Mitglieder der TRPM-Familie, zu denen auch das in dieser Arbeit untersuchte TRPM5 gehört, werden aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft in die Paare M1/M3, M2/M8, M6/M7 und M4/M5 eingeteilt (Harteneck, 2005). TRPM2, TRPM6 und TRPM7 besitzen als einzige bekannte Ionenkanäle eine enzymatische Domäne und werden deshalb auch als *Chanzyms* (*channel and enzyme*) bezeichnet.

Namensgebend für die TRPM-Familie ist Melastatin (**TRPM1**), das ursprünglich bei der Suche nach differentiell exprimierten Genen in unterschiedlich stark metastasierenden Melanomen identifiziert wurde (Duncan *et al.*, 1998). TRPM1 stellt vermutlich einen Tumorsuppressor dar, denn die Expressionsstärke ist umgekehrt proportional zur Aggressivität des Melanoms.

Für **TRPM3** wurde unter anderem eine Funktion bei der Kalziumhomöostase in der Niere postuliert (Grimm *et al.*, 2003). TRPM3 besitzt jedoch zahlreiche Spleißformen, die sich erheblich in ihrer Ionenselektivität unterscheiden und demzufolge höchstwahrscheinlich auch unterschiedliche Funktionen ausüben (Oberwinkler *et al.*, 2005).

**TRPM2** besitzt eine Nudix-Hydrolase-Domäne, die ADP-Ribose zu AMP und Ribosephosphat hydrolysieren kann (Perraud *et al.*, 2001). Neben ADP-Ribose wird der Kanal durch Substanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder TNF $\alpha$  aktiviert, die bei oxidativen und nitrosativen Stressreaktionen eine Rolle spielen. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt TRPM2 einen Sensor für den zellulären Redox-Zustand dar (Hara *et al.*, 2002; Wehage *et al.*, 2002; Perraud *et al.*, 2005). Die durch alternatives Spleißen gebildete kurze Isoform TRPM2-S ist in der Lage, den TRPM2-Kanal, der sich aus Proteinen der TRPM2-L-Spleißform zusammensetzt, zu blockieren (Zhang, W. *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Regulationsmechanismus ist auch für TRPM1 bekannt (Xu *et al.*, 2001).

**TRPM8** wurde ursprünglich durch seine Hochregulation im Prostatakarzinom entdeckt (Tsavaler *et al.*, 2001). Vermutlich stellt er in Prostataepithelzellen einen Androgen-

aktivierbaren Kanal dar (Zhang und Barritt, 2004). In sensorischen Neuronen nimmt er Schmerz, Kälte und kühlende Substanzen wie Menthol und Icilin wahr (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Durch diese Reize wird die Spannungssensitivität des Kanals so verschoben, dass er durch Membranspannungen, die im physiologischen Bereich liegen, reguliert werden kann (Voets *et al.*, 2004).

**TRPM6** und **TRPM7** sind an der zellulären Magnesiumhomöostase beteiligt. Der TRPM6-Kanal wird über die intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration reguliert, er leitet neben  $Mg^{2+}$  jedoch auch andere divalente Kationen. In der Niere und im Darm ist er für die  $Mg^{2+}$ -Reabsorption zuständig (Runnels *et al.*, 2001; Voets *et al.*, 2004). TRPM6 kann mit TRPM7 heteromerisieren, in solchen Heteromeren wurde eine TRPM6-Mutation identifiziert, die zu Hypomagnesämie mit sekundärer Hypocalcämie führt (Chubanov *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu TRPM6 wird TRPM7 ubiquitär exprimiert; seine Funktion ist essentiell für die Lebensfähigkeit einer Zelle (Nadler *et al.*, 2001; Monteilh-Zoller *et al.*, 2003). Er ist für die Aufnahme von  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und Spurenmetallen in die Zelle zuständig und wird neben der intrazellulären  $Mg^{2+}$ -Konzentration durch  $Mg^{2+}$ -ATP reguliert. Die Aktivität des Kanals kann über eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade inhibiert werden (Runnels *et al.*, 2002). Im Gehirn spielt TRPM7 eine Rolle bei der Übermittlung des neuronalen Zelltodes, der durch Anoxie verursacht wird (Aarts *et al.*, 2003). Sowohl TRPM6 als auch TRPM7 besitzen an ihren langen C-Termini Proteinkinasedomänen. Die Kinase des TRPM7-Proteins kann TRPM7 selbst und Annexin I phosphorylieren; die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierungsreaktionen ist jedoch unbekannt (Dorovkov und Ryazanov, 2004; Matsushita *et al.*, 2005).

**TRPM4** ist der nächste Verwandte des TRPM5-Proteins, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde (siehe Kapitel 1.2). Die Homologie der Proteine beträgt 41 % auf Aminosäureebene (Vriens *et al.*, 2004). Der TRPM4-Kanal ist spannungsabhängig und nicht-selektiv, und wird durch hohe intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen aktiviert, was zur Depolarisation der Zellmembran führt (Launay *et al.*, 2002; Nilius *et al.*, 2003). Kanäle mit solchen Eigenschaften, sogenannte CANs (*Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective*), kommen in verschiedenen elektrisch erregbaren und nicht-erregbaren Zellen vor. Sie sorgen für die Weiterleitung von  $Ca^{2+}$ -Signalen und regulieren dadurch verschiedene zelluläre Ereignisse, wie Sekretionsvorgänge und neuronale Aktivitäten.

Für den TRPM4-Kanal konnten bisher verschiedene Funktionen nachgewiesen werden. Er ist für die Konstriktion von cerebralen Arterien wichtig (Early *et al.*, 2004) und an der

Regulation der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation in T-Zellen beteiligt, die durch Rezeptoraktivierung induziert wird. Hier fungiert TRPM4 gewissermaßen als CRAC-Gegenspieler, denn die durch TRPM4 induzierte Membrandepolarisation wirkt der Funktion CRAC-Kanals entgegen (Launay *et al.*, 2004; siehe Kapitel 1.1.1.2). TRPM4 ist darüber hinaus an der Interleukin-2-Freisetzung in T-Zellen und an der Insulinsekretion in pankreatischen Betazellen beteiligt (Cheng *et al.*, 2007; Vennekens *et al.*, 2007).

## 1.2 TRPM5

### 1.2.1 Die Chromosomenregion 11p15.5 und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom

Das *TRPM5*-Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach Kandidatengenen für 11p15.5-gekoppelte Erkrankungen entdeckt (Prawitt *et al.*, 2000). Zu diesen Erkrankungen gehört das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), das sich im frühen Kindesalter manifestiert. BWS weist ein sehr komplexes Krankheitsbild auf; zu den grundlegenden Symptomen gehören Bauchwanddefekte, eine vergrößerte Zunge und allgemeiner Überwuchs, weswegen BWS früher auch als EMG (Exomphalus, Makroglossie, Gigantismus)-Syndrom bezeichnet wurde. Zusätzlich zu diesen drei Hauptmerkmalen können verschiedene Nebenmerkmale auftreten, beispielsweise zu niedrige Blutzuckerwerte nach der Geburt (neonatale Hypoglykämie), eine asymmetrische Vergrößerung von Organen (Hemihypertrophie) oder charakteristische Ohrmuschelkerben. Darüber hinaus besitzen BWS-Patienten ein erhöhtes Risiko an embryonalen Tumoren, wie Nieren- oder Lebertumoren, zu erkranken (Enklaar *et al.*, 2006).

An der Entstehung des BWS-Phänotyps sind mehrere Gene der Chromosomenregion 11p15.5 beteiligt. Die meisten nachgewiesenen Veränderungen sind epigenetischer Natur; bisher konnten lediglich in einem einzigen Gen, dem Zellzyklusgen *CDKN1C*, Mutationen gefunden werden, die zum Funktionsverlust des Gens führen und nachweislich zu dem BWS-Phänotyp beitragen (Hatada *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass viele Gene der humanen Chromosomenregion 11p15.5 – und auch der orthologen murinen Chromosomenregion – durch genomische Prägung (engl. *genomic imprinting*) gekennzeichnet sind (Enklaar *et al.*, 2006), erschwert die Charakterisierung der molekularen Pathomechanismen des BWS.

### 1.2.2 Das *TRPM5*-Gen

Das humane *TRPM5*-Gen (früher *MTR1*; *MLSNI*- and *TRP-related gene 1*) enthält 24 Exons und kodiert für ein Protein mit 1165 Aminosäuren. Durch alternatives Spleißen des Exons 18 verschiebt sich der Leserahmen des *TRPM5*-Transkriptes derart, dass die Translation an einem vorzeitigen Stop-Codon in der mRNA abbricht. Dadurch entsteht ein kleineres Protein

mit 872 Aminosäuren, das statt der sechs TRP-charakteristischen Transmembrandomänen lediglich die ersten vier besitzt. Dieser kurzen Spleißvariante, in der vorliegenden Arbeit TRPM5-short genannt, fehlt demzufolge derjenige Proteinbereich, der bei der langen Variante, TRPM5-long, für den Aufbau der Ionenkanalpore verantwortlich ist (siehe Abbildung 1.2). Im Gegensatz zum humanen *TRPM5* enthält das murine Gen keine alternativen Spleißstellen. Bei der Maus liegt *Trpm5* distal auf dem Chromosom 7, in einer dem humanen Chromosomenbereich 11p15.5 orthologen Region. Das murine *Trpm5*, welches biallelisch exprimiert wird, besitzt 25 Exons und kodiert für ein 1158 Aminosäuren langes Protein (Enklaar *et al.*, 2000).

Mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen zufolge besitzt *TRPM5* ein breites Expressionsmuster. Transkripte des Gens wurden sowohl beim Menschen als auch bei der Maus unter anderem in Niere, Leber, Lunge, Herz, Darm, Pankreas, Milz, Gehirn und Gonade gefunden (Enklaar *et al.*, 2000; Fonfria *et al.*, 2006; Kunert-Keil *et al.*, 2006; Prawitt *et al.*, 2000). Von einer weitaus spezifischeren Expression berichten Pérez und Mitarbeiter, die bei der Maus eine starke Expression lediglich in Geschmackssinneszellen, Dünndarm und Magen nachgewiesen konnten, und eine schwächere in Uterus und Hoden (Pérez *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war die funktionelle Charakterisierung von TRPM5. Zu Beginn dieser Arbeit stellte das *TRPM5*-Gen aufgrund seiner Lokalisation in der chromosomalen Region 11p15.5 in erster Linie ein Kandidatengen für tumorassoziierte Erkrankungen dar. Um herauszufinden, ob eine Überexpression des Gens in Zellkultur die Zellproliferation beeinflusst, sollte eine *TRPM5*-überexprimierende Zelllinie generiert werden und das Wachstumsverhalten der Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen beobachtet werden. Ferner sollten mit Hilfe der generierten Zelllinie die spezifischen Eigenschaften des TRPM5-Kanals, insbesondere der Aktivierungsmechanismus und die TRPM5-spezifischen Ströme charakterisiert werden. Die dazu erforderlichen elektrophysiologischen Experimente sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof. R. Penner (Universität Hawaii, USA) erfolgen.

Das TRPM5-Protein kommt in humanen Zellen in zwei verschiedenen Spleißformen, TRPM5-long und TRPM5-short, vor, die durch alternatives Spleißen des Exons 18 entstehen. Wie bereits für andere Mitglieder der TRPM-Subfamilie gezeigt werden konnte, wirken die kurzen Spleißformen häufig inhibierend auf die Aktivität der Kanäle. Dabei blockieren sie die

funktionelle Isoform entweder, indem sie diese direkt binden, oder indem sie die Kanalproteine von der Zellmembran in das Zytosol verlagern (Xu *et al.*, 2001; Zhang, W. *et al.*, 2003). Ob ein solcher Regulationsmechanismus auch für TRPM5 existiert, sollten elektrophysiologische Analysen mit TRPM5-long/TRPM5-short-coexprimierenden Zellen klären.

Obwohl die meisten Mitglieder der TRP-Familie in der äußeren Zellmembran lokalisiert sind, kommen einige zusätzlich – oder ausschließlich – in Vesikeln oder anderen intrazellulären Kompartimenten vor. Um die Lokalisation von TRPM5 in der Zelle zu untersuchen, sollten beide Spleißformen an EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gekoppelt werden, welches eine Detektion der Fusionsproteine anhand der grünen Fluoreszenz ermöglicht.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob TRPM5 mit TRPM4, dem nächst verwandten TRP-Protein, zu heteromeren Ionenkanälen assoziieren kann. Zunächst sollten verschiedene Zelllinien auf die endogene Expression von *TRPM5* und *TRPM4* hin überprüft werden; danach sollten TRPM5 und TRPM4 in einem Zellsystem coexprimiert werden, um die Interaktion mittels Coimmunpräzipitation zu untersuchen.

Mit Hilfe der RNAi-Technologie, die auf einer siRNA-induzierten Herunterregulation der Genexpression basiert, sollte ein geeignetes System etabliert werden, welches funktionelle Analysen des TRPM5-Proteins in humanen und murinen Zelltypen ermöglicht und darüber hinaus für die Herstellung eines *Trpm5*-defizienten Mausmodells genutzt werden kann. Zunächst sollten *TRPM5*-spezifische siRNA-Sequenzen ausgesucht und in Zellkultur getestet werden; geeignete Sequenzen sollten dann zur Generierung von RNAi-Konstrukten verwendet werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Bockamp (Toxikologie, Universität Mainz) sollten schließlich transgene *Trpm5-knock down*-Mauslinien generiert werden. Diese sollten – eine ausreichende *Knock down*-Effizienz vorausgesetzt – zusammen mit der *Trpm5-knock out*-Maus (Zhang, Y. *et al.*, 2003), die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit publiziert wurde, zur Untersuchung der physiologischen Funktion von *Trpm5* verwendet werden. Projektbegleitend sollte die *TRPM5*-Expression in verschiedenen Zelllinien und murinen Geweben untersucht werden, um für die funktionellen Tests geeignete Gewebe und Organe definieren zu können.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material und Reagenzien

#### 2.1.1 Antikörper

Goat anti-guinea pig IgG-R	Santa Cruz (Heidelberg)
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz (Heidelberg)
Goat anti-rabbit IgG-FITC	Santa Cruz (Heidelberg)
Guinea pig anti-insulin, polyclonal	DCS Innovative Diagnostic-Systeme (Hamburg)
Mouse anti-GFP, monoclonal	Santa Cruz (Heidelberg)
Mouse anti-FLAG M2, monoclonal	Sigma (München)
Rabbit anti-V5 epitope tag, polyclonal	Abcam (Cambridgeshire, UK)
Rabbit anti-TRPM5, polyclonal	
TRPM5-1909 (Epitop: PASARDREYLESGLPPS; Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2003)	Genosphere Biotechnologies (Paris)
TRPM5-1975 (Epitop: HPLLEDSPSCPSLYA)	Eurogentec (Herstal, Belgien)
TRPM5-1976 (Epitop: LDGWEQPGAGQPPSDT)	Eurogentec (Herstal, Belgien)
TRPM5-C (Epitop: FRRVLYRPYLQIFGQIPLDE)	Dr. B. Miller (Milton S. Hershey Medical Center, Pennsylvania)
TRPM5-N (Epitop: LVNGDPNTLERISRAVEQAA)	Dr. B. Miller (Milton S. Hershey Medical Center, Pennsylvania)
TRPM5-TB3 (Epitop: KYIGGLREQEKRIKCLESQANYCMLLLSSMTDTLAPGGTYSSSQNCGCRSQPASARDREYLESGLPPSDT)	Prof. E. Liman (University of Southern California, USA)

#### 2.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ :	F <sup>-</sup> , supE44, hsdR17, recA1, $\Delta$ lacU169, $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, endA1, gyrA96, (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), thi-1, relA1, supE44, $\lambda$ -
<i>E. coli</i> TOP 10:	F <sup>-</sup> , mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lac $\lambda$ 74, deoR, recA1, araD139, $\Delta$ (ara-leu)7697, ga/u, ga/K, rpsL, endA1, rmpG

#### 2.1.3 Chemikalien und Fertiglösungen

Accustain	Sigma (München)
Acesulfam K	Omikron (Neckarwestheim)
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Difco (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)

L-Alanin	Fluka (Taufkirchen)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
L-Arginin	Sigma (München)
BSA	PAA (Cölbe)
DAPI/Antifade	Qbiogene (Heidelberg)
Denatoniumbenzoat	Sigma (München)
Diazoxid	Sigma (München)
DMEM	Cambrex (Verviers, Belgien)
DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Gerbu (Gaiberg)
Entellan Eindeckmedium	Merck (München)
Ethanol	Riedel-de-Haen (München)
Ethidiumbromid	Q-Biogene (Heidelberg)
ExpressHyb	Clontech (Heidelberg)
FCS	PAN (Aidenbach)
Formaldehyd	Riedel-de-Haen (München)
D(+)-Glukose	Sigma (München)
L-Glutamin	PAN (Aidenbach)
HBSS ohne Phenolrot	Gibco-BRL (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Difco (Heidelberg)
HEPES pH 7,4	PAA (Cölbe)
Insulin (Humalog)	Lilly (Bad Homburg)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Methylenblau	VWR (Wien)
MOPS	ICN (Eschwege)
Natriumpyruvat MEM	Gibco-BRL (Karlsruhe)
Neomycin	PAA, (Cölbe)
OptiMEM	Gibco-BRL (Karlsruhe)
PBS	Gibco-BRL (Karlsruhe)
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Gibco-BRL (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAN (Aidenbach)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
PLUS Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma (München)
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham (Freiburg)

RPMI-1640	Gibco-BRL (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
Soybean trypsin inhibitor	Sigma (München)
TEMED	Amresco (Ohio, USA)
Tissue-Tek Einbettmedium	Sakura (Heppenheim)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roche (Mannheim)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	PAN (Aidenbach)
Trypton	Difco (Heidelberg)
Tween 20	Merck (München)

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“. Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (München), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

#### 2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
Collagenase	Sigma (München)
DNaseI (RNase frei)	Roche (Mannheim)
Klenow Exo–	NEB (Frankfurt)
MMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt)
RNase A	Sigma (München)
RNase Inhibitor	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-Polynukleotidkinase	NEB (Frankfurt)
Taq-Polymerase	Roche (Mannheim)

#### 2.1.5 Geräte

Bakterieninkubatoren	B5042; Heraeus (Hanau) Certomat S mit Certomat R (B.Braun, Melsungen)
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism 377; Applied Biosystems (Weiterstadt) Software: DNA-Analysis V2.1.2 Rechner: Power Macintosh 7200/90, Apple (USA)



Elektroporationsgerät	Gene Pulser; Bio-Rad (München)
ELISA-Reader	MRX II Microplate Reader; Dynex (Chantilly, USA) Software: Dynex Revelation Version G 3.2
FACS-Gerät	FACSCalibur; Becton Dickinson (Heidelberg) Software: CellQuest
Geldokumentationssystem	E.A.S.Y. System; Herolab (Wiesloch)
Gelelektrophoresesysteme	Easy-Cast Electrophoresis System; Owl Scientific (USA) MINI Protean II; Bio-Rad (München)
Glukometer	Accu-Chek Comfort; Roche (Mannheim)
Heizblock	MR2002; Heidolph (Schwalbach)
Hybridisierungsöfen	HB-2; Techne (Jahnsdorf)
Kryostat	1720 digital; Leica (Wetzlar)
Laborwaagen	LC 2201; Sartorius (Göttingen) Feinwaage BA110; Sartorius (Göttingen)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Mikroskope	ID03; Zeiss (Offenbach) und BX50WI; Olympus (Hamburg) Fluoreszenzmikroskop DMRBE; Leica (Wetzlar) Konfokales Lasermikroskop TCS SP2; Leica (Wetzlar)
Paraffin-Ausgießstation	EG1140H; Leica (Wetzlar)
PCR-Geräte	TC-1 DNA-Thermal Cycler; Perkin Elmer (Weiterstadt) PTC 100 und PTC 200; MJ Research (USA)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer	Ultrospec III, Pharmacia (Freiburg)
Rotationsmikrotom	RM2165; Leica (Wetzlar)
Schüttelinkubator	Lab-Therm; Kühner (Schweiz)
<i>Semi-dry</i> -Blottingapparatur	Biometra (Göttingen)
Spannungsgeräte	LKB-GPS 200/400; Pharmacia (Freiburg) 2297 Macrodrive 5; LKB Bromma (USA)
Sterilbänke	DLF/BSS-6; Clean Air (Niederlande) Holten LaminAir 1.2; Holten (Dänemark)
Szintillationszähler	Wallace-1410; Pharmacia (Freiburg)
Thermomixer	Comfort 1,5 ml; Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallstab	Sonifier Cell Disruptor B15; Branson (Danbury, USA)
Ultra-Turrax	T25; IKA-Labortechnik (Staufen)
UV-Crosslinker	Stratalinker 1800; Stratagene (Amsterdam)
Vakuumtrockner	Univapo 100H Refrigerated Aspirator; UniEquip (Martinsried)

Vortexer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Wasserbäder	2219 Multitemp II; LKB Bromma (Schweden) F10; Julabo (Seelbach)
Zellkulturinkubator	IR 1500; Flow Laboratories (Meckenheim) WTC; Binder (Tuttlingen)
Zentrifugen	Biofuge pico; Heraeus (Hanau) 5415C; Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 5804R; Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 6000D; Sorvall (Langenselbold)

### 2.1.6 Größenstandards

0,24-9,5 kb RNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
2-Log DNA ladder	NEB (Frankfurt)
100 bp DNA ladder	NEB (Frankfurt)
$\lambda$ DNA/HindIII Fragments	Invitrogen (Karlsruhe)
Full-Range Rainbow molecular weight marker RPN 800	Amersham (Freiburg)
Roti-Mark prestained	Roth (Karlsruhe)

### 2.1.7 Kits

BigDye Sequencing Kit Version 3.1	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Insulin ELISA (mouse/rat)	Mercodia (Schweden)
MMLV RT Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Nucleobond AX Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene (Heidelberg)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy RNA Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RPM Kit	Q-Biogene (Heidelberg)

### 2.1.8 Oligonukleotide

#### *Generierung und Sequenzierung von Expressionskonstrukten*

#### **pcDNA3-TRPM5-long bzw. -short, pcDNA3-TRPM5-long/EGFP bzw. -short/EGFP**

MTR1-NarI-F	5' - CTG TAT GGC CTG CAG AGC C - 3'
MTR1-DMB-F	5' - TCA TCC TGC TCA GCC ACC TG - 3'
MTR1-TMINI-F	5' - ATC CCA ACA CCT TGG AGA GG - 3'
TRPM5-F17	5' - GGA CTT CAT GGT GGT CAC GC - 3'
TRPM5-R21	5' - CGT GGT ACT CCA CAA TCA GG - 3'
MTR1-CMP-R	5' - ACT AGG GCA GCA AGC ACA TC - 3'

MTR1-DOU-R	5' - CGA AGT ACA TGA CCA CGT TC - 3'
MTR1-TFINI-R	5' - CTG CGC CGT TGT CCA CAA AG - 3'
EGFP-KpnI-F	5' - AAA AAG GTA CCG CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG - 3'
EGFP-XhoI-R	5' - AAA AAC TCG AGC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC - 3'
<b>pcDNA3-EGFP</b>	
EGFP-EcoRI-F	5' - AAA AAG AAT TCG CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG - 3'
EGFP-ApaI-R	5' - AAA AAG GGC CCT TAC TTG TAC AGC TCG TCC A - 3'
<b>pcDNA3-Trpm5, pcDNA3-Trpm5/FLAG</b>	
mTRPM5-F	5' - GTG GCC ATC TTC CTG TTC AT - 3'
mTRPM5-F1	5' - GGA ACG ACC TTT GGC TAT GA - 3'
mTRPM5-F2	5' - AGA TGA GGG CAA CAT TCA GG - 3'
mTRPM5-F3	5' - TTT CTC TTG GGA AGC CAT TG - 3'
mTRPM5-F4	5' - AAG CAT GAG GAG GGT AGG CT - 3'
mM5-Exon14F	5' - ACA CCC ATC CTA CGG CTT CT - 3'
mTRPM5-R	5' - CCT TCC TGA AGA CCT GCT TG - 3'
mTRPM5-R1	5' - GGT ATC TGG ATG CAG CTG GT - 3'
mTRPM5-R2	5' - CAC AAA GAG GCG GAC AAA GT - 3'
mTRPM5-R3	5' - GGA AGT CTT TGA GTA CGC GG - 3'
mTRPM5-R4	5' - GGC ATC CTC ACT GAA GGA GA - 3'
mTRPM5-R7	5' - ACC TGT GCT CTG AGC TGC TT - 3'
mM5-Exon20R	5' - GAA CAT GGC GAT CAG AAG GT - 3'
FLAG-mM5-F	5' - AAA GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG ATG CAA ACA ACC CAG AGC TCC - 3'
FLAG-mM5-NheI-R	5' - CTA CAC GGA TCT TGG ATG TGC - 3'
<b>pTER-TRPM5-siRNA1</b>	
pTER-MTR1-F	5' - GAT CCC GTG TGA CAT GGT GGC CAT CTT CAA GAG AGA TGG CCA CCA TGT CAC ACT TTT TGG AAA - 3'
pTER-MTR1-R	5' - AGC TTT TCC AAA AAG TGT GAC ATG GTG GCC ATC TCT CTT GAA GAT GGC CAC CAT GTC ACA CGG - 3'
<b>pTER-TRPM5-siRNA2</b>	
pTER-M5-murin-F	5' - GAT CCC TGC AGA CAT GTT CTG GAA GTT CAA GAG ACT TCC AGA ACA TGT CTG CAT TTT TGG AAA - 3'
pTER-M5-murin-R	5' - AGC TTT TCC AAA AAT GCA GAC ATG TTC TGG AAG TCT CTT GAA CTT CCA GAA CAT GTC TGC AGG - 3'

**Genotypisierung der *Trpm5*-knock down-Mäuse (PCR und Southern Blot)**

pTER-F	5' - CAT GTC GCT ATG TGT TCT GG - 3'
pTER-R	5' - CCT ACT CAG ACA ATG CGA TG - 3'
pTER_EcoRI_EcoRI-F	5' - AAC GCT GAC GTC ATC AAC C - 3'
pTER_EcoRI_EcoRI-R	5' - TGG TGA TTT CCC AGA ACA CA - 3'

**Genotypisierung der *Trpm5*-knock out-Mäuse (PCR)**

Trpm5-230F	5' - GGG CTT CTT CAC AGA TGA GG - 3'
Trpm5-230R	5' - GGA CCC AAC TGC TTG TGA AT - 3'
Neo-F	5' - TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG - 3'
Neo-R	5' - CGA TAC CGT AAA GCA CGA GG - 3'

**TRPM4-Expressionsanalyse in humanen Zellen (RT-PCR)**

TRPM4-F	5' - CAG TTT CCC CTG GAC TAC AA - 3'
TRPM4-R	5' - AAG CTT CGA GAT GGA AGG AC - 3'

**Trpm4-Expressionsanalyse in murinen und Rattenzellen (RT-PCR)**

Trpm4-F	5' - AAC AGA GAC ATG CTG ATC AAC - 3'
Trpm4-R-mouse	5' - CAT AGG TGC CAT CAT CCA C - 3'
Trpm4-R-rat	5' - CAT AGG TAC CAT CAT CCA C - 3'

**TRPM5-Expressionsanalyse in humanen Zellen (RT-PCR und Northern Blot)**

TRPM5-F17	5' - GGA CTT CAT GGT GGT CAC GC - 3'
TRPM5-R21	5' - CGT GGT ACT CCA CAA TCA GG - 3'

**Trpm5-Expressionsanalyse in murinen und Rattenzellen; Charakterisierung der *Trpm5*-knock down-Mäuse (RT-PCR)**

Trpm5-20F	5' - TGA ACC TTC TGA TCG CCA TG - 3'
Trpm5-22R	5' - CAT GGT ACT CAG GAA GTT CTC - 3'

**Trpm5/FLAG-Expressionsanalyse in murinen Zellen (RT-PCR)**

mM5-FLAG-F	5' - GAT GAC GAC GAT AAG ATG CAA - 3'
mM5-FLAG-R	5' - CAC GGA TCT TGG ATG TGC TA - 3'

**Weitere verwendete Oligonukleotide für RT und RT-PCR**

Aktin-F	5' - GTC CAC ACC CGC CGC CA - 3'
Aktin-R	5' - GTC GCC CGC GAA GCC G - 3'
Maus-Aktin-F	5' - GCG AGC ACA GCT TCT TTG C - 3'
Maus-Aktin-R	5' - CGA TGG AGG GGA ATA CAG C - 3'
Ratte-Aktin-F	5' - TCA TGA AGA TCC TGA CCG AG - 3'
Ratte-Aktin-R	5' - GAT CTT CAT GGT GCT AGG AG - 3'

T16 5' - TTT TTT TTT TTT TTT T- 3'

### *siRNAs*

TRPM5-siRNA1 5' - GUG UGA CAU GGU GGC CAU CdTdT - 3'  
3' - dTdT CAC ACU GUA CCA CCG GUA G - 5'

TRPM5-siRNA2 5' - UGC AGA CAU GUU CUG GAA GdTdT - 3'  
3' - dTdT ACG UCU GUA CAA GAC CUU C - 5'

### *siRNA-spezifische Sonden*

pTER-Hu-Sonde 5' - TCT CTT GAA GAT GGC CAC CAT GTC ACA C - 3'

pTER-murin-Sonde 5' - TCT CTT GAA CTT CCA GAA CAT GTC TGC A - 3'

### *Vektor-Oligonukleotide*

BGH-R 5' - TAG AAG GCA CAG TCG AGG CT - 3'

pcDNA3-F1 5' - CAC CAA AAT CAA CGG GAC TT - 3'

Sp6 5' - ATT TAG GTG ACA CTA TAG - 3'

T7 5' - AAT ACG ACT CAC TAT AGG G - 3'

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried), die siRNA-Moleküle von der Firma Dharmacon (Lafayette, Colorado, USA) bezogen.

## **2.1.9 Plasmide und Vektoren**

pBI-EGFP	Clontech (Heidelberg)
pBluescript KS (+)	Stratagene (Heidelberg)
pcDNA3	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA4TO-V5-TRPM4b	Dr. P. Launay (Harvard Medical School, Boston, USA)
pHGCX-Trpm5	Prof. E. Liman (University of Southern California, USA)
pTER	Van de Wetering <i>et al.</i> , 2003

## **2.1.10 Puffer und Lösungen**

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, Millipore-gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Agarplatten	15 g Agar-Agar ad. 1 l LB-Medium
Annealing-Puffer	100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4 2 mM Magnesiumacetat
Antibiotika-Stammlösungen	Ampicillin: 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O Neomycin: 60 mg/ml in PBS

---

Church-Puffer	0,5 M NaHPO <sub>4</sub> , pH 7,0 7 % SDS
DNA-Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
DNA-Ladepuffer	15 g Saccharose 0,175 g Orange G ad. 50 ml H <sub>2</sub> O
DNA-Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 1,5 M NaCl
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Saccharose
DNaseI-Puffer (10x)	100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT
2x FM-Medium	65 % Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 0,025 M Tris-HCl, pH 8,0
Gewebelysepuffer	2 % SDS 50 mM Tris pH 7,5
HBSS	114 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,16 mM MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 25,5 mM NaHCO <sub>3</sub> 20 mM HEPES, pH 7,4
HBSS+K <sup>+</sup>	83,7 mM NaCl 35 mM KCl sonst wie HBSS
Hybridisierungspuffer	5x SSC 1 % SDS
IP-Lysepuffer	10 mM Tris, pH 7,5 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 mM DTT 1 mM PMSF (frisch zugeben)

---

KRB	128,8 mM NaCl 4,8 mM KCl 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM NaHCO <sub>3</sub> 10 mM HEPES, pH 7,4
Laemmli-Ladepuffer (5x)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % Glycerin 8 % Mercaptoethanol 0,002 % Bromphenolblau
Laufpuffer (10x)	144 g Glycin 30 g Tris 1 % SDS ad. 1 l H <sub>2</sub> O
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad. 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,5
MOPS (10x)	0,2 M 3-N-Morpholin-Propan-Sulfonsäure 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA, pH 7,0
PBS	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Proteinprobenpuffer (6x)	350 mM Tris-HCl, pH 6,8 34,4 % Glycerin 10 % SDS 0,93 g DTT 10 % β-Mercaptoethanol 0,06 % Bromphenolblau
RNA-Hydrolyselösung	50 mM NaOH 10 mM NaCl
RNA-Ladepuffer (10x)	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10x MOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (37 %)

---

RNA-Loading Mix	0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylencyanol 0,025 % SDS 5 mM EDTA 95 % Formamid
RNA-Neutralisierungslösung	10x SSC 0,2 M Tris-HCl, pH 7,4
RNA-Probenpuffer (1,5x)	61 µl Formaldehyd 150 µl Formamid (deionisiert) 37,5 µl 10x MOPS-Puffer 1,5 µl H <sub>2</sub> O
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
STETL-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 50 mM EDTA 5 % Triton X-100 8 % Saccharose
TAE-Puffer (10x)	400 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8,0
Tail-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1 % SDS 100-600 µg Proteinase K (frisch zugeben)
TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,3
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,0-8,0 10 mM EDTA, pH 8,0
TfbI-Puffer	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure
TfbII-Puffer	10 mM NaMOPS, pH 7,0 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15 % Glycerin



Transferpuffer (10x)	144 g Glycin 30 g Tris ad. 1 l H <sub>2</sub> O
TSA-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,025 % NaN <sub>3</sub>
TSAT-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,025 % NaN <sub>3</sub> 0,1 % Triton X-100
Zelllysepuffer (5x)	62,5 mM EDTA 2,5 % SDS
WASH1	2x SSC 0,05 % SDS
WASH2	0,1x SSC 0,1 % SDS
Waschpuffer	2x SSC 1 % SDS

### 2.1.11 Radioisotope

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham (Freiburg)
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham (Freiburg)

### 2.1.12 Tiere

Die verwendeten Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzberg) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Regeln des deutschen Tierschutzgesetzes. Für die Generierung der transgenen *Trpm5-knock down* Mauslinien wurde der Inzuchtstamm C57BL/6 verwendet. Für die Untersuchung des *Trpm5-knock out*-Phänotyps wurde uns freundlicherweise von Prof. Zuker (University of California, USA) die *Trpm5-knock out*-Maus (Zhang, Y. *et al.*, 2003) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	IDL (Nidderau)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad (München)
FACS-Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Hyperfilme	Amersham (Freiburg)
Kryoröhrchen	Fisher Scientific (Schwerte)
Nylonmembran, Hybond N+	Amersham (Freiburg)

3MM-Whatman-Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nitrozellulosemembran, Hybond ECL	Amersham (Freiburg)
Objektträger	IDL (Nidderau), Menzel (Braunschweig)
PCR-Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Peqlab (Erlangen)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipetten, 5, 10 und 25 ml	Greiner (Frickenhausen)
PP-Röhrchen, 15 und 50 ml	Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml	Eppendorf (Hamburg)
Schnappdeckel PP-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Sephadex G50 Nick Spin-Säulen	Pharmacia (Freiburg)
S&S-Rotrand Sterilfilter, 0,22 µm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Szintillationsröhrchen	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen	Renner (Dannstadt)
Zellkulturschalen	Renner (Dannstadt)

## 2.2 Arbeiten mit DNA und RNA

### 2.2.1 Standardmethoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (Mini-Präparation) erfolgte mittels alkalischer Lyse unter Verwendung des RPM-Kits (Q-Biogene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Lediglich für die Analyse von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde die Methode der Lyse durch Kochen angewandt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 1,5 ml der Bakterienkultur 30 s bei Raumtemp./14000 Upm zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 250 µl STETL-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min aufgekocht und anschließend 10 min bei Raumtemp./14000 Upm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde verworfen und die freigesetzte Plasmid-DNA mit 220 µl Isopropanol gefällt (10 min bei Raumtemp./14000 Upm). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol und anschließender Vakuumtrocknung wurde die DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O mit 50 µg/ml RNase gelöst.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi- bzw. Maxi-Präparation) wurde mit dem Nucleobond AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Zellkulturen wurden die in 24-Loch-Platten kultivierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 200 µl 1x Zellysepuffer mit 1 mg/ml Proteinase K aufgenommen und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 5 M NaCl und 250 µl Isopropanol wurde die Probe 15 min bei Raumtemp./14000 Upm zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 30 µl 1/10 TE gelöst.

### 2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Isolierung genomischer DNA wurde den mindestens drei Wochen alten Mäusen ein kurzes Stück (etwa 0,5 cm) der Schwanzspitze mit einer Schere biopsiert. Die Gewebeproben wurden mit 770 µl Tail-Lysepuffer und 300 µg/ml Proteinase K in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben durch Vortexen gemischt und 30 min bei Raumtemp./14000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und die DNA durch Zentrifugieren (30 min bei Raumtemp./14000 Upm) gefällt. Die DNA-Pellets wurden zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und schließlich durch Schütteln auf einem Thermomixer (1-2 h bei 50°C) in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.1.4 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem *RNeasy RNA Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Zellen (in der Regel 10 cm-Kulturschalen) wurden dazu zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (10 min bei Raumtemp./350 g). Das Zellpellet wurde in 600 µl RLT-Puffer des *RNeasy RNA Extraction Kits* aufgenommen und die RNA nach dem *RNeasy mini protocol for the isolation of total RNA from animal cells* isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde die RNA in 40 µl (bzw. 74 µl für einen DNaseI-Verdau) RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.1.5 DNaseI-Verdau von RNA-Proben

Zur Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Der Verdau (100µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- 74 µl RNA
- 2 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl; MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 4 µl DNaseI (10 U/µl; Roche, Mannheim)
- 10 µl 10x DNase-Puffer
- 10 µl 10x TE

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte nach dem *RNeasy mini protocol for RNA cleanup* (Qiagen, Hilden). Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

#### **2.2.1.6 Isolierung von RNA aus Mausgeweben**

Die Gewebe wurden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt. Zur RNA-Extraktion wurden die Gewebestücke (50-100 mg) mit 1 ml Trizol in Schnappdeckelgefäße überführt und 1 min mit einem Ultraturrax (IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt, 5 min bei Raumtemp. inkubiert und 10 min bei 4°C/12000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 s von Hand geschüttelt und 3 min bei Raumtemp. inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min bei 4°C/12000 g) wurde die RNA gefällt. Dazu wurde die obere, wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt, die Lösung 15 s von Hand gemischt, 10 min bei Raumtemp. inkubiert und 10 min bei 4°C/12000 g zentrifugiert. Zum Schluss wurde die präzipitierte RNA mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 4°C/7500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und 10 min bei 55°C in RNase-freiem Wasser gelöst. Die gelöste RNA wurde bis zur weiteren Analyse bei –80°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte bei 260 nm, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt. Bei 260 nm entspricht die optische Dichte (OD) von 1,0 einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml (doppelsträngige DNA) bzw. 40 µg/ml (RNA). Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine oder Phenolrückstände wurden bei 280 nm gemessen. Bei reinen Präparationen sollte das Verhältnis OD 260 nm/OD 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die DNA- und RNA-Lösungen wurden üblicherweise 1:100 verdünnt und die Konzentration mit einem Photometer (Ultrospec III; Pharmacia, Freiburg) bestimmt.

### 2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Proben

Um die DNA von Enzymen und anderen Proteinen zu befreien, wurde die DNA-Probe durch zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion und einmalige Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde die DNA in einem Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bzw. Chloroform/Isoamylalkohol durch kurzes Vortexen vermischt und anschließend für 5 min bei Raumtemp./14000 Upm zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.1.9 Fällung von DNA

Gelöste DNA, aufgereinigte Restriktionsansätze, PCR-Produkte sowie Sequenzierreaktionen wurden zur Aufreinigung bzw. Volumeneinengung mit Salzen und Alkohol gefällt. Die Fällung der DNA erfolgte üblicherweise durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100 % Ethanol (35 min bei 4°C/14000 Upm). Die gefällte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in Wasser gelöst.

PCR-Produkte wurden mit 1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumen frischem Isopropanol gefällt (35 min bei Raumtemp./14000 Upm). Dabei wurden die Oligonukleotide und kleine (<80 bp) DNA-Fragmente selektiv entfernt.

### 2.2.1.10 Agarosegelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Auf 0,8-2 % Agarosegelen können 100 bp-15 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden.

Vor der Agarosegelelektrophorese wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in horizontalen Gelelektrophorese-Apparaturen (Owl Scientific, USA) bei 60-120 V. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5-10 µl der Marker *100 bp DNA ladder* (NEB, Frankfurt) *λ DNA/HindIII Fragments* (Invitrogen, Karlsruhe) oder *2-Log DNA ladder* (NEB, Frankfurt) auf das Gel aufgetragen.

Zur Darstellung der DNA wurden die Gele 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt und 10-20 min in Wasser entfärbt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage (Herolab, Wiesloch) ausgewertet und fotografiert.

### 2.2.1.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dabei wurde das Agarosegel möglichst kurz dem UV-Licht ausgesetzt, um DNA-Schädigungen zu vermeiden. Die Wiedergewinnung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Die routinemäßig angewandte Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf der von Sanger und Mitarbeitern beschriebenen Kettenabbruchmethode, die durch die Verwendung fluoreszierender Didesoxynukleotide modifiziert wurde (Lee *et al.*, 1992; Sanger *et al.*, 1977). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen erfolgten mit dem *BigDye Sequencing Kit* (Version 3.1; Applied Biosystems, Weiterstadt).

Der Sequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 50-100 ng PCR-Produkt bzw. 1-3 µg Plasmid-DNA
- 10 pmol Oligonukleotid (Sequenzierprimer)
- 2 µl 5x Sequenzierungspuffer (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- 2 µl *BigDye* (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- ad. 10 µl H<sub>2</sub>O bidest

Die Sequenzierung wurde mit folgendem Thermocyclerprogramm durchgeführt:

- 1 min 95°C
- 30 s 95°C, 10 s 50°C, 4 min 60°C (30 Zyklen)

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden mit Natriumacetat/Ethanol gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Vakuumtrocknung wurde die DNA in 2,5 µl Sequenzierladepuffer (Formamid/Blue-D-Puffer im Verhältnis 6:1) gelöst. Die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale und deren automatische Auswertung erfolgten mit dem *ABI Prism 377*-Sequenziergerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers.

## **2.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten**

### **2.2.2.1 Annealing von Oligonukleotiden**

Für die Herstellung von RNAi-Konstrukten wurden die in das pTER-Plasmid einzufügenden Oligonukleotide gepaart. Dazu wurden je 2 µl der Oligonukleotide (1µg/µl) mit 46 µl des Annealing-Puffers für 3 Minuten bei 90°C denaturiert, danach für 1 h bei 37°C inkubiert.

### **2.2.2.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Der Verdau von DNA erfolgte nach Angaben des Enzymherstellers (NEB, Frankfurt) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Die eingesetzte Enzymmenge und die Dauer der Restriktion wurden auf die jeweilige DNA-Menge abgestimmt. In der Regel wurden pro µg DNA 3-5 U Enzym eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 1 h bei dem für das Restriktionsenzym notwendigen Temperaturoptimum. Präparative Ansätze enthielten in der Regel 5-20 µg DNA in einem Restriktionsvolumen von 50-100 µl, während für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt wurden.

### **2.2.2.3 Dephosphorylierung von Vektorenden**

Um die Religation von Vektorenden zu verhindern, wurde linearisierte Plasmid-DNA vor einer Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt. Durch die alkalische Phosphatase werden Phosphatreste an DNA-Enden enzymatisch entfernt. Zu einem 50 µl-Restriktionsansatz mit 1-2 µg Plasmid-DNA wurde 1 U alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim) zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 56°C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurde erneut 1 U Enzym hinzugegeben und die Inkubationsschritte wurden wiederholt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese oder mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (siehe Kapitel 2.2.1.8).

### **2.2.2.4 Ligation**

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10-20 µl, wobei das einzufügende DNA-Fragment in einem Verhältnis 3:1 zur Vektor-DNA eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde mit 0,5-1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) und dem mitgelieferten Puffer durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht. Für die anschließende Transformation von Bakterien wurden in der Regel 1-5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

### **2.2.2.5 Herstellung chemokompetenter Bakterien**

Die Herstellung chemokompetenter Bakterien erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hanahan (Hanahan, 1985). Hierbei wurde eine 10 ml-Kultur des *E. coli*-Stammes DH5α angesetzt und über Nacht bei 37°C/220 Upm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 ml

LB-Medium mit der Übernachtskultur auf eine  $OD_{550}$  von 0,05 beimpft und bis zur  $OD_{550}$  von 0,5 weiter inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}/1200\text{ g}$  zentrifugiert und das Bakterienpellet in 30 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und 6 min bei  $4^{\circ}\text{C}/800\text{ g}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 4 ml eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert, in 200  $\mu\text{l}$ -Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.2.6 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 25 ml LB-Medium mit *E. coli*-Bakterien des TOP10-Stammes angeimpft und die Kultur über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}/220\text{ Upm}$  inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml der Übernachtskultur beimpft und der Ansatz bis zu einer  $OD_{550}$  von 0,5 weiter inkubiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}/2000\text{ g}$  zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 500 ml eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest resuspendiert. Nach den folgenden Zentrifugationsschritten (je 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}/2000\text{ g}$ ) wurde das Pellet nacheinander in 250 ml eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest, 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin und 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Schließlich wurden die Bakterien in 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert

#### **2.2.2.7 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock**

Die chemokompetenten Bakterien (200  $\mu\text{l}$ ) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-5  $\mu\text{l}$  des vorgekühlten Ligationsansatzes ein Schnappdeckelgefäß gegeben. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann 1 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  erhitzt (Hitzeschock) und anschließend kurz auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}/220\text{ Upm}$  inkubiert. In der Regel wurden 50, 100 und 500  $\mu\text{l}$  der Kultur auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **2.2.2.8 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation**

Die elektrokompetenten Bakterien (100  $\mu\text{l}$ ) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand; Biorad, München) überführt. Die Transformation erfolgte mit einem Elektroporationsgerät (Gene Pulser; Biorad, München) bei 1,7 kV und 25  $\mu\text{F}$ . Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Schnappdeckelgefäß überführt und für 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}/220\text{ Upm}$  inkubiert. In der Regel wurden 10, 50 und 200  $\mu\text{l}$  der Kultur auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.



### 2.2.2.9 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl 2x FM-Medium vermischt und bei –80°C in einem Kryoröhrchen aufbewahrt.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Die PCR dient der enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988). Hierbei lagern sich nach der Trennung der DNA-Doppelstränge (1. Schritt: Denaturierung) zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide an die Matrizen-DNA an (2. Schritt: *Annealing*). Durch die hitzestabile Taq-Polymerase des *Thermophilus aquaticus*-Bakteriums werden ausgehend von den gebundenen Oligonukleotiden zur Matrizen-DNA komplementäre Nukleotide hinzugefügt und auf diese Weise komplementäre DNA-Stränge synthetisiert (3. Schritt: Elongation). Da diese drei Schritte in mehreren Zyklen wiederholt werden, kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der Matrizen-DNA.

Die DNA-Amplifikation erfolgte standardmäßig mit folgendem PCR-Programm in einem Thermocycler:

3 min 94°C (initiale Denaturierung)  
 20-35 Zyklen: 1 min 94°C (Denaturierung)  
                   1 min 58-64°C (*Annealing*)  
                   1 min 72°C (Elongation)  
 10 min 72°C (finale Elongation)  
 4°C

Dabei wurden die *Annealing*-Temperatur sowie die Anzahl der Amplifikationszyklen je nach verwendeten Oligonukleotiden und Matrizen-DNA variiert. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

20-200 ng Matrizen-DNA  
 1-2 µl 5'-Oligonukleotid (20 µM)  
 1-2 µl 3'-Oligonukleotid (20 µM)  
 4 µl dNTPs (je 1,25 mM)  
 5 µl 10x PCR-Puffer  
 ad. 49 µl H<sub>2</sub>O bidest  
 1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl; Roche, Mannheim)

Im Anschluss an die PCR wurden 5 µl der amplifizierten DNA mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

## 2.2.4 Reverse Transkription (RT)

Nach der Isolation und Aufreinigung der RNA aus Zellen oder Geweben wurden 4 µg in die RT-Reaktion eingesetzt. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 16 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde kurz auf Eis abgekühlt bevor das folgende Gemisch zugegeben wurde:

- 5 µl T16-Oligonukleotid (50 µM)
- 3,5 µl dNTPs (je 10 mM)
- 4 µl 0,1 M DTT
- 2 µl RNase Inhibitor (20 U/µl; MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 8 µl 5x First-Strand Buffer
- 1,5 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl; Invitrogen, Karlsruhe)

Für Kontrollen auf DNA-Kontamination wurde anstelle der Reversen Transkriptase RNase-freies Wasser eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37°C für 90 min. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch eine Inkubation bei 95°C für 10 min inaktiviert und der Ansatz auf 4°C gekühlt.

Für RT-PCRs wurden 1-2 µl der cDNA als Matrize eingesetzt. Um die Genexpression in verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurden semiquantitative RT-PCRs mit gleichen cDNA-Mengen und gleichen Zyklenzahlen durchgeführt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche cDNA-Synthese und für die in die RT-PCR eingesetzte cDNA-Menge wurde parallel die Amplifizierbarkeit eines Haushaltsgens (*β-Aktin*) untersucht.

## 2.2.5 Hybridisierungstechniken auf Filtermembranen

### 2.2.5.1 Radioaktive Markierung von Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem *Prime-It II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene, Amsterdam) nach Angaben des Herstellers. Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden (ausgenommen der siRNA-spezifischen Sonden; siehe Kapitel 2.2.5.2) wurden mittels PCR generiert und besaßen eine Größe von 100-500 bp. Für die Markierung wurden 10 µl *Random 9mer Primer* zu 25-50 ng Sonden-DNA gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 34 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min hitzedenaturiert und kurz auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 10 µl 5x dCTP-Puffer, 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10 µCi/µl) und 1 µl Klenow Exo- (5 U/µl) zugegeben und der Ansatz für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl *Stop-Mix* beendet und der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Mit *Sephadex G50 Nick Spin Columns* (Pharmacia, Freiburg) wurden nicht eingebaute Nukleotide entfernt. Um die Effektivität der Markierung zu überprüfen, wurden 1-2 µl des Ansatzes in 10

ml Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) mit einem Szintillationszähler (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) gemessen. Die Sonde wurde vor der Hybridisierung durch Kochen (5 min) denaturiert und kurz auf Eis gekühlt.

#### 2.2.5.2 Radioaktive Markierung von siRNA-spezifischen Sonden

Die radioaktive 5'-Endmarkierung von siRNA-spezifischen Oligonukleotiden wurde mit der T4-Polynukleotidkinase durchgeführt. Der Markierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl Oligonukleotid (100 µM)
- 2 µl 10x T4-Polynukleotidkinasepuffer
- 5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (10 µCi/µl)
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl; NEB, Frankfurt)
- 11 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, dann zur Inaktivierung der Kinase 10 min bei 68°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Zur Fällung der Sonden-DNA und zum Entfernen nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz mit 10 µl H<sub>2</sub>O, 120 µl 5 M NH<sub>4</sub>OAc und 375 µl eiskaltem Ethanol vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20 min bei 4°C/14000 Upm) wurde das Pellet mit 500 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten (je 5 min bei 4°C/14000 Upm) mit anschließender Entfernung der Überstände wurde das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und dann in 100 µl 1x TE gelöst. Nach der Markierung wurde 1 µl des Ansatzes in 10 ml Szintillationsflüssigkeit mit einem Szintillationszähler gemessen. Die Sonde wurde vor der Hybridisierung durch Kochen (5 min) denaturiert und kurz auf Eis gekühlt.

#### 2.2.5.3 DNA-DNA-Hybridisierung (*Southern-Hybridisierung*)

Die Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen erfolgte nach der von Southern beschriebenen Methode (Southern, 1975). Die *Southern-Hybridisierung* wurde zur Genotypisierung von Mäusen verwendet.

10 µg der genomischen DNA wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und mittels Gelelektrophorese auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt. In der Regel wurde die Gelelektrophorese bei 60-80 V durchgeführt; als Molekulargewichtsstandard diente *2-Log DNA ladder* (NEB, Frankfurt) und als Laufpuffer 1x TAE. Die Markerbanden wurden im fertigen Gel unter UV-Licht mit einem Spatel markiert. Das Gel wurde für 15 min in 0,25 N HCl depuriniert und anschließend für 30 min in DNA-Denaturierungslösung inkubiert.

Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran (Hybond N+; Amersham, Freiburg) erfolgte durch Kapillarkräfte, wobei ein unidirektionaler Aufbau verwendet wurde (nach Sambrook *et al.*, 1989). Der Transfer erfolgte für 16-72 h in DNA-Denaturierungslösung. Nach Abschluss des Transfers wurden die Markerbanden mit einem Fettstift eingezeichnet und die Membran wurde luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran zwischen zwei Schichten 3MM-Whatman-Papier gelegt, in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran für mindestens 4 h in 1 ml/cm<sup>2</sup> *ExpressHyb* (Clontech, Heidelberg) bei 60°C prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einer hitzedenaturierten DNA-Sonde (1-2x 10<sup>6</sup> cpm/ml *ExpressHyb*) über Nacht bei 60°C. Die Inkubationsschritte erfolgten in einem Hybridisierungsöfen (HB-2; Techne, Jahnsdorf) unter ständiger Rotation der Membran.

Am folgenden Tag wurde die Membran 45 min mit WASH1 bei Raumtemp. gewaschen und dabei die Waschlösung mehrmals gewechselt. Danach folgten zwei Waschschrte (je 10 min) mit WASH2 bei 50°C. Zur Signaldetektion wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und in einer mit Verstärkerfolie (Cronex Quanta III; DuPont, Bad Homburg) ausgekleideten Kassette 6 h bis 7 Tage bei -80°C autoradiografiert (Hyperfilm; Amersham, Freiburg).

Zum Entfernen der hybridisierten Sonde wurde die Membran 30 min in kochendem 0,5 % SDS gereinigt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.2.5.4 DNA-RNA-Hybridisierung (*Northern*-Hybridisierung)**

Um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen wurde die isolierte RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, durch Kapillarkräfte auf Nylonmembranen transferiert und mit einer für das Gen spezifischen Sonde detektiert.

In der Regel wurden 20 µg der RNA vakuumgetrocknet und in 10 µl 3x RNA-Ladepuffer gelöst. Nach Zugabe von 20 µl 1,5x RNA-Probenpuffer wurden die Proben für 10 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt. Das Agarosegel (1,2 % in 1x MOPS) enthielt 6,5 % Formaldehyd; als Laufpuffer diente 1x MOPS. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80-100 V mit 0,24-9,5 kb *RNA ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) als Molekulargewichtsstandard. Das fertige Gel wurde nach Fotodokumentation 40 min in RNA-Hydrolyselösung und zweimal 20 min in RNA-Neutralisierungslösung inkubiert.

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, Freiburg) erfolgte in 10x SSC für 48 h nach einer von Mason und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Mason *et al.*, 1993). Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran luftgetrocknet und zweimal mit 1200 kJ im UV-Crosslinker *Stratalinker 1800* (Stratagene, Amsterdam) bestrahlt. Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung zwischen zwei Lagen 3MM-Whatman-Papier in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Die Membran wurde für 2-4 h bei 65°C in 1 ml/cm<sup>2</sup> *ExpressHyb* prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der hitzedenaturierten DNA-Sonde (1-2x 10<sup>6</sup> cpm/ml *ExpressHyb*) erfolgte für 3 h bis über Nacht bei 65°C. Die Waschschriffe wurden bei Raumtemp. durchgeführt (WASH1: 30 min, WASH2: zweimal 15 min). Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 für die DNA-DNA-Hybridisierung beschrieben.

#### **2.2.5.5 DNA-RNA-Hybridisierung zur siRNA-Detektion**

Zur Untersuchung der siRNA-Expression wurde die aus Zellen oder Geweben isolierte RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend die siRNA mit einer spezifischen Sonde detektiert.

10-30 µg der RNA wurden vakuumgetrocknet und in 10µl RNA-Loading Mix gelöst. Kurz vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben denaturiert (5 min bei 95°C) und auf Eis gekühlt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 12 % Polyacrylamidgel, das sich wie folgt zusammensetzte:

- 5,99 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
- 1,5 ml 10x TBE
- 6,3 g Harnstoff
- 3,75 ml Formamid
- 75 µl 10 % APS + 7,5 µl TEMED (zur Polymerisation)

Die Gelelektrophorese wurde in einer vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München) bei 50 V durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TBE.

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, Freiburg) erfolgte mit Hilfe einer elektrischen *semi-dry*-Blottingapparatur (Biometra, Göttingen) mit 1x TBE als Transferpuffer. Dazu wurden 20 Lagen 3MM-Whatman-Papier mit 1x TBE befeuchtet und der *Blot* wie folgt aufgebaut:

Kathode  
10 Lagen 3MM-Whatman-Papier  
Polyacrylamidgel  
Nylonmembran  
10 Lagen 3MM-Whatman-Papier  
Anode

Der Transfer erfolgte für 1h bei 80-150 mA. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet. Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran zweimal mit 1200 kJ im UV-Crosslinker *Stratalinker 1800* (Stratagene, Amsterdam) bestrahlt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran zwischen zwei Lagen 3MM-Whatman-Papier in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Die Membran wurde 15-30 min in Hybridisierungspuffer gewaschen und anschließend 1 h in Church-Puffer prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht mit einer hitzedenaturierten Sonde ( $2-10 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungspuffer) in einem 10 ml-Volumen. Am folgenden Tag wurde die Membran viermal mit Hybridisierungspuffer (je 10-15 min pro Waschschrift) und ein bis dreimal mit Waschpuffer (je 10-15 min pro Waschschrift) gewaschen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 für die DNA-DNA-Hybridisierung beschrieben.

## 2.3 Arbeiten mit Proteinen

### 2.3.1 Isolierung von Proteinen aus Zellkulturen

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen in der Regel in 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 200 µl IP-Puffer lysiert. Das Zellysate wurde mit einem Zellschaber geerntet, in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 4°C/14000 Upm zentrifugiert und die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.2 Isolierung von Proteinen aus Mausgeweben

Die zu untersuchenden Gewebe wurden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für die Proteinextraktion wurden die Gewebestücke in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und in ein Schnappdeckelgefäß überführt. Nach der Zugabe von 1 ml Gewebelysepuffer wurden die Proben 10 min gekocht und anschließend mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Branson, USA) mit zweimal 10 Stößen beschallt. Nach einem

Zentrifugationsschritt (10 min bei 4°C/14000 Upm) wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München). Dazu wurden 1 µl des Proteinextraktes, 799 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl *Dye Reagent Concentrate* durch Vortexen vermischt und für 5 min bei Raumtemp. inkubiert. Durch die Reaktion des Bio-Rad-Reagenz mit dem Protein erfolgte ein Farbumschlag der Lösung, der photometrisch bei 595 nm gemessen wurde. Als Referenz diente eine Kontrolle ohne Proteinextrakt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer BSA-Eichkurve ermittelt, die zuvor mit definierten BSA-Mengen erstellt wurde.

### 2.3.4 Fällung von Proteinen

Für die Fällung der Proteine wurde die gewünschte Menge des Proteinextraktes mit dem neunfachen Volumen eiskaltem Aceton versetzt und für 1 h bei –20°C gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation (10 min bei 4°C/14000 Upm) wurden die Proteinpellets kurz getrocknet und in 20 µl 2x Proteinprobenpuffer resuspendiert.

### 2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinextrakten erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) werden die Proteine denaturiert und mit einer negativen Ladung umhüllt. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes ermöglicht, so dass weder die native Form der Proteine noch deren Eigenladung die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld beeinflussen. Die Verwendung diskontinuierlicher Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, führt zu einer Konzentration der Proteinextrakte in einer scharfen Zone, so dass alle Proteine gleichzeitig in die trennende Gelmatrix einlaufen.

Für die SDS-PAGE wurden 6 % Trenngele verwendet. Sammel- und Trenngel setzten sich wie folgt zusammen:

	<u>Sammelgel:</u>	<u>Trenngel:</u>
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,5 ml	1,0 ml
Tris	0,38 ml (1 M, pH 6,8)	1,3 ml (1,5 M, pH 8,8)
10 % SDS	30 µl	50 µl
H <sub>2</sub> O	2,1 ml	2,6 ml
10 % APS + TEMED (zur Polymerisation)	30 µl + 3 µl	50 µl + 5 µl

Die in 2x Proteinprobenpuffer gelösten Proteine wurden vor der SDS-PAGE für 5 min aufgeköcht. Die Auftrennung der Proben erfolgte in vertikalen Gelelektrophorese-Apparaturen (Bio-Rad, München) mit 1x Laufpuffer bei 80-120 V.

Als Größenstandard wurden 5-10 µl der Marker *Roti-Mark prestained* (Roth, Karlsruhe) und *Full-Range Rainbow molecular weight marker RPN800* (Amersham, Freiburg) verwendet.

### **2.3.6 Western Blot**

Im *Western Blot* werden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wird das gewünschte Protein mit Hilfe eines spezifischen Erstantikörpers auf der Membran detektiert. Ein Zweitantikörper, der an ein Enzym wie die alkalische Phosphatase oder die Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt ist, erkennt die konstante Region des Erstantikörpers. Der Nachweis des gewünschten Proteins erfolgt schließlich mit einer Farb- bzw. Lumineszenzreaktion, die durch das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym vermittelt wird.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer elektrischen *semi-dry*-Blottingapparatur (Biometra, Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg) übertragen. Dazu wurde das Trenngel vorsichtig vom Sammelgel getrennt und wie die Nitrozellulosemembran 5 min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Das 3MM-Whatman-Papier wurde ebenfalls mit 1x Transferpuffer befeuchtet und der *Blot* wie folgt aufgebaut:

Kathode  
6 Lagen 3MM-Whatman-Papier  
Polyacrylamidgel (Trenngel)  
Nitrozellulosemembran  
6 Lagen 3MM-Whatman-Papier  
Anode

Der Transfer erfolgte für 1 h bei 130-160 mA. Anschließend wurden die Markerbanden mit einem Fettstift auf der Membran nachgezeichnet. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemp. in Blockinlösung (PBS/0,05 % Tween/5 % Magermilchpulver) inkubiert. Die Inkubationschritte und Waschschrte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:1000 mit Blockinglösung verdünnt) erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 45 min mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und dann für 1 h mit dem Zweitantikörper (1:5000



mit Blockinglösung verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBS/0,05 % Tween und einmal für 5-10 min mit PBS gewaschen.

Zur Detektion des gewünschten Proteins wurde die Membran 1-2 min in einer ECL-Lösung (Amersham, Freiburg) geschwenkt und anschließend in einer Klarsichthülle in eine Kassette gelegt. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte durch entsprechend lange Exposition (10 s bis 1 h) von Röntgenfilmen (Amersham, Freiburg) in der Dunkelkammer.

### **2.3.7 ELISA**

Die Insulinbestimmung im Überstand von pankreatischen Betazellen und isolierten Langerhans'schen Inseln erfolgte mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandte ELISA-Technik (*sandwich-ELISA*) basiert auf der Verwendung zweier Antikörper, die gegen verschiedene Stellen des Insulin-Moleküls gerichtet sind. Einer der Antikörper (*coating antibody*) ist fest an eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gebunden während der zweite (*detection antibody*) zusammen mit der zu messenden Probe auf die Platte gegeben wird. Während der Inkubation binden beide Antikörper an das in der Probe vorhandene Insulin. Der *coating*-Antikörper fixiert dabei das Insulin an der Mikrotiterplatte. In anschließenden Waschschritten werden ungebundene Bestandteile der Probe sowie der überschüssige zweite Antikörper entfernt. Die Detektion des Insulins erfolgt mit Hilfe des gebundenen *detection*-Antikörpers, der an eine Peroxidase gekoppelt ist. Durch die Zugabe des Chromogens Tetramethylbenzidin und des Substrats Peroxid erfolgt eine enzymatische Farbreaktion, die das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt umwandelt. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt, der photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Da die Intensität der gelben Farbe proportional zur Menge des gebundenen zweiten Antikörpers ist, kann auf diese Weise die Insulinkonzentration der Probe ermittelt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Insulinmessungen wurden mit dem Maus- bzw. Ratteninsulin ELISA-Kit von Mercodia (Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Messungen wurde der ELISA-Reader MRX II (Dynex; Chantilly, USA) mit der Dynex Revelation-Software (Version G 3.2) verwendet.

### **2.3.8 Coimmunpräzipitation**

Die Interaktion zweier Proteine wurde mittels Coimmunpräzipitation untersucht. Die zu untersuchenden Proteine wurden dazu für 48 h in HEK 293-Zellen coexprimiert, um eventuell gebildete Proteinkomplexe im Proteinextrakt der Zellen nachzuweisen.

Bei der Coimmunpräzipitation wird dem Proteinextrakt zunächst ein Antikörper, das gegen eines der beiden Proteine gerichtet ist, zugegeben. Dieser Antikörper bindet an sein Antigen, welches frei oder mit anderen Proteinen assoziiert vorliegen kann. Die Antikörper-Antigenkomplexe werden durch das aus Bakterien gewonnene Protein A detektiert, welches mit hoher Affinität an Immunglobuline bindet. Die Kopplung von Protein A an eine Sepharosematrix ermöglicht die Präzipitation der gebundenen Proteine bzw. Proteinkomplexe. In einem zweiten Schritt werden die präzipitierten Proteine mittels *Western Blot* untersucht. Die Interaktion der zwei zu untersuchenden Proteine kann hierbei durch Verwendung eines zweiten Antikörpers, der gegen den potenziellen Interaktionspartner des ersten Proteins gerichtet ist, nachgewiesen werden.

Um unspezifische Protein A-bindende Bestandteile aus dem Proteinextrakt zu entfernen, wurde die Probe (125 µl) zunächst über Nacht mit 20 µl Protein A-Sepharosesuspension (Amersham, Freiburg) präinkubiert. Die Inkubations- und Waschschrte wurden durch eine über Kopf-Rotation der Reaktionsgefäße (1,5 ml-Eppendorf-Gefäße) bei 4°C durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Protein A-Sepharose durch einen Zentrifugationsschritt (1 min bei 200 g) entfernt und der Überstand für 4 h mit 2 µl des ersten Antikörpers (1 µg/µl) inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein A-Sepharosesuspension wurde der Ansatz für weitere 2 h inkubiert. Die Protein A-Sepharose und die daran gebundenen Antikörper-Proteinkomplexe wurden anschließend durch Waschschrte (Zentrifugation für 1 min bei 200 g und anschließende Resuspension des Sepharosepellets durch über Kopf-Rotation für 3 min) von ungebundenen Proteinen befreit. Dazu wurde das Sepharosediment zweimal in 1 ml TSAT-Puffer, dann in 1 ml TSA-Puffer und in 1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 resuspendiert und schließlich in 30 µl Laemmli-Ladepuffer aufgenommen. Um die Proteine von der Sepharose zu trennen, wurde der Ansatz für 5 min gekocht, durch Vortexen gemischt und für 30 s bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot*, wie unter 2.3.5 und 2.3.6 beschrieben, analysiert.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Verwendete Zelllinien**

Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden HEK 293- sowie INS-1-Zellen verwendet. Die HEK 293-Zelllinie wurde aus der Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen mit Adenovirus 5-DNA etabliert (ATCC CRL-1573; Graham *et al.*, 1977). Die INS-1-Zelllinie stammt aus einem durch Röntgenstrahlung induzierten Insulinom der Ratte (Asfari *et al.*, 1992).

### 2.4.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre. Als Nährmedien wurden DMEM (Cambrex, Belgien) und RPMI-1640 (Gibco-BRL, Karlsruhe) verwendet. Die Kultivierung von HEK 293-Zellen erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle PAN, Aidenbach). Die INS-1-Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES (pH 7,4; PAA, Cölbe) sowie 1 mM Natriumpyruvat (Gibco-BRL, Karlsruhe) kultiviert. Bei etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen zur Passagierung mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (PAN, Aidenbach) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, im Verhältnis 1:3 bis 1:10 mit Medium verdünnt und erneut in frischem Medium ausplattiert.

Die Kultivierung von isolierten Langerhans'schen Inseln erfolgte in glukosefreiem RPMI-Medium (Sigma, München), dem eine gewünschte Menge Glukose (Sigma, München) zugesetzt wurde. Darüber hinaus enthielt das Medium 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

### 2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 5-10 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 10 min bei Raumtemp./350 g zentrifugiert und das Pellet in Vollmedium mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt, für einige Tage bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei 37°C inkubiert und in 10 ml Vollmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei Raumtemp./350 g) wurden die Zellen in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausplattiert.

### 2.4.4 Transiente Transfektion von Zellen

Transiente Transfektionen von Zellen wurden mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die zu transfizierenden Zellen wurden in der Regel in 10 cm-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Spätestens am Tag vor der Transfektion wurde das normale Zellkulturmedium durch Vollmedium ohne Antibiotika ersetzt. Die Plasmid-DNA (24 µg) wurde mit OptiMEM (Gibco-BRL, Karlsruhe) auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt. In einem zweiten Ansatz wurden 60 µl Lipofectamin mit 1440 µl OptiMEM vermischt und anschließend beide Ansätze für 5 min bei Raumtemp. inkubiert. Die Lösungen wurden

vereint, für weitere 20 min bei Raumtemp. inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das Zellkulturgefäß wurde dabei vorsichtig geschwenkt. Die Analyse der Zellen erfolgte 24-48 h nach der Transfektion.

Pankreatische Betazellen, die vor dem Insulinsekretionstest transfiziert werden sollten, wurden in 24-Loch-Platten kultiviert ( $2-3 \times 10^5$  Zellen pro Gefäß). Für die Transfektion wurden entsprechend der Zellzahl 0,8 µg DNA und 2 µl Lipofectamin eingesetzt, zuvor wurden beide Komponenten mit OptiMEM auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. 4 h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Vollmedium ersetzt. Der Insulinsekretionstest wurde 3 Tage nach der Transfektion durchgeführt.

#### **2.4.5 Stabile Transfektion von Zellen**

Die Generierung stabil transfizierter Zellklone erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und in DMEM- bzw. RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren (10 min bei Raumtemp./350 g) wurden die Zellen dreimal mit DMEM- bzw. RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen (jeweils resuspendiert und zentrifugiert) und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen/700 µl Medium eingestellt. Für die Transfektion wurde die linearisierte Plasmid-DNA (10 µg) mit PBS auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, mit 700 µl Zellsuspension vermischt und in Elektroporationsküvetten (4 mm Elektrodenabstand; Biorad, München) überführt. Die Transfektion erfolgte mit einem Elektroporationsgerät (Gene Pulser; Biorad, München) bei 960 µF und 350 V (HEK 293) bzw. 240 V (INS-1). Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen und auf 10 cm-Kulturschalen ausplattiert.

Die Selektion der HEK 293-Klone erfolgte zwei Tage nach der Transfektion mit 1 mg/ml Neomycin. Die Selektionsbedingungen wurden bis zum ersten Einfrieren der Zellen aufrechterhalten. Die INS-1-Klone wurden direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop anhand der EGFP-Fluoreszenz selektioniert. Makroskopisch sichtbare Klone wurden mit einer Pipette von der Zellkulturschale in 24-Loch-Platten überführt und anschließend weiter expandiert.

#### **2.4.6 Transfektion von Zellen mit siRNA**

Zur Herunterregulation (*Knock down*) eines gewünschten Gens wurden die Zellen mit der für das Gen spezifischen siRNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit *Lipofectamine 2000* und *PLUS Reagent* (Invitrogen, Karlsruhe). In der Regel wurden die Zellen in T25-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Am Tag vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch Vollmedium ohne Antibiotika ersetzt.

Die siRNA (400 pmol) wurde mit OptiMEM auf ein Volumen von 420  $\mu$ l aufgefüllt und mit 80  $\mu$ l PLUS-Reagenz vermischt. In einem zweiten Ansatz wurden 20  $\mu$ l Lipofectamin mit 480  $\mu$ l OptiMEM vermischt und beide Ansätze für 15 min bei Raumtemp. inkubiert. Danach wurden die Ansätze vereint, für weitere 15 min bei Raumtemp. inkubiert und anschließend mit OptiMEM auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden zweimal mit OptiMEM gewaschen und mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde das Medium durch frisches Vollmedium ohne Antibiotika ersetzt. 24 h nach Transfektion wurde die RNA isoliert und der *Knock down*-Effekt untersucht.

#### **2.4.7 Fixierung von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen in 10 cm-Kulturschalen bis zu der gewünschten Dichte kultiviert. Zum Fixieren wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit PBS/4 % Paraformaldehyd überschichtet und 30 min bei Raumtemp. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit den Zellen auf der Unterseite vorsichtig auf Objektträger, die mit einem kleinen Tropfen PBS versehen waren, übertragen. Die Deckgläschen wurden mit Fixogum abgedichtet und die Proben für 30 min bei Raumtemp. getrocknet. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte noch am gleichen Tag mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP2; Leica, Wetzlar).

#### **2.4.8 Fixierung und Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 4 ml PBS resuspendiert. Nach der Überführung in Rundbodenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Proben für 4 min bei Raumtemp./350 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 3 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und durch Vortexen in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Zum Fixieren wurde die Zellsuspension mit 800  $\mu$ l eiskaltem Methanol versetzt und durch Vortexen vermischt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Für die PI-Färbung wurden die fixierten Zellen 4 min bei Raumtemp./350 g zentrifugiert und das Pellet mit 3 ml PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen durch Vortexen in 1 ml PI-Färbelösung (PBS/25  $\mu$ g Propidiumiodid/100  $\mu$ g RNase) resuspendiert. Die Analyse und Auswertung der Zellzyklusprofile (je 10 000 Zellen) erfolgte mit dem FACS-Gerät *FACSCalibur* (Becton Dickinson, Heidelberg) und der *CellQuest*-Software.

### 2.4.9 Zellproliferationsassay

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mit einem modifizierten Methylenblau-Assay (Oliver *et al.*, 1989) Dazu wurden  $4 \times 10^4$  Zellen für 80 h in 24-Loch-Platten kultiviert. Die Zellen wurden in gewünschten Zeitabständen mit 800  $\mu$ l PBS gewaschen und mit 200  $\mu$ l eines eiskalten Gemisches aus Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Die fixierten Zellen wurden kurz luftgetrocknet und dann für 30 min mit 200  $\mu$ l Methylenblau (1 % Methylenblau in 10 mM TBE, pH 8,5) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen viermal mit 1 ml 10 mM TBE pH 8,5 gewaschen und die Färbelösung schließlich durch Zugabe von 1 ml eines sauren Gemisches aus Ethanol/0,1 M HCl (1:1) eluiert. Die relative Zellzahl wurde photometrisch bei 650 nm ermittelt.

### 2.4.10 Insulinsekretionstest mit pankreatischen Betazellen

Die Insulinsekretion der Betazellen wurde nach Stimulation mit 15 mM Glukose bzw. nach Zugabe von 30 mM Kalium untersucht. Kalium wurde als KCl in den verwendeten Inkubationspuffer hinzugefügt (HBSS+K<sup>+</sup>); um die Ionenkonzentration des Puffers nicht zu verändern, wurde dabei die NaCl-Konzentration entsprechend verringert. Während die glukosestimulierte Insulinsekretion durch Diazoxid, einem K<sub>ATP</sub>-Kanalöffner, inhibiert werden kann, wird die kaliumstimulierte Sekretion nicht durch Diazoxid beeinflusst (siehe hierzu auch Kapitel 4.7). Die Insulinbestimmung erfolgte nach einer Stimulationszeit von 2 h mittels ELISA.

4-5 Tage vor dem Insulinsekretionstest wurden  $2-3 \times 10^5$  Zellen in 24-Loch-Platten überführt. Am Tag vor dem Test wurde das Vollmedium (mit 11,1 mM Glukose) durch Medium mit 5 mM Glukose ersetzt. Die Zellen wurden nach 18 h mit 500  $\mu$ l HBSS/0,2 % BSA/3 mM Glukose gewaschen und für 2 h in 500  $\mu$ l HBSS/0,2 % BSA/3 mM präinkubiert. Für die Insulinsekretionsanalyse wurden die Zellen für 2 h in folgenden Lösungen (500  $\mu$ l) inkubiert:

- 1.) HBSS/0,2 % BSA/3 mM Glukose (Sigma, München)
- 2.) HBSS/0,2 % BSA/3 mM Glukose/250  $\mu$ M Diazoxid (Sigma, München)
- 3.) HBSS/0,2 % BSA/15 mM Glukose
- 4.) HBSS/0,2 % BSA/15 mM Glukose/250  $\mu$ M Diazoxid
- 5.) HBSS+K<sup>+</sup>/0,2 % BSA/3 mM Glukose
- 6.) HBSS+K<sup>+</sup>/0,2 % BSA/3 mM Glukose/250  $\mu$ M Diazoxid
- 7.) HBSS+K<sup>+</sup>/0,2 % BSA/15 mM Glukose
- 8.) HBSS+K<sup>+</sup>/0,2 % BSA/15 mM Glukose/250  $\mu$ M Diazoxid

Die Überstände mit dem sezernierten Insulin wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 10 min bei 4°C/1000 g zentrifugiert. 400 µl der Proben wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse mittels ELISA (siehe Kapitel 2.3.7) bei –20°C aufbewahrt.

## **2.5 Histologische Methoden**

### **2.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten**

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Organe nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C aufbewahrt. Die Fixierung der Organe erfolgte mit Einbettmedium (Sakura, Heppenheim). Mit Hilfe eines Kryotoms (Kryostat 1720 digital; Leica, Wetzlar) wurden 7 µm dicke Serienschnitte bei –25°C angefertigt, die anschließend auf beschichtete Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen wurden und bis zur weiteren Bearbeitung bei –20°C aufbewahrt wurden.

### **2.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Organe nach der Präparation in gepuffertes Formalin (4 % Formaldehyd in Phosphatpuffer) gegeben und über Nacht bei Raumtemp. fixiert. Am folgenden Tag wurden die Proben mit Leitungswasser abgespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (zweimal 50 %; 70 %; 80 %; dreimal 96 %; dreimal 100 %; bis zu 1 h pro Schritt) dehydriert. Zum Entfernen des Ethanol wurden die Proben in Xylol (dreimal 1 h) inkubiert. Das Xylol wurde schließlich durch flüssiges Paraffin ersetzt (zweimal 1h; einmal über Nacht; 60°C). Am folgenden Tag wurden mit Hilfe einer Paraffin-Ausgießstation (EG1140H; Leica, Wetzlar) Paraffinblöcke um die aufgearbeiteten Organe herum gegossen und nach dem Aushärten mit einem Rotationsmikrotom (RM2165; Leica, Wetzlar) 4 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die auf Objektträger übertragen wurden.

Vor einer Färbung wurden die Präparate entparaffiniert. Die Objektträger wurden dazu hochkant für 1 h bei 60°C inkubiert, so dass das verflüssigte Paraffin aus den Gewebeschnitten herauslaufen konnte. Nach drei Xylolschritten (je 5 min bei Raumtemp.) wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 100 %; 96 %; 70 %; 50 %; je 5 min) rehydriert und mit H<sub>2</sub>O abgespült.

### **2.5.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Gewebeschnitten**

Die HE-Färbung erfolgte mit Accustain (Sigma, München) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellkerne durch Hämatoxylin blau-violett und die zytoplasmatischen Bestandteile durch Eosin rosa bis rot gefärbt. Nach der Färbung wurden die Präparate in einer

aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (50 %; 70 %; zweimal 96 %; dreimal 100 %; je 5 min) und nach drei Xylolschritten (je 5 min) mit Entellan (Merck, München) eingedeckelt.

#### **2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min in 100 µl Blockinglösung (PBS/10 % Ziegen Serum) inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:50 in PBS/0,25 % BSA/0,3 % Triton X-100) für 1 h bei Raumtemp. Nach drei Waschschriften in PBS (je 5 min) wurde der Zweitantikörper (1:200 in PBS/0,25 % BSA/0,3 % Triton X-100) auf die Schnitte gegeben und die Objektträger für 45 min in eine dunkle und feuchte Kammer gelegt. Nach drei Waschschriften mit PBS (je 5 min) wurden die Schnitte mit DAPI/Antifade (Qbiogene, Heidelberg) eingedeckelt und die Färbungen mit einem Fluoreszenzmikroskop (DMRBE; Leica, Wetzlar) ausgewertet.

### **2.6 Arbeiten mit Mäusen**

#### **2.6.1 Geschmackstest (*Two-bottle preference-Assay*)**

Die Geschmackspräferenz der Versuchstiere wurde mit Hilfe des *Two-bottle preference-Assays* (kurz: *Two-bottle test*) untersucht. Der Versuch wurde durch Verlängerung der Versuchszeit von 48 h auf 96 h (nach Tordoff und Bachmanov, 2002) modifiziert.

Für den Geschmackstest wurden die Mäuse für zehn Tage an zwei Trinkflaschen mit Wasser gewöhnt. Anschließend wurde eine der Flaschen mit der zu testenden Lösung gefüllt, die zweite enthielt weiterhin Wasser. Die Flaschen wurden gewogen und dann zusammen für 96 h in den Mauskäfig gegeben, wobei die Positionen der Flaschen nach 48 h getauscht wurden. Nach dem Versuch wurden die Flaschen erneut gewogen, um die getrunkene Menge zu ermitteln. Zur Auswertung des Geschmackstests wurde das Verhältnis der getrunkenen Testlösung zur getrunkenen Gesamtmenge berechnet. Die Mäuse, die einzeln getestet wurden, erhielten zwischen verschiedenen Geschmackstoffen für mindestens zwei Tage reines Wasser.

Für die Geschmacksrichtung süß wurde Acesulfam K (Omikron, Neckarwestheim), für bitter Denatoniumbenzoat (Sigma, München) und für *umami* L-Alanin (Fluka, Taufkirchen) verwendet. Um geeignete Konzentrationen für die Testlösungen zu ermitteln, wurde das Trinkverhalten von wildtypischen C57BL/6-Mäusen untersucht; hierbei wurden die Lösungen in aufsteigender Konzentration getestet, bis ein verändertes Trinkverhalten (Präferenz oder Aversion gegenüber der Testlösung) zu verzeichnen war. Die ermittelten Konzentrationen der Testlösungen waren: 20 mM Acesulfam K, 5 mM Denatoniumbenzoat und 30 mM L-Alanin.



### 2.6.2 Glukosetoleranztest

Für den Glukosetoleranztest wurde den Mäusen über Nacht (für ca. 20 h) das Futter entzogen. Am nächsten Tag wurde den Tieren intraperitoneal 2 g Glukose (Sigma, München) pro kg Körpergewicht injiziert. Die Glukose wurde dazu in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gelöst und die Lösung so verdünnt, dass die injizierte Menge ca. 300  $\mu\text{l}$  umfasste. Kurz vor der Glukoseinjektion sowie 20, 60 und 120 min nach der Injektion wurde den Mäusen mit Hilfe einer Rasierklinge eine Blutprobe aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte mit einem Glukometer (Accu-Chek Comfort; Roche, Mannheim).

### 2.6.3 Insulintoleranztest

Um die Insulintoleranz zu testen, wurde den Mäusen intraperitoneal 0,75 U Insulin pro kg Körpergewicht injiziert. Dazu wurde das Insulin (Humalog; Lilly, Bad Homburg) mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  auf ein Injektionsvolumen von ca. 300  $\mu\text{l}$  verdünnt. Kurz vor dem Versuch sowie 15, 30 und 60 min nach der Insulininjektion wurde aus der Schwanzvene eine Blutprobe entnommen und der Blutzucker mit einem Glukometer bestimmt.

### 2.6.4 Präparation von Langerhans'schen Inseln

Die Präparation der Langerhans'schen Inseln aus murinem Pankreasgewebe erfolgte durch einen Collagenaseverdau (modifiziert nach Arkhammar *et al.*, 1998 sowie Shewade *et al.*, 1999). Dazu wurde die zu untersuchende Maus durch zervikale Dislokation getötet und das Pankreas zügig präpariert. Das Gewebe wurde dreimal mit HBBS/1 % BSA/3 mM Glukose gewaschen, mit einem Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten und in ein 50 ml-Falcon-Gefäß mit 2,5 ml auf 37°C vorgewärmter Collagenase-Lösung gegeben. Die Collagenase-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 mg/ml Collagenase (Sigma, München)
- 2 mg/ml Soybean trypsin inhibitor (Sigma, München)
- in HBBS/1 % BSA/3 mM Glukose

Der Collagenaseverdau erfolgte in einem Schüttelinkubator (Certomat S/R; B.Braun, Melsungen) für 35 min bei 37°C/250 Upm. Um die Inseln optimal von dem restlichen Gewebe zu trennen, wurde das Gefäß zusätzlich alle 7 min vorsichtig von Hand über Kopf geschüttelt. Nach dem Verdau wurde die Collagenase inaktiviert und die vereinzelt Inseln von Gewebetrümmern befreit. Dazu wurde der Ansatz mit HBBS/1 % BSA/3 mM Glukose auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt, vorsichtig über Kopf geschüttelt und anschließend für 2 min bei 20°C/1000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml HBBS/1 % BSA/3 mM

Glukose aufgenommen, der Ansatz vorsichtig geschüttelt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 30 ml vorgewärmtem Vollmedium (RPMI mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 3 mM Glukose) resuspendiert und der Ansatz auf vier 10 cm-Kulturschalen verteilt. Die vereinzelt Inseln wurden unter einem Stereomikroskop mit einer Pipette entnommen und in eine weitere Kulturschale mit Vollmedium übertragen (erster Waschschrift). Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Inseln in 24-Loch-Platten mit Transwell-Einsätzen überführt (jeweils zehn Inseln pro Gefäß) und im Zellkulturinkubator kultiviert.

### **2.6.5 Insulinsekretionstest mit isolierten Langerhans'schen Inseln**

Im Insulinsekretionstest wurde die Sekretionskinetik der murinen Langerhans'schen Inseln untersucht. Als Grundlage für die Versuchsanordnung diente dabei eine von Srivastava und Goren beschriebene Methode (Srivastava und Goren, 2003), die durch die Inkubation der isolierten Inseln in Transwell-Einsätzen mit Polycarbonatmembranen (3 µm Porendurchmesser; Corning, Wiesbaden) auf 24-Loch-Platten modifiziert wurde. Pro Maus wurden 20 Inseln untersucht, wobei jeweils 10 der Inseln mit 2,8 mM Glukose (Sigma, München) und 10 mit 16,8 mM Glukose behandelt wurden. Mit der niedrigen Glukosekonzentration (2,8 mM) wurde die basale Insulinsekretion der Inseln untersucht, während mit 16,8 mM Glukose eine starke Insulinsekretion angeregt wurde.

Am Tag nach der Präparation wurden die Langerhans'schen Inseln mit 1150 µl KRB/0,1 % BSA/2,8 mM Glukose gewaschen und für 30 Minuten in 700 µl KRB/0,1 % BSA/2,8 mM Glukose bei 37°C (im Zellkulturinkubator) präinkubiert. Anschließend wurden die Inseln in 700 µl KRB/0,1 % BSA/2,8 mM Glukose bzw. 16,8 mM Glukose auf einem Schüttler bei Raumtemp. inkubiert. Um die Insulinsekretion zu untersuchen, wurden nach 1, 2, 5, 10 und 30 min 30 µl der Überstände entnommen und bis zur Insulinbestimmung mittels ELISA (siehe Kapitel 2.3.7) bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Gesamtinsulinmenge wurden die restlichen Überstände entfernt und die Inseln in 1,2 ml eiskaltem saurem Ethanol (Ethanol/HCl/H<sub>2</sub>O, 150:3:147) resuspendiert. Die Kulturplatten wurden mit Parafilm umschlossen und die Proben über Nacht bei -20°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Überstände in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und durch Zentrifugieren (15 min bei 4°C/3000 g) von den Zelltrümmern getrennt. Die Überstände wurden bis zur Insulinbestimmung mittels ELISA bei -20°C aufbewahrt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 TRPM5-Expressionsanalysen

Die Gewebespezifität der *TRPM5*-Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Initiale Expressionsanalysen, die in unserem Labor von Dr. D. Prawitt und Dr. T. Enklaar durchgeführt wurden, beruhen vor allem auf *Northern Blot*- und RT-PCR-Analysen verschiedener adulter und fötaler Gewebe. Sie deuten sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf ein sehr breites Expressionsmuster hin (Enklaar *et al.*, 2000; Prawitt *et al.*, 2000). Eine zweite Arbeitsgruppe konnte jedoch in der Maus eine weitaus spezifischere Expression nachweisen, die sich hauptsächlich auf Geschmackssinneszellen, Dünndarm und Magen beschränkt und lediglich im geringeren Maße auch in Uterus und Hoden nachweisbar ist (Pérez *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003). Da diese Daten ebenfalls auf *Northern Blot*-Analysen beruhen, ist die Unstimmigkeit der Ergebnisse schwer zu erklären. Um das Expressionsmuster von *TRPM5* zu verifizieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst verschiedene unserem Labor zur Verfügung stehende Zelllinien und Mausgewebe mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Für die Ausweitung der Expressionsstudie auf Proteinebene sollte ein *TRPM5*-spezifischer Antikörper etabliert werden, der eine *Western Blot*-Analyse der als positiv getesteten Zelllinien und Gewebe ermöglicht (siehe Kapitel 3.3). Um die Interaktion von *TRPM5* mit *TRPM4*, dem nächstverwandten TRP-Protein zu untersuchen (siehe Kapitel 3.7), wurde in den zur Verfügung stehenden Zelllinien auch die Expression von *TRPM4* untersucht.

#### 3.1.1 TRPM5-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die *TRPM5*-Expression wurde zunächst in verschiedenen humanen, murinen und Rattenzelllinien untersucht. Die Zelllinien A7r5, CATH.a, MIN6, PC12, Ramos, RBL-2H3, RINm5F und U937 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof. R. Penner (Universität Hawaii, USA), die Zelllinie A20.2J von der Arbeitsgruppe Prof. A. Reske-Kunz (Dermatologie, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, DNaseI-verdaut und mittels RT-PCR untersucht. Eine *TRPM5*-Expression konnte in B-Zellen des Immunsystems (A20.2J, Ramos), neuronalen Zellen (CATH.a), Epithelzellen (HeLa) sowie pankreatischen Betazellen (MIN6, INS-1, RINm5F) detektiert werden. *TRPM4* konnte – Ramos-Zellen ausgenommen – in allen *TRPM5*-positiven Zelllinien nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 3.1: TRPM5- und TRPM4-Expression in verschiedenen Zelllinien.**

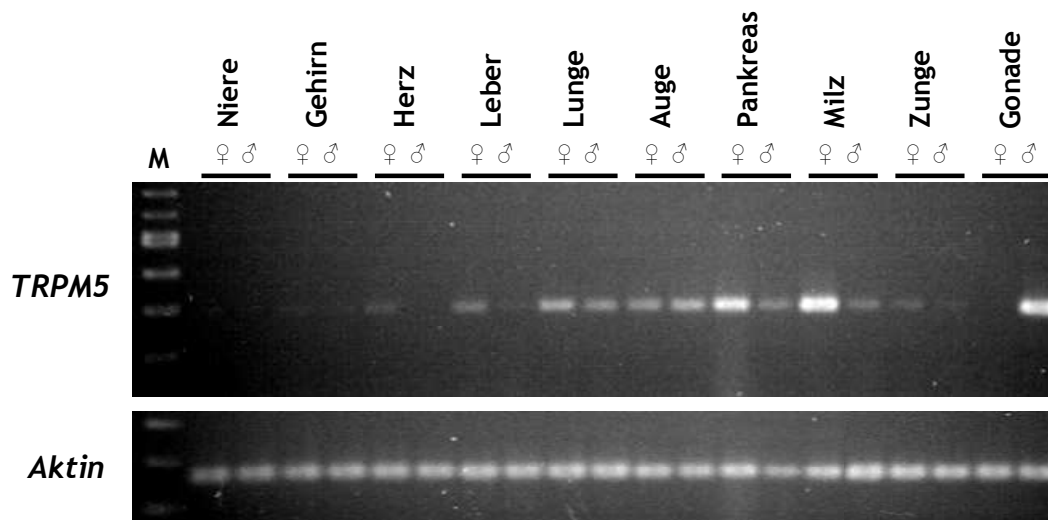
Insgesamt 15 humane, murine und Rattenzelllinien wurden mittels RT-PCR auf die Expression von *TRPM5* und *TRPM4* untersucht. Die in cDNA umgeschriebenen Transkripte wurden mit den Oligonukleotiden TRPM5-F17/R21 und TRPM4-F/R (humane Zellen) sowie *Trpm5*-20F/22R und *Trpm4*-F/R (murine und Rattenzellen) nachgewiesen. + = Expression, – = keine Expression. Teilweise veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

Zelllinie	Beschreibung	Organismus	TRPM5	TRPM4
A20.2J	B-Zelllinie	Maus	+	+
Ramos	B-Zelllinie	Mensch	+	–
Jurkat	T-Zelllinie	Mensch	–	+
U937	monozytäre Zelllinie	Mensch	–	+
RBL-2H3	Mastzelllinie	Ratte	–	–
CATH.a	neuronale Zelllinie	Maus	+	+
INS-1	pankreatische Betazelllinie	Ratte	+	+
MIN6	pankreatische Betazelllinie	Maus	+	+
RINm5F	pankreatische Betazelllinie	Ratte	+	+
A7r5	Gefäßmuskelzelllinie	Ratte	–	+
HEK 293	Nierenepithelzelllinie	Mensch	–	–
HeLa	Zervixkarzinomzelllinie	Mensch	+	+
PC12	Phäochromozytomzelllinie	Ratte	–	+
G401	Wilmstumorzelllinie	Mensch	–	–
WT128	Wilmstumorzelllinie	Mensch	–	+

### 3.1.2 *Trpm5*-Expression in verschiedenen Mausgeweben

Für die *Trpm5*-Expressionsanalyse in verschiedenen Mausgeweben wurden zwei sechs Monate alte C57BL/6-Mäuse, ein Männchen und ein Weibchen, untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Niere, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Auge, Pankreas, Milz, Zunge und Gonade isoliert. Nach dem DNaseI-Verdau der RNA wurde eine semiquantitative RT-PCR mit verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt.

Eine starke *Trpm5*-Expression konnte in Lunge, Auge, Pankreas, Milz und Hoden beobachtet werden, während Herz, Leber und Zunge eine schwächere Expression aufwiesen (Abbildung 3.1). Schon nach 25 Amplifikationszyklen waren deutliche Banden in der Milz des Weibchens und in der Gonade des Männchens zu erkennen (Daten nicht gezeigt). In Niere und Gehirn waren dagegen die *Trpm5*-spezifischen Signale auch nach 35 Zyklen sehr schwach.



**Abbildung 3.1: Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *Trpm5*-Expression in verschiedenen Mausgeweben.**

Die *Trpm5*-Expression wurde in Niere, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Auge, Pankreas, Milz, Zunge und Gonade zweier sechs Monate alten C57BL/6-Mäuse (Männchen und Weibchen) untersucht. Die abgebildete RT-PCR mit den Oligonukleotiden *Trpm5*-20F/20R wurde mit 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Aktinkontrolle mit den Oligonukleotiden Maus-Aktin-F/R erfolgte mit 25 Amplifikationszyklen. M = 100 bp-Marker.

### 3.2 *TRPM5*-überexprimierende HEK 293-Zelllinie

Das *TRPM5*-Gen liegt in der humanen Chromosomenregion 11p15.5, die mit tumorassoziierten Erkrankungen, wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), einem frühkindlichen Überwuchersyndrom, gekoppelt ist (Prawitt *et al.*, 2000). Um die Beteiligung von *TRPM5* an dem komplexen BWS-Phänotyp zu untersuchen, sollte zunächst mit Hilfe einer *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie herausgefunden werden, ob *TRPM5* wachstumsfördernde oder -hemmende Eigenschaften besitzt. Darüber hinaus sollten in diesen Zellen die charakteristischen Eigenschaften des *TRPM5*-Kanals, unter anderem der Aktivierungsmechanismus, untersucht werden.

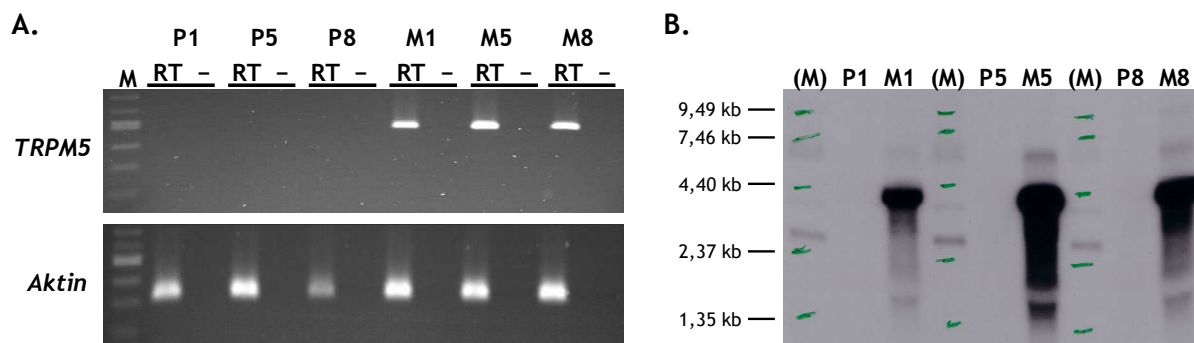
#### 3.2.1 Generierung einer *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie

Zur Generierung der *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie wurden HEK 293-Zellen gewählt. HEK (*human embryonic kidney*) 293-Zellen sind humane Nierenepithelzellen, die sich einfach kultivieren und transfizieren lassen und häufig für funktionelle Untersuchungen von TRP-Kanälen und anderen Ionenkanälen verwendet werden. In der HEK 293-Zelllinie konnte mittels RT-PCR keine endogene *TRPM5*-Expression nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.1).

Die cDNA der langen *TRPM5*-Spleißvariante des Menschen, *TRPM5*-long, wurde in unserem Labor von Dr. D. Prawitt isoliert und nach mehreren Klonierungsschritten über die

Schnittstellen XhoI und XbaI in das Plasmid pcDNA3 der Firma Invitrogen eingefügt. Zum Überprüfen des Konstruktes wurden zunächst die cDNA und die Übergänge in das Plasmid vollständig sequenziert. Das Konstrukt wurde dann mit dem Restriktionsenzym PvuI linearisiert und in die Transfektion der HEK 293-Zellen mittels Elektroporation eingesetzt. Die Generierung der Kontrollzelllinie erfolgte auf die gleiche Weise mit dem leeren pcDNA3-Vektor.

Nach der Neomycinselektion wurden drei mit pcDNA3-TRPM5 transfizierte Klone sowie drei Kontrollklone mittels semiquantitativer RT-PCR und *Northern Blot* analysiert. In allen drei pcDNA3-TRPM5-Klonen konnte eine starke *TRPM5*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Für weitere Versuche wurden die Klone M1 (pcDNA3-TRPM5) und P1 (pcDNA3) gewählt.



**Abbildung 3.2: Nachweis der *TRPM5*-Überexpression in HEK 293-Klonen mittels RT-PCR und *Northern Blot*.**

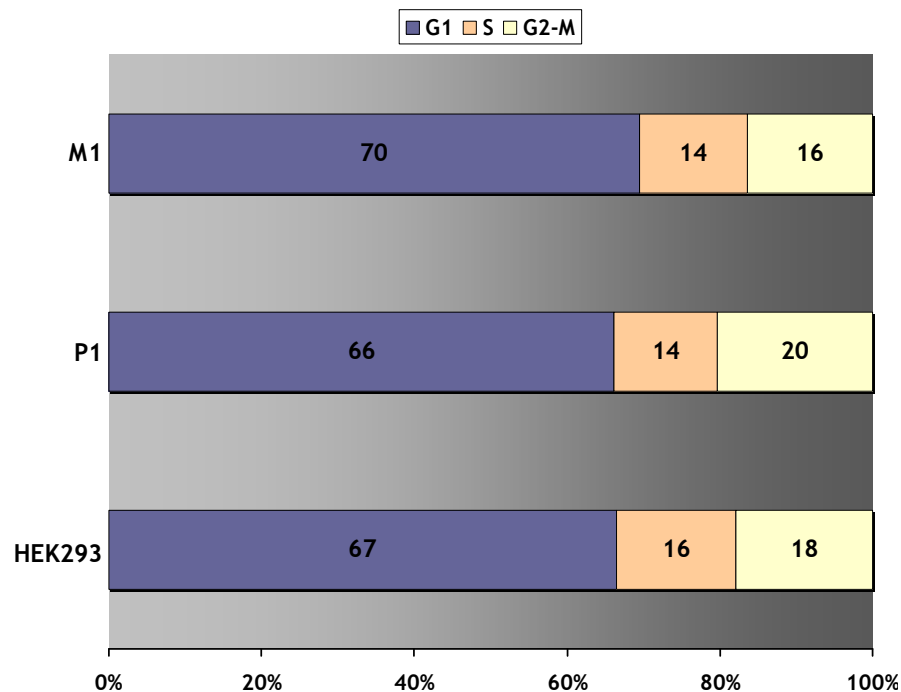
Die Überexpression von *TRPM5* wurde in den Klonen M1, M5 und M8 mittels RT-PCR und *Northern Blot* untersucht. Die Kontrollklone P1, P5 und P8 enthielten das pcDNA3-Leerplasmid. **A.** Die RT-PCRs mit den Oligonukleotiden TRPM5-F17/R21 und Aktin-F/R wurden mit 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. RT = RT-Ansatz, - = Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase, M = 100 bp-Marker. **B.** Im *Northern Blot* wurden 20 µg der Gesamt-RNAs untersucht. Als Sonde wurde ein mit dem TRPM5-spezifischen Oligonukleotidpaar TRPM5-F17/-R21 generiertes, radioaktiv markiertes PCR-Produkt verwendet. M = 0,24-9,5 kb RNA ladder. Teilweise veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

### 3.2.2 Charakterisierung der *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie M1

#### 3.2.2.1 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden Zellen der *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie M1, der Kontrollzelllinie P1 sowie untransfizierte HEK 293-Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Mittels FACS (*fluorescence activated cell sorter*) wurden 10 000 Zellen gezählt und die Fluoreszenz, die durch die Interkalation von Propidiumiodid in die doppelsträngige DNA hervorgerufen wird, analysiert. Anhand der Fluoreszenzintensität kann unterschieden werden, ob sich eine Zelle im Zellzyklus in der G1-, S- oder G2-Phase befindet. Zur Auswertung der

Daten und Erstellung der Zellzyklusprofile wurde das *CellQuest*-Programm verwendet. Zwischen den Zelllinien waren keine signifikanten Unterschiede in den Zellzyklusphasen zu erkennen (Abbildung 3.3).

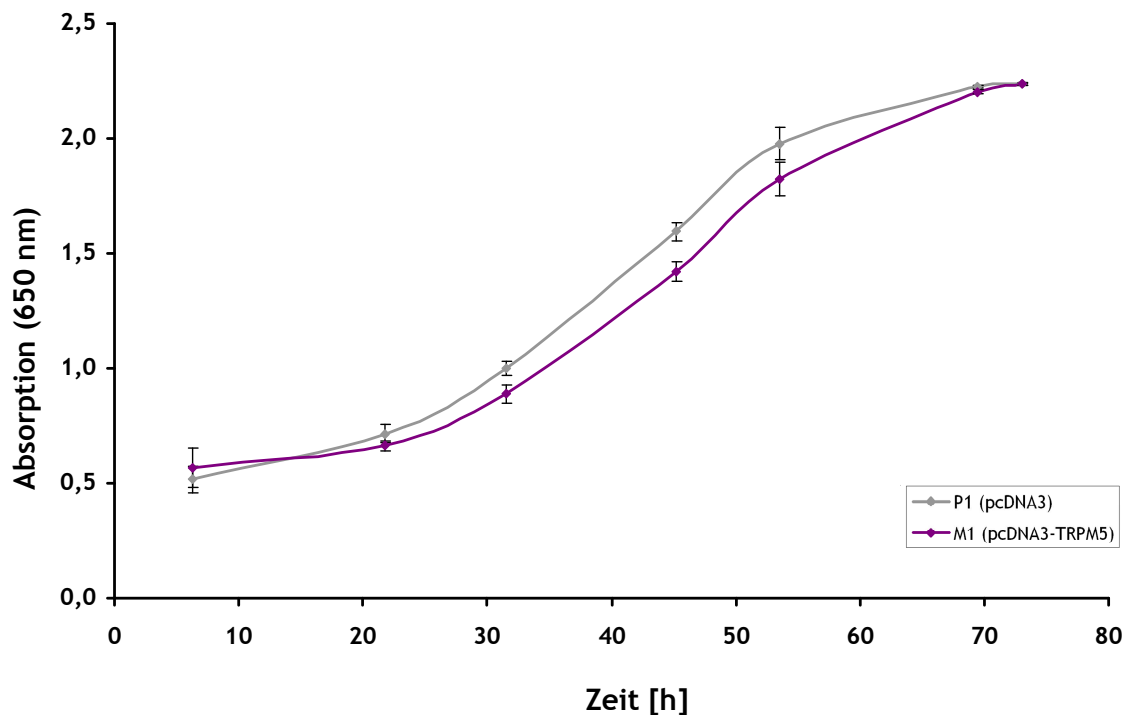


**Abbildung 3.3: Zellzyklusanalyse der *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie M1.**

Für die Zellzyklusanalyse wurde der DNA-Gehalt in 10 000 Propidiumiodid-gefärbten Zellen der Zelllinien M1 und P1 sowie in untransfizierten HEK 293-Zellen mittels FACS bestimmt. Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Zellzyklusprofile erfolgten mit der *CellQuest*-Software. Dargestellt sind die relativen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen. M1 = *TRPM5*-überexprimierende Zelllinie, P1 = Kontrollzelllinie mit dem pcDNA3-Leerplasmid.

### 3.2.2.2 Zellproliferationsanalyse

Um die Proliferation der Zelllinien M1 und P1 zu vergleichen, wurden jeweils  $4 \times 10^4$  Zellen über 80 Stunden in 24-Loch-Platten kultiviert. Die Zellen wurden in geeigneten Zeitabständen fixiert und mit einer Methylenblau-Färbelösung gefärbt. Über die Absorption der eluierten Färbelösung bei 650 nm konnte die relative Zellzahl ermittelt werden. Die *TRPM5*-überexprimierende Zelllinie M1 zeigte im Vergleich zur Kontrollzelllinie P1 keine signifikant erhöhte oder verminderte Proliferation (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Zellproliferationsanalyse der *TRPM5*-überexprimierenden Zelllinie M1.**

Die Zellzahl wurde in geeigneten Zeitabständen mit Hilfe eines modifizierten Methylenblau-Assays photometrisch bei 650 nm ermittelt. Die Proliferation der M1- und P1-Zellen wurde über 80 Stunden verfolgt (n = 5, Mittelwert ± Standardabweichung). M1 = *TRPM5*-überexprimierende Zelllinie, P1 = Kontrollzelllinie mit dem pcDNA3-Leerplasmid.

### 3.2.2.3 *In vivo*-Untersuchung der tumorigenen Eigenschaften

Die tumorigenen Eigenschaften eines Proteins können durch eine transgene Expression in HEK 293-Zellen untersucht werden. Für die *in vivo*-Untersuchung der transgenen Zellen eignen sich immundefiziente Mäuse, wie Nackt- und SCID-Mäuse (siehe hierzu z. B. Scherpereel *et al.*, 2003). Nacktmäuse besitzen eine homozygote *whn*-Mutation, die zur Unterbrechung des normalen Haarwuchses und der Thymusentwicklung führt. Die Immundefizienz wird in diesen Mäusen vorwiegend durch einen T-Zell-Mangel verursacht (Nehls *et al.*, 1994). Die SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse leiden an einer schweren kombinierten Immundefizienz, die autosomal rezessiv vererbt wird. Diese wird durch einen Mangel an reifen und funktionsfähigen T- und B-Lymphozyten hervorgerufen (Bosma *et al.*, 1983).

Für die Tumorinduktion wurden transgene HEK 293-Zellen subkutan in die immundefizienten Mäuse injiziert und das Tumorwachstum über einen Zeitraum von mehreren Wochen verfolgt. Untransfizierte HEK 293-Zellen erzeugen in diesen Mäusen keine Tumore (Scherpereel *et al.*, 2003). Die Versuchstiere (sechs Nackt- und zwei SCID-Mäuse) wurden in einem Alter von acht Wochen an beiden Flanken mit jeweils  $5 \times 10^6$  *TRPM5*-



überexprimierenden M1-Zellen injiziert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl von Mäusen mit P1-Zellen injiziert. Auch nach acht Wochen konnte bei keiner der Mäuse eine Tumorentwicklung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Generierung und Testen TRPM5-spezifischer Antikörper

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs TRPM5-spezifische Antikörper getestet. Zwei der Antikörper (TRPM5-1975 und TRPM5-1976) sollten spezifisch für das humane Protein sein, zwei (TRPM5-1909 und TRPM5-TB3) für das murine, und die übrigen zwei (TRPM5-N und TRPM5-C) sollten konservierte Peptidsequenzen detektieren, die sowohl in der humanen als auch in der murinen Variante vorhanden sind.

Für die Generierung der Antikörper TRPM5-1975 und TRPM5-1976 wurden zwei Sequenzabschnitte des humanen Proteins ausgesucht, die für TRPM5 hoch spezifisch sind, um Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen, wie nahe verwandten TRPs, zu vermeiden. In Proteindatenbankvergleichen, die im Internet unter „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>“ mit dem BLAST-Programm durchgeführt wurden, wies keine der beiden gewählten Peptidsequenzen signifikante Homologien zu anderen bekannten Proteinen auf. Die Sequenz 1975 liegt extrazellulär, kurz vor der sechsten Transmembrandomäne und die Sequenz 1976 intrazellulär, am C-terminalen Ende des Proteins (Abbildung 3.5). Auf diesen Sequenzen basierend wurden bei der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) Kaninchen-Antikörper mit Hilfe synthetischer Peptide hergestellt.

Der Antikörper TRPM5-1909 wurde bei der Firma Genosphere Biotechnologies (Paris) hergestellt. Er basiert auf der Zielsequenz eines von Zhang und Mitarbeitern veröffentlichten Antikörpers, der zur Detektion von Trpm5 in Gefrierschnitten des murinen Zungengewebes verwendet wurde (Zhang, Y. *et al.*, 2003). TRPM5-TB3 wurde freundlicherweise von Prof. E. Liman (University of Southern California, USA), TRPM5-N und TRPM5-C von Dr. B. Miller (Milton S. Hershey Medical Center, Pennsylvania) zur Verfügung gestellt.

In der Abbildung 3.5 sind die humane und murine TRPM5-Aminosäuresequenz sowie die Zielsequenzen der verwendeten Antikörper dargestellt.

**Humane TRPM5-Aminosäuresequenz (1165 AA, Protein 131 kDa)**

1 – MQDVQGPRPGSPGDAEDRRELGLHRGEVNFVGGSGKKRKGKFRVVPVSGVAPSVLFDLLLAEW – 60  
 61 – HLPAPNLVSVLVGEEQPFAMKSWLRDVLRLKGLVKAQAQSTGAWILTSALRVGLARHVQAV – 120  
 121 – RDHSLASTSTKVRVVAIGMASLGRVLRHRRILEEAQEDFPVHYPEDDGGSGPLCSLDSNL – 180  
 181 – SHFILVEPGPPGKGDGLTELRLRLEKHISEQRAGYGGTGSIEIPVLCCLLVNGDPNTLERI – 240  
 241 – SRAVEQAA PWLILVSGGGIADVLAALVNQPHLLVPKVAEKQFKEKFPKHFVSWEDIVRWT – 300  
 301 – KLLQNTSHQHLLTVYDFEQEGSEELDTVILKALVKACKSHSQEPQDYDELKLAWAADR – 360  
 361 – VDIKSEIFNGDVEWKSCDLEEVMDALVSNKPEFVRLFVDNGADVADFLTYGRLQELYSR – 420  
 421 – SVSRKSLFLDQLLQKQEEARLTLAGLGTQQAREPPAGPPAFSLHEVSRVLKDFLQDACRG – 480  
 481 – FYQDGRPGDRRAEKGPAPKRPRTGQKWLLEDLNQKSENPRWRDLFLWAVLQNRHEMATYFWAM – 540  
 541 – QEGVAAALAAACKILKEMSHLETEAEAAARATREAKYERLALDLFSECYSNEARAFALLV – 600  
 601 – RRNRCWSKTTCCLHLATEADAKAFFAHGQVAFVLRITRIWWGDMAGTPIILRLLGAFLCPALV – 660  
 661 – YTNLITTFSEEAPLRTGLEDLQDLDSLDTSEKSPLYGLQSRVEELVEAPRAQGRGPRAVFL – 720  
 721 – LTRWRKFWGAPVTVFLGNVVMYFAFLFLFTYVLLVDFRPPPQGPSGPEVTLYFWVFTLVLE – 780  
 781 – EEIRQGFFTDEDTHLVKKFTLYVGDNWNKCDMVAIFLFIIVGVTCRMLPSAFEAGRTVLAM – 840  
 841 – DFMVFTLRLIHFIAIHKQLGPKIIVVERMMKDVFFFLFVLSVWLVAYGVTTQALLPHPDG – 900  
 901 – RLEWIFRRVLYRPLYQIFGQIPLDEIDEARVNCSTHPLLEDSPSCPSLYANWLVILLLV – 960  
 961 – TFLLVTVNLLMNLIIAMFSYTFQVVQGNADMFWKFORYNLIVEYHERPALAPPFILLSHL – 1020  
 1021 – SLTLRRVFKKEAEHKREHLERDLPDLDQKVVTVETVQKENFLSKMEKRRRDSEGEVLRK – 1080  
 1081 – TAHRVDFIAKYLGLREQEKRICKCLDTPINCYSVLVSSVADVLAQGGGPRSSQHCGEQSQ – 1140  
 1141 – LVAADHRGGLDGWEQPGAGQPPSDT

**Murine Trpm5-Aminosäuresequenz (1158 AA, Protein 131 kDa)**

1 – MQTTQSSCPGSPDPDTEGDWEPILCRGEINFGGSGKKRKGKFKVVPSSVAPSVLFELELLTEW – 60  
 61 – HLPAPNLVSVLVGEEERPLAMKSWLRDVLRLKGLVKAQAQSTGAWILTSALHVGLARHVQAV – 120  
 121 – RDHSLASTSTKIRVVAIGMASLDRILHRQLLDGVHQKEDTPIHYPADEGNIQGPLCPLDS – 180  
 181 – NLSHFILVESGALGSGNDGLTELQLSLEKHISQRTGYGGTSCIQIPVLCCLLVNGDPNTL – 240  
 241 – ERISRAVEQAA PWLILAGSGGIADVLAALVSQPHLLVPQVAEKQFREKFPSECFSSWEAIV – 300  
 301 – HWTELLQNIAAHPHLLTVYDFEQEGSEDLDTVILKALVKACKSHSQEAQDYDELKLAVA – 360  
 361 – WDRVDIAKSEIFNGDVEWKSCDLEEVMTDALVSNKPDFVRLFVDSGADMAEFLTYGRLQQ – 420  
 421 – LYHSVSPKSLLFELLQRKHEEGRLTLAGLGAQQARELP IGLPAFSLHEVSRVLKDFLHDA – 480  
 481 – CRGFYQDGRMEERGPPKRPAGQKWLPLSLRKSSEDPRWRDLFLWAVLQNRHEMATYFWAMG – 540  
 541 – REGVAAALAAACKI IKEMSHLEKEAEVARTMREAKYEQLALDLFSECYGNSEDRAFALLVR – 600  
 601 – RNHSWSRTTCCLHLATEADAKAFFAHGQVAFVLRITRIWWGDMATGTPILRLLGAFTCPALIY – 660  
 661 – TNLISFSEDAPQRMDELQEPDSLMEKSFCSRGGQLEKLEAPRAPGDLGPQAFL – 720  
 721 – TRWRKFWGAPVTVFLGNVVMYFAFLFLFTYVLLVDFRPPPQGPSGSEVTLYFWVFTLVLE – 780  
 781 – EIRQGFFTDEDTHLVKKFTLYVEDNWNKCDMVAIFLFIIVGVTCRMLVPSVFEAGRTVLAI – 840  
 841 – FMVFTLRLIHFIAIHKQLGPKIIVVERMMKDVFFFLFVLSVWLVAYGVTTQALLPHPDGR – 900  
 901 – LEWIFRRVLYRPLYQIFGQIPLDEIDEARVNCSTHPLLEDSPSCPSLYANWLVILLV – 960  
 961 – FLLVTVNLLMNLIIAMFSYTFQVVQGNADMFWKFORYNLIVEYHGRPALAPPFILLSHLS – 1020  
 1021 – LVLKQVFRKEAQHKRQHLEERDLPDLDQKIITWETVQKENFLSTMEKRRRDSEGEVLRKT – 1080  
 1081 – AHRVDLIAKYIGGLREQEKRICKLESQANYCMLLLSSMTDTLAPGGTYSSSQNCGRSQP – 1140  
 1141 – ASARDREYLESGLPPSDT

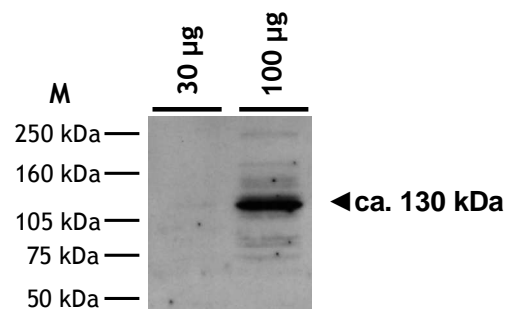
Antikörper	Spezifität	Zielsequenz
TRPM5-1975	human	HPLLEDSPSCPSLYA
TRPM5-1976	human	LDGWEQPGAGQPPSDT
TRPM5-N	human, murin	LVNGDPNTLERISRAVEQAA
TRPM5-C	human, murin	FRVLYRPLYQIFGQIPLDE
TRPM5-1909	murin	PASARDREYLESGLPPS
TRPM5-TB3	murin	KYIGGLREQEKRICKLESQANYCMLLLSSMTDTLA PGGTYSQQNCGRSQPASARDREYLESGLPPSDT

**Abbildung 3.5: Die humane und murine TRPM5-Aminosäuresequenz mit den Zielsequenzen der verwendeten TRPM5-spezifischen Antikörper.**

Die für die TRPs charakteristische TRP-Box ist in schwarz dargestellt. Die Transmembrandomänen (grau unterlegt) wurden mit dem SOSUI-Programm unter der Internetadresse „<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>“ ermittelt. Die Molekulargewichte der Proteine wurden mit der Compute pI/Mw tool-Anwendung unter „<http://www.expasy.org>“ berechnet.

### 3.3.1 Western Blots mit TRPM5-spezifischen Antikörpern

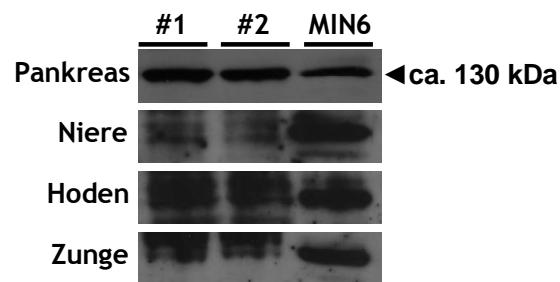
Zunächst wurden die *Western Blot*-Bedingungen für den TRPM5-1909-Antikörper optimiert. Da unserem Labor zu diesem Zeitpunkt kein Expressionsplasmid mit der murinen *Trpm5*-cDNA zur Verfügung stand, wurden Proteinextrakte aus Zelllinien untersucht, die *Trpm5* endogen exprimieren (siehe Kapitel 3.1.1). In verschiedenen Ansätzen wurden sowohl die Antikörperkonzentration als auch die Inkubationsdauer variiert. Darüber hinaus wurden verschiedene Puffersysteme (PBS und TBS) für die Inkubations- und Waschschriffe verwendet. In der Abbildung 3.6 ist ein *Western Blot* mit optimierten Bedingungen dargestellt. Im Proteinextrakt der murinen pankreatischen Betazelllinie MIN6 ist eine deutliche Bande von ca. 130 kDa sichtbar, die der erwarteten Größe des *Trpm5*-Proteins entspricht.



**Abbildung 3.6: Western Blot mit TRPM5-1909 zur Detektion des *Trpm5*-Proteins in MIN6-Zellen.**

Im *Western Blot* wurden 30 und 100 µg der Gesamtproteine aus der murinen Zelllinie MIN6 untersucht. Der TRPM5-1909-Antikörper wurde 1:1000 verdünnt, die Inkubation erfolgte über Nacht. Als Puffer für die Inkubations- und Waschschriffe wurde PBS verwendet. M = *Rainbow Molecular Weight Marker RPN 800*.

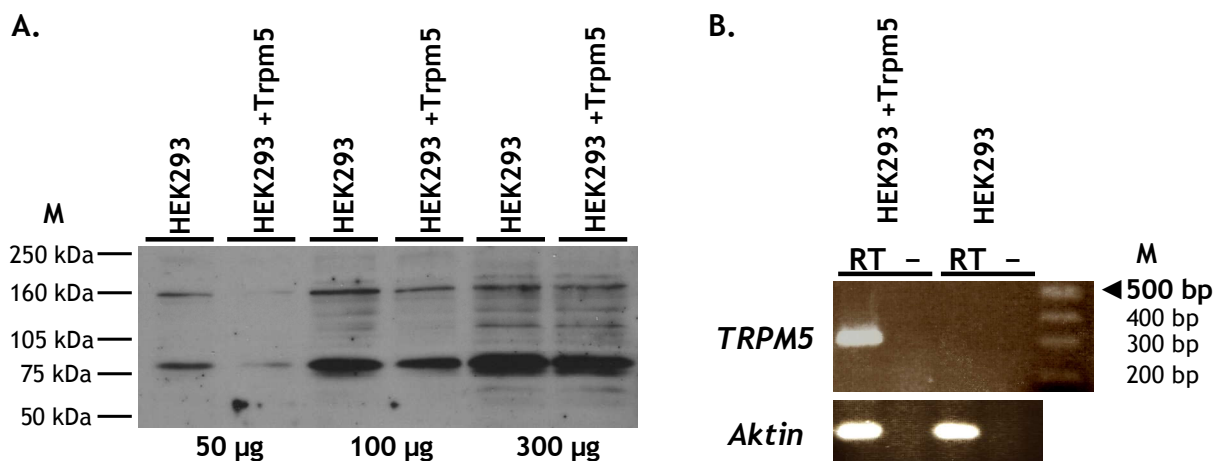
Im nächsten Schritt wurden verschiedene Mausgewebe mit dem TRPM5-1909-Antikörper untersucht. Dazu wurden die Proteine aus Pankreas, Niere, Hoden und Zunge von sieben Wochen alten C57BL/6-Männchen isoliert und mittels *Western Blot* analysiert. In allen Organen konnte eine Bande von ca. 130 kDa detektiert werden, wobei sie im Pankreasgewebe am deutlichsten erkennbar war (Abbildung 3.7). Das Ergebnis deckt sich mit dem Resultat der RT-PCR-Analyse, welches auf eine stärkere *Trpm5*-Expression in Pankreas und Hoden sowie eine schwächere Expression in Niere und Zunge hindeutete (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.7: Western Blot mit TRPM5-1909 zur Detektion von Trpm5 in murinen Geweben.**

Der *Western Blot* wurde mit den in der Abbildung 3.6 beschriebenen optimierten Bedingungen durchgeführt. Die untersuchten Proteine (100  $\mu$ g) stammten aus Pankreas, Niere, Hoden und Zunge zweier sieben Wochen alter C57BL/6-Mäuse (#1 und #2). Als Größenvergleich diente Proteinextrakt aus der MIN6-Zelllinie.

Mit Hilfe des Expressionsvektors pHGCX-Trpm5, der uns freundlicherweise von Prof. E. Liman zur Verfügung gestellt wurde, konnten weitere Versuche zum Testen des TRPM5-1909-Antikörpers durchgeführt werden. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit pHGCX-Trpm5 transient transfiziert und die zellulären Proteine nach 48 Stunden extrahiert. Überraschenderweise zeigten sowohl transfizierte als auch untransfizierte Zellen reproduzierbar ein sehr ähnliches Bandenmuster in der *Western Blot*-Analyse (Abbildung 3.8 A), das sich deutlich von der relativ klaren Einzelbande der anfänglich getesteten MIN6-Zelllinie unterschied (vgl. Abbildung 3.6). Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte in pHGCX-Trpm5 transfizierten Zellen eine starke *Trpm5*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.8 B), so dass eine ausreichende Proteinmenge auf jeden Fall vorausgesetzt werden konnte. Mittels *Western Blot* konnte Trpm5 jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

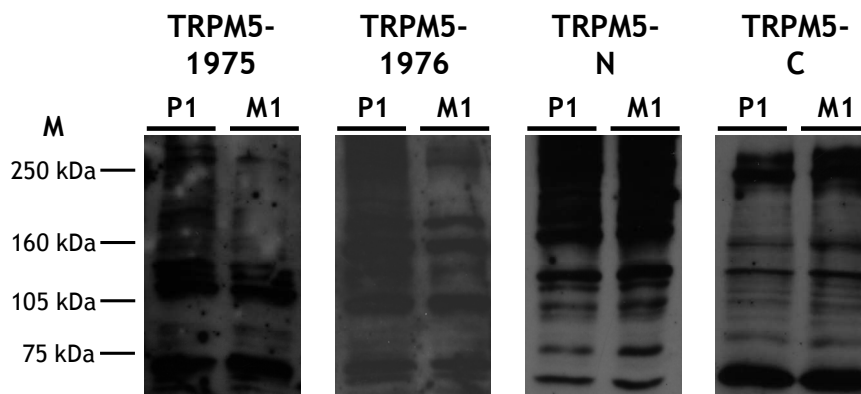


**Abbildung 3.8:** *Western Blot* und RT-PCR zum Nachweis von *Trpm5* in pHGCX-*Trpm5*-transfizierten Zellen.

A. 50, 100 und 300 µg der Gesamtproteine aus pHGCX-*Trpm5*-transfizierten und untransfizierten HEK 293-Zellen wurden mittels *Western Blot* auf die *Trpm5*-Expression hin untersucht. Die Proteine wurden 48 Stunden nach der Transfektion extrahiert. M = *Rainbow Molecular Weight Marker RPN 800*. B. Zum Zeitpunkt der Proteinextraktion wurde die Expression von *Trpm5* mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert. Die PCRs mit den Oligonukleotiden *Trpm5-20F/20R* und Maus-Aktin-F/R wurden mit 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. RT = RT-Ansatz, – = Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase, M = 100 bp-Marker.

Mit den restlichen Antikörpern, die murines *Trpm5* detektieren sollten (TRPM5-TB3, TRPM5-N und TRPM5-C), wurden ebenfalls *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Analog zu den *Western Blots* mit dem TRPM5-1909-Antikörper zeigten Proteinextrakte aus pHGCX-*Trpm5*-transfizierten und untransfizierten Zellen ein identisches Bandenmuster (Daten nicht gezeigt). Anders als bei TRPM5-1909 wurde mit keinem dieser Antikörper im MIN6-Zellextrakt eine klare Einzelbande erzeugt, sondern es waren stets mehrere Banden unterschiedlicher Größe zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Um die Spezifität der zur Verfügung stehenden Antikörper für das humane TRPM5 zu untersuchen, wurden Proteinextrakte aus der TRPM5-überexprimierenden HEK 293-Zelllinie M1 und der Kontrollzelllinie P1 mittels *Western Blot* analysiert. Alle vier getesteten Antikörper (TRPM5-1975, TRPM5-1976, TRPM5-N und TRPM5-C) erzeugten bei M1- und P1-Zellen ein identisches Bandenmuster und können demnach nicht als TRPM5-spezifisch angesehen werden (Abbildung 3.9).

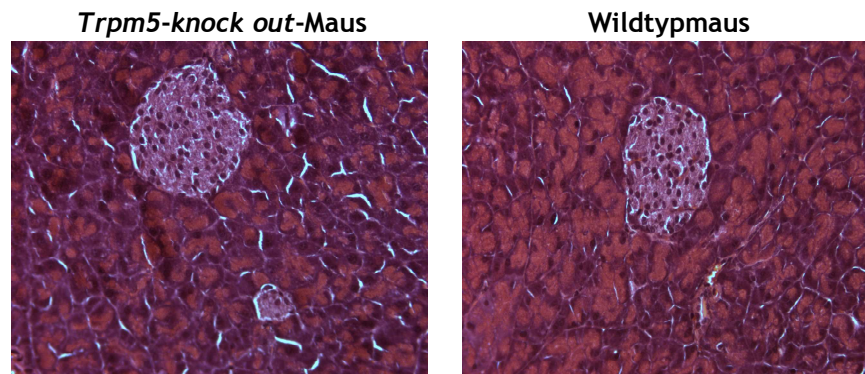


**Abbildung 3.9: Western Blot zum Testen verschiedener Antikörper gegen humanes TRPM5.**  
 Zum Testen der Antikörper TRPM5-1975, TRPM5-1976, TRPM5-N und TRPM5-C wurden 100 µg der Gesamtproteine aus der *TRPM5*-überexprimierenden HEK 293-Zelllinie M1 und der Kontrollzelllinie P1 mittels *Western Blot* untersucht. M = *Rainbow Molecular Weight Marker RPN 800*.

### 3.3.2 Immunhistochemische Analysen mit TRPM5-spezifischen Antikörpern

Nachdem unserem Labor die von Zhang und Mitarbeitern hergestellte *Trpm5-knock out*-Maus zur Verfügung stand (siehe Kapitel 3.9.3), wurden immunhistochemische Versuche mit den Antikörpern gegen murines *Trpm5* durchgeführt. Da die *Trpm5*-Expressionsanalysen zeigten, dass *Trpm5* in allen untersuchten pankreatischen Betazelllinien exprimiert wird (siehe Kapitel 3.1.1), wurde für die immunhistochemischen Antikörpertests murines Pankreasgewebe verwendet. Die Betazellen, welche bei der Maus ca. 77 % aller Zellen der Langerhans'schen Inseln ausmachen (Cabrerá *et al.*, 2006), lassen sich mit einem geeigneten Insulin-Antikörper eindeutig identifizieren, wodurch die Lokalisation der *Trpm5*-Signale erleichtert werden sollte.

Für den Immunfluoreszenznachweis wurden zunächst Paraffinschnitte angefertigt. Dazu wurde das Pankreasgewebe einer neun Wochen alten weiblichen *Trpm5-knock out*-Maus (*Trpm5*  $-/-$ ) sowie einer gleichaltrigen weiblichen Wildtypmaus (*Trpm5*  $+/+$ ) präpariert und in Paraffin eingebettet. Das Gewebe wurde in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und mit Formalin fixiert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um zunächst die Struktur und Größe der Langerhans'schen Inseln vergleichen zu können. Durch die HE-Färbung wurden die Zellkerne dunkelviolet und die zytoplasmatischen Bestandteile rosa bis rot angefärbt. Zwischen der *Trpm5-knock out*-Maus und der Wildtypmaus gab es keine sichtbaren Unterschiede in der Inselmorphologie (Abbildung 3.10).



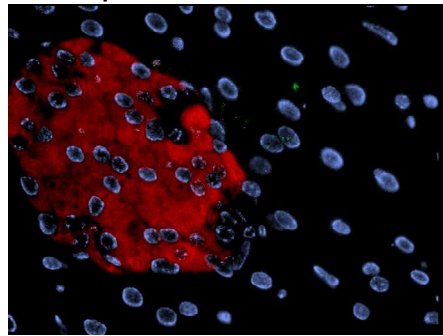
**Abbildung 3.10: HE-gefärbte Paraffinschnitte des murinen Pankreas.**

Um die Morphologie der Langerhans'schen Inseln zwischen der *Trpm5-knock out*-Maus und der Wildtypmaus zu vergleichen, wurden aus dem Pankreasgewebe Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Abgebildet sind Inseln vergleichbarer Größe. Die neun Wochen alten Mäuseweibchen stammten aus demselben Wurf.

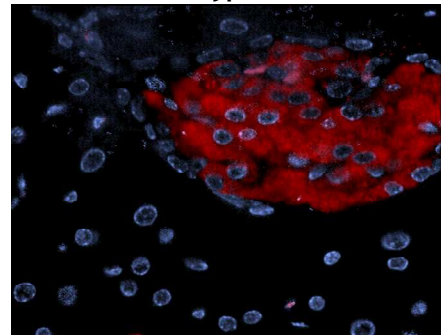
Für den Immunfluoreszenznachweis wurden die Paraffinschnitte mit verschiedenen gegen *Trpm5* hergestellten Erstantikörpern und einem FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat)-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Der Nachweis von Insulin erfolgte mit einem Insulin-spezifischen Erstantikörper und einem TRITC (Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat)-gekoppelten Zweitantikörper. Nach der Färbung wurden die Schnitte in DAPI/Antifade eingebettet, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Konditionen zur Anregung von DAPI, FITC und TRITC. Sowohl bei der *Trpm5-knock out*-Maus als auch bei der Wildtypmaus waren deutliche Insulin-Signale zu beobachten, wodurch die Betazellen der Langerhans'schen Inseln leicht identifiziert werden konnten (Abbildung 3.11 A). Mit den vier gegen *Trpm5* hergestellten Antikörpern konnten jedoch gar keine spezifischen Signale beobachtet werden. In der Abbildung 3.11 B ist exemplarisch die Färbung mit TRPM5-TB3 gezeigt.

**A. Insulin**

*Trpm5-knock out-Maus*

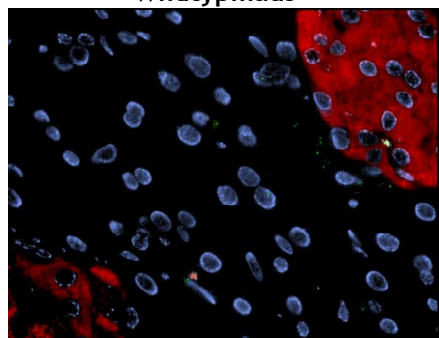


Wildtypmaus



**B. Insulin und Trpm5 (TRPM5-TB3)**

Wildtypmaus



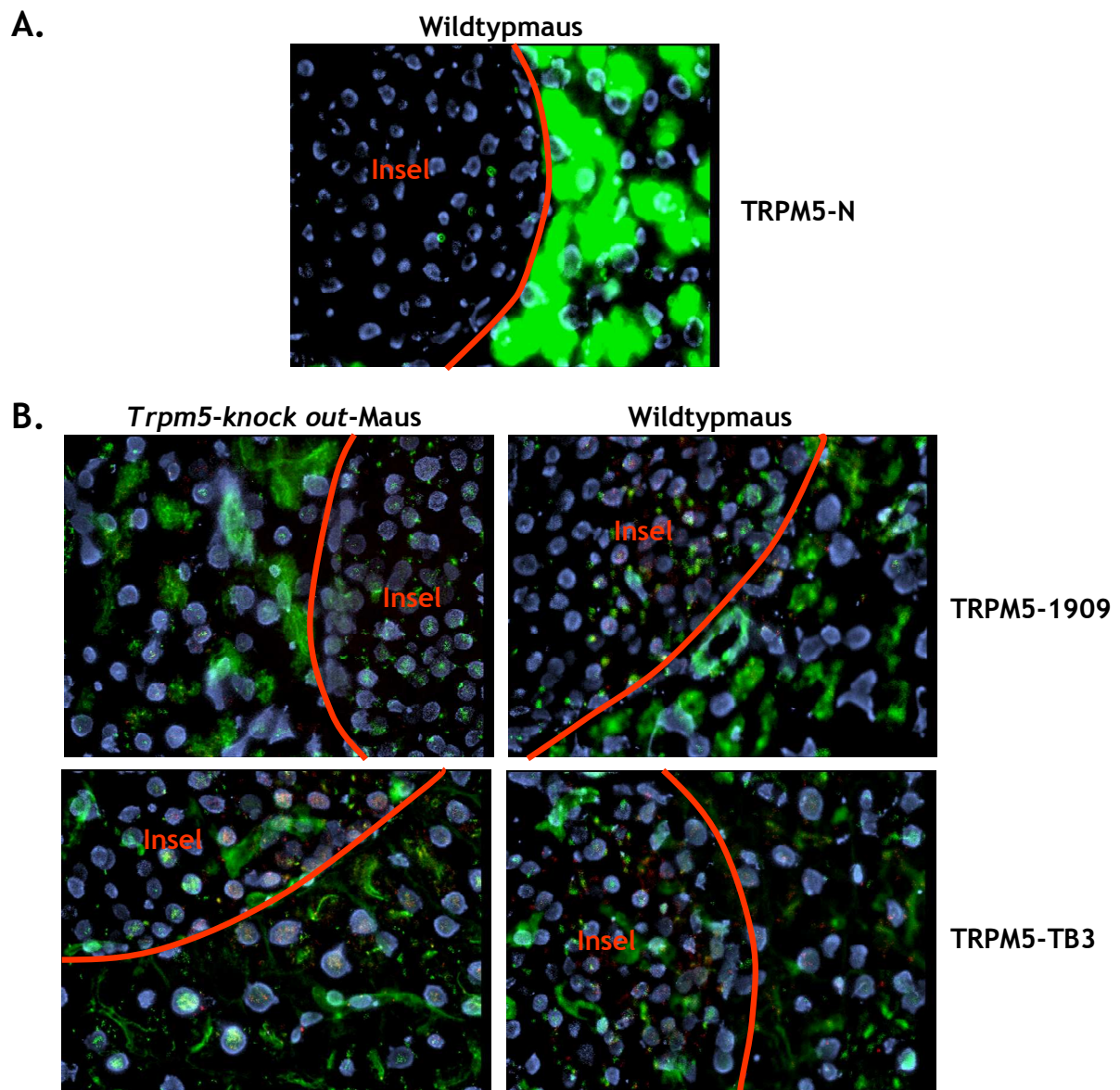
**Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten des murinen Pankreas zum Testen Trpm5-spezifischer Antikörper.**

A. Pankreatische Betazellen wurden durch einen Insulin-spezifischen Erstantikörper und einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Abgebildet sind Pankreasschnitte einer *Trpm5-knock out*-Maus und einer Wildtypmaus. B. Trpm5 wurde mit verschiedenen Erstantikörpern und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper untersucht. Exemplarisch ist der Antikörper TRPM5-TB3 auf Pankreasschnitten der Wildtypmaus dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Antifade angefärbt. Die neun Wochen alten Mäuseweibchen stammten aus demselben Wurf. Färbung: rot = Insulin, grün = Trpm5, blau = Zellkerne.

Um auszuschließen, dass die Paraffinierung mit der Antikörperreaktion interferiert, wurden in einem zweiten Versuch 7 µm dicke Gefrierschnitte aus dem Pankreasgewebe 26 Wochen alter Mäuseweibchen angefertigt. Die Schnitte wurden mit Aceton bzw. Paraformaldehyd fixiert. Die Antikörper- und Kernfärbung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den Paraffinschnitten. Im Gegensatz zu den Paraffinschnitten konnten in den Gefrierschnitten keine Insulinsignale detektiert werden, weswegen die Langerhans'schen Inseln im Durchlichtmikroskop sowie anhand der Zellkerndichte identifiziert wurden (siehe Abbildung 3.12). Die getesteten Trpm5-Antikörper lieferten unterschiedliche Ergebnisse: TRPM5-C erzeugte gar keine Färbung, wohingegen die restlichen drei Antikörper starke Signale hervorriefen. Diese Signale sind jedoch als unspezifisch für Trpm5 zu bewerten, weil sie entweder ausschließlich außerhalb der Langerhans'schen Inseln vorkamen (Antikörper TRPM5-N, Abbildung 3.12 A) – dies widerspricht den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse



(Expression in pankreatischen Betazellen; siehe Tabelle 3.1), oder zwar in den Inseln vorkamen, aber in der *Trpm5-knock out*-Maus und in der Wildtypmaus gleich stark zu sehen waren (Antikörper TRPM5-1909 und TRPM5-TB3, Abbildung 3.12 B).



**Abbildung 3.12: Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten des murinen Pankreas zum Testen *Trpm5*-spezifischer Antikörper.**

**A.** Antikörper TRPM5-N auf Pankreasschnitten der Wildtypmaus. **B.** Antikörper TRPM5-1909 und TRPM5-TB3 auf Pankreasschnitten der *Trpm5-knock out*-Maus und der Wildtypmaus. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Antifade angefärbt. Färbung: rot = Insulin, grün = *Trpm5*, blau = Zellkerne. Die Langerhans'schen Inseln wurden im Durchlichtmikroskop sowie anhand der Zellkerndichte identifiziert und schematisch eingezeichnet. Die 26 Wochen alten Mäuseweibchen stammten aus demselben Wurf.

Da keiner der sechs getesteten Antikörper eindeutig als TRPM5-spezifisch eingestuft werden konnte, wurden keine weiteren Expressionsanalysen auf Proteinebene durchgeführt.

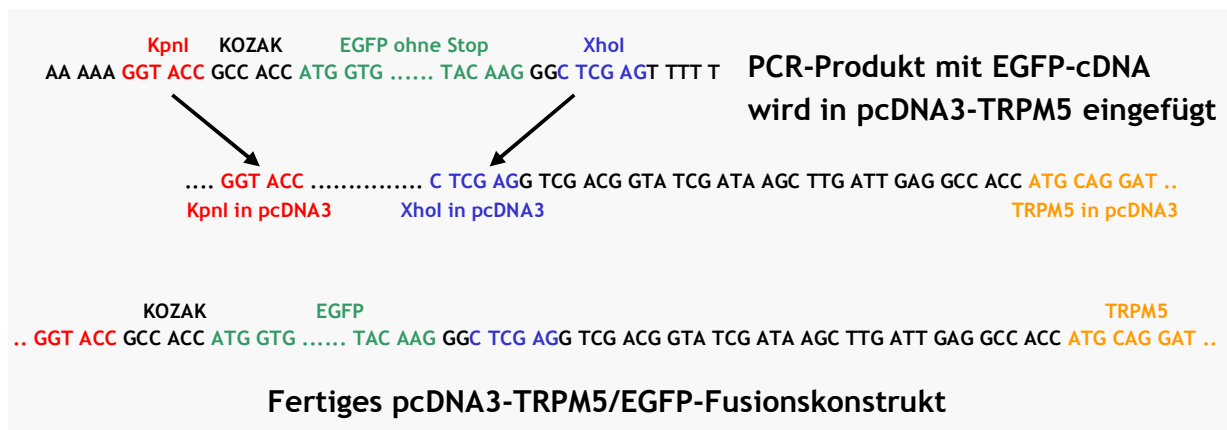
### 3.4 Zelluläre Lokalisation der humanen TRPM5-Spleißvarianten

Die TRPs sind integrale Membranproteine, die in der Regel in der äußeren Zellmembran liegen. Einige TRP-Proteine werden in Vesikeln gelagert und können bei Bedarf in die Zellmembran integriert werden (Bezzarides *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Van Buren *et al.*, 2005). Mitglieder der TRPML-Subfamilie kommen wahrscheinlich ausschließlich in intrazellulären Vesikeln vor (Bach, 2005). Um die Lokalisation der humanen Spleißvarianten TRPM5-long und TRPM5-short in der Zelle zu untersuchen, wurden sie an EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gekoppelt, welches mittels Fluoreszenzmikroskopie einfach in der Zelle zu detektieren ist.

#### 3.4.1 Herstellung TRPM5/EGFP-überexprimierender Zelllinien

Zunächst wurde ein TRPM5-short-Expressionsplasmid hergestellt. Die in dem Vektor pBKS(+) vorliegende TRPM5-short-cDNA, die zuvor in unserem Labor von Dr. D. Prawitt isoliert wurde, konnte in der selben Weise wie die TRPM5-long-cDNA (siehe Kapitel 3.2.1) in das pcDNA3-Plasmid der Firma Invitrogen eingefügt werden.

Für die PCR-Amplifikation der EGFP-cDNA wurde das Plasmid pBI-EGFP der Firma Clontech als Matrize verwendet. Durch die PCR-Oligonukleotide EGFP-KpnI-F und EGFP-XhoI-R wurde neben den Restriktionsschnittstellen KpnI und XhoI sowie zwei Cytosinnukleotiden zur Leserastererhaltung eine Kozak-Konsensussequenz („GCCACC“) vor dem Start-Codon eingefügt, während das Stop-Codon des *EGFP*-Gens im fertigen PCR-Produkt fehlte (Abbildung 3.13). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI verdaut und in den entsprechend geschnittenen Expressionvektor pcDNA3-TRPM5 vor die *TRPM5*-cDNA eingefügt. Im fertig ligierten Produkt befanden sich keine Stop-Codons zwischen EGFP und TRPM5 und die Leserahmen der cDNAs stimmten überein. Die Expression dieser hintereinander liegenden cDNAs führt somit zur Bildung eines Fusionsproteins, dessen N-Terminus aus EGFP und C-Terminus aus TRPM5 besteht. Auf diese Weise wurden sowohl TRPM5-long als auch TRPM5-short mit EGFP markiert.



**Abbildung 3.13: Klonierung der TRPM5/EGFP-Fusionskonstrukte.**

Die PCR-Amplifikation der EGFP-cDNA erfolgte mit den Oligonukleotiden EGFP-KpnI-F und EGFP-XhoI-R. Als Matrize wurde das pBI-EGFP-Plasmid verwendet. Die EGFP-cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen KpnI und XhoI in pcDNA3-TRPM5 vor die TRPM5-long- bzw. TRPM5-short-cDNA eingefügt. Nach der Ligation befanden sich die cDNAs im gleichen Leserahmen, so dass die Expression ein Fusionsprotein mit N-terminalem EGFP und C-terminalem TRPM5 ergibt.

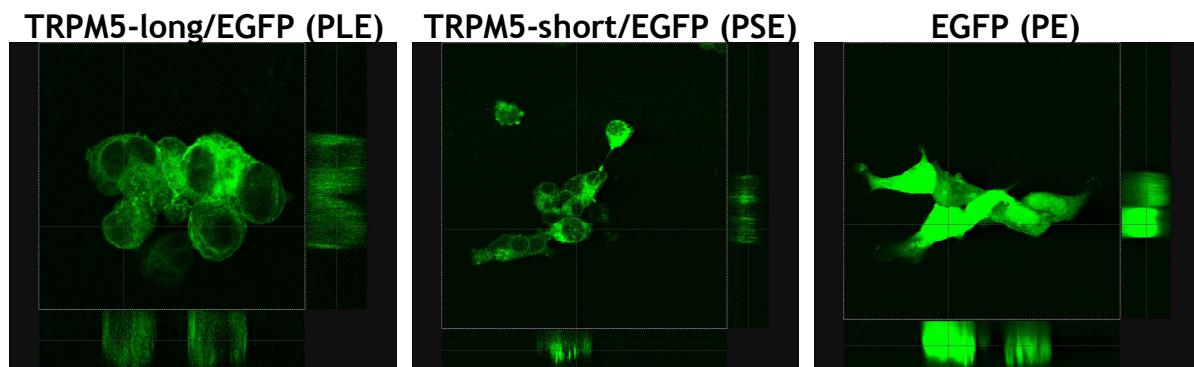
Als Kontrollplasmid wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-EGFP hergestellt. Für die PCR-Amplifikation der EGFP-cDNA wurden die Oligonukleotide EGFP-EcoRI-F und EGFP-ApaI-R verwendet, die vor dem Start-Codon des *EGFP*-Gens eine Kozak-Sequenz sowie eine EcoRI-Schnittstelle und nach dem Stop-Codon eine ApaI-Schnittstelle einfügten. Das PCR-Produkt und das pcDNA3-Plasmid wurden mit EcoRI und ApaI verdaut und anschließend ligiert.

Nachdem alle Konstrukte fertig gestellt waren, wurden die cDNAs und die Plasmidübergänge sequenziert. Anschließend wurden HEK 293-Zellen mit den PvuI-linearisierten Konstrukten transfiziert. Nach der Neomycins Selektion wurden jeweils sechs Klone mit dem Fluoreszenzmikroskop (DMRBE; Leica, Wetzlar) untersucht. Alle Klone zeigten bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm eine charakteristische EGFP-Fluoreszenz. Je einer der Klone wurde für die weiteren Versuche gewählt. Die gewählten Klone tragen die Bezeichnungen PLE (pcDNA3-TRPM5-long/EGFP) PSE (pcDNA3-TRPM5-short/EGFP) und PE (pcDNA3-EGFP).

### 3.4.2 Zelluläre Lokalisation von TRPM5-long und TRPM5-short

Die Lokalisation der EGFP-markierten TRPM5-Spleißvarianten wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP2; Leica, Wetzlar) untersucht. Die Zellen wurden bis zur gewünschten Dichte in 10 cm-Zellkulturschalen auf Deckgläschen kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen umgekehrt auf Objektträgern fixiert. Die Zellen wurden unter Konditionen zur Anregung von EGFP fotografiert. Sowohl TRPM5-long

als auch TRPM5-short zeigten eindeutige Signale in der Zellmembran, während EGFP in der ganzen Zelle verteilt vorkam (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der TRPM5/EGFP-exprimierenden HEK 293-Zellen.**

Die Lokalisation der EGFP-gekoppelten Spleißvarianten TRPM5-long und TRPM5-short wurde anhand der EGFP-Fluoreszenz in den Zelllinien PLE und PSE mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Als Kontrolle diente freies EGFP in der Zelllinie PE. Teilweise veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

### 3.5 Elektrophysiologische Charakterisierung des TRPM5-Kanals

Um die Funktion von TRPM5 in der Zelle zu untersuchen, wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof. R. Penner (Universität Hawaii, USA) charakterisiert. Im Folgenden werden die Grundlagen der elektrophysiologischen Versuche, die von Frau Mahealani Monteilh-Zoller mit *TRPM5*-überexprimierenden M1-Zellen durchgeführt wurden, kurz erläutert. Die hier präsentierten Ergebnisse wurden in Prawitt *et al.*, 2003 veröffentlicht.

Zur Untersuchung der Membranströme mit der *Patch-clamp*-Technik wird zwischen der *Patch*-Pipette und der Zelle durch leichten Unterdruck eine feste Verbindung erzeugt. Diese Verbindung oder Versiegelung wird als *Giga-seal* bezeichnet, denn zwischen dem Inneren der Pipette und der Badlösung der Zelle entsteht ein elektrischer Widerstand von mehreren Gigaohm ( $G\Omega$ ), der das Auftreten unspezifischer Leckströme minimiert. Diese *Giga-seal*-Verbindung ermöglicht eine exakte Messung derjenigen Ströme, die durch das in der Pipette befindliche Membranareal fließen, wobei das Areal einen oder mehrere Ionenkanäle enthalten kann. Diese sogenannte *Cell-attached*-Konfiguration ermöglicht das Verhalten einzelner Ionenkanäle in ihrer physiologischen Umgebung zu studieren.

In der Ganzzelleableitung bzw. *Whole-cell*-Konfiguration werden die Ströme der gesamten Zelle gemessen. Dazu wird zunächst die *Cell-attached*-Konfiguration hergestellt. Durch

Unterdruck oder kurze Spannungspulse kann die in der Pipettenspitze befindliche Zellmembran geöffnet werden, so dass eine Verbindung zwischen dem Zytosol und dem Inneren der Pipette hergestellt wird. Auf diese Weise kann nicht nur das extrazelluläre Milieu (die Badlösung der Zelle), sondern auch das intrazelluläre Milieu (die Pipettenlösung) beliebig verändert werden.

Wird die Zellmembran nach Erreichen der *Cell-attached*-Konfiguration nicht geöffnet, kann mit der Pipettenspitze ein Stück Membran von der Zelle abgetrennt werden. Dies wird dann als *Inside-out*-Konfiguration bezeichnet, da das Zellinnere nun nach außen weist und die extrazelluläre Seite sich im Inneren der Pipette befindet. Ähnlich wie bei der *Cell-attached*-Konfiguration kann auf diese Weise das Verhalten einzelner Ionenkanäle untersucht werden, wobei die *Inside-out*-Konfiguration zusätzlich die Möglichkeit bietet, die Zusammensetzung der zytosolischen Lösung zu manipulieren.

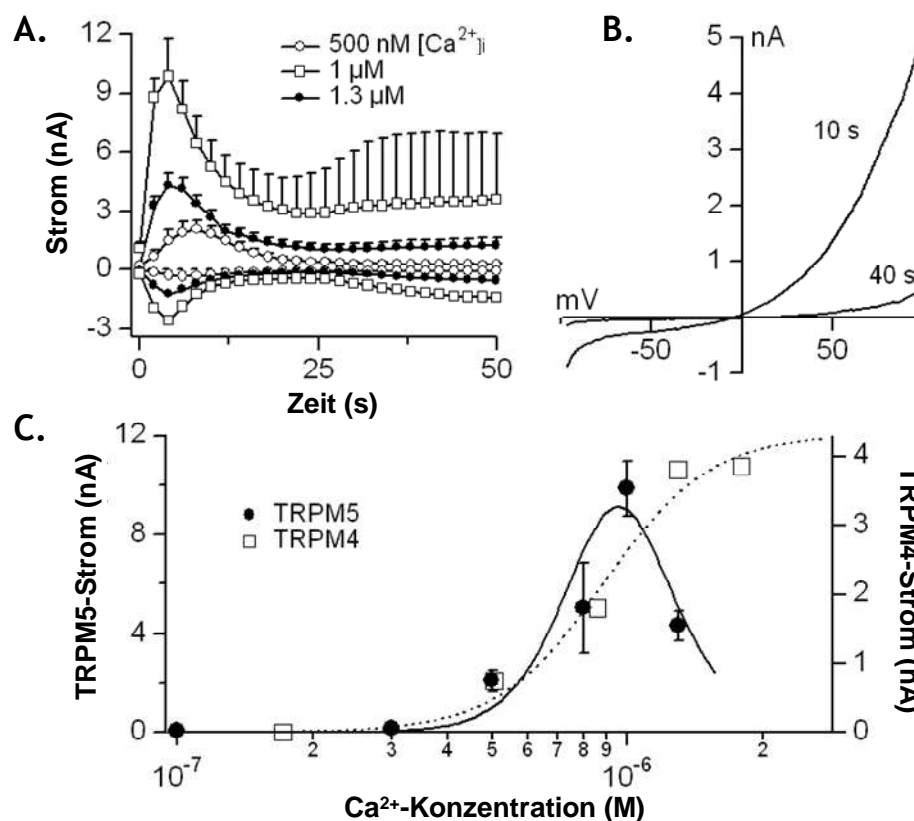
Die Ströme, die durch die Zellmembran bzw. Ionenkanäle fließen, werden über eine Ableitungselektrode in der *Patch*-Pipette ermittelt. Diese Elektrode ist mit dem *Patch-clamp*-Verstärker verbunden, der eine gewünschte Spannung, das sogenannte Haltepotential, vorgibt und den Korrekturstrom, der für die Aufrechterhaltung des Haltepotentials an der Membran notwendig ist, misst. Es werden Spannungsrampen von  $-100$  bis  $+100$  mV erzeugt, die in wenigen Millisekunden durchlaufen werden. Zwischen den einzelnen Spannungsrampen wird an die Membran ein gewünschtes Haltepotential eingestellt, dann werden diese Zyklen in kurzen Zeitabständen mehrmals wiederholt. Die Einwärtsströme werden bei  $-80$  mV, die Auswärtsströme bei  $+80$  mV ermittelt.

### 3.5.1 Aktivierung der TRPM5-Kanäle

Um zu testen, ob die TRPM5-Kanäle in der M1-Zelllinie konstitutiv aktiv sind oder ob sie  $\text{Ca}^{2+}$ -speicherabhängig aktiviert werden können, wurden die Zellen mit Lösungen, die keinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer enthielten bzw.  $10$  mM BAPTA enthielten perfundiert. BAPTA (1,2-bis[2-aminophenoxy]ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, der die in der Lösung vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet, so dass diese der Zelle gewissermaßen entzogen werden. Um diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust im Zytosol auszugleichen, kommt es zur passiven Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. In Ganzzelleableitungen konnten unter diesen Bedingungen keine Ströme gemessen werden, was darauf hindeutet, dass TRPM5 nicht konstitutiv aktiv ist und nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -speicherabhängig aktiviert wird (Daten nicht gezeigt). Auch die Zugabe von  $10$  mM BAPTA mit  $20$   $\mu\text{M}$   $\text{IP}_3$ , welches eine aktive Speicherentleerung bewirkt, konnte keine nennenswerten Ströme erzeugen (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen dagegen mit

Lösungen, die das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  nicht pufferten, perfundiert und mit  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Rezeptoragonisten stimuliert, konnten starke Ströme beobachtet werden (siehe weiter unten, Abbildung 3.17).

Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der TRPM5-Kanäle zu untersuchen, wurden M1-Zellen mit Lösungen perfundiert, deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen so gepuffert waren, dass eine die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) von 0,1 bis 1,3  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Bei 840 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde die Hälfte der maximalen Aktivität der Kanäle erreicht ( $\text{EC}_{50}$ , *median effective concentration* = 840 nM). Die Aktivität der Kanäle bzw. die dadurch fließenden Ströme nahmen bis 1  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stetig zu, fielen jedoch bei höheren Konzentrationen wieder ab, was zu einer glockenförmigen Dosis-Wirkungskurve führte (Abbildung 3.15 A und C). Diese Inhibition der Aktivität ab 1  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\text{IC}_{50}$ , *median inhibition concentration* = 1  $\mu\text{M}$ ) unterscheidet TRPM5 von dem nahe verwandten TRPM4. Die TRPM5-Aktivierungskinetik zeigt eine schnelle Aktivierung und schnelle Inaktivierung. Die Strom-Spannungskurve der TRPM5-Kanäle zeigt einen ausgeprägten auswärts gerichteten Strom (Abbildung 3.15 B).



**Abbildung 3.15:** Patch-clamp-Ganzzelleitungen zum Testen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit von TRPM5.

A. TRPM5-Ströme bei  $-80$  mV bzw.  $+80$  mV bei unterschiedlichen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $n = 5-20$ ). B. Strom-Spannungskurve der TRPM5-spezifischen Ströme 10 und 40 Sekunden nach Einstellung der Whole-cell-Konfiguration bei  $500$  nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . C. Darstellung der TRPM5-Ströme in Abhängigkeit von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $n = 5-20$ ). Zum Vergleich sind die TRPM4-Ströme dargestellt (nach Launay *et al.*, 2002). Veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

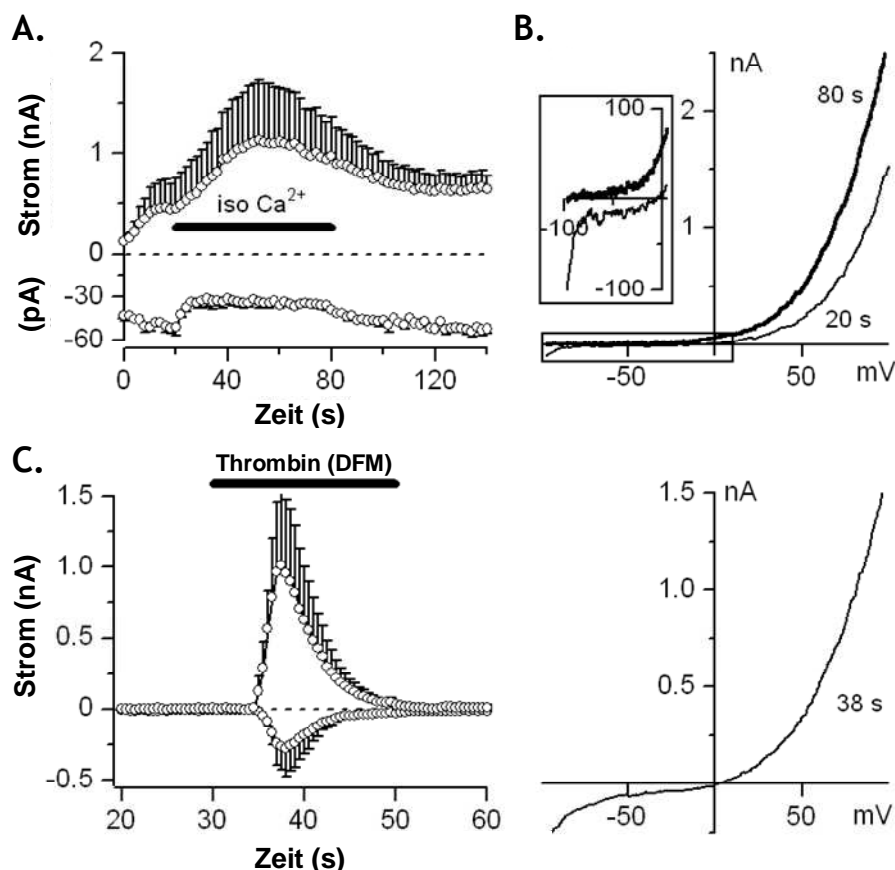
### 3.5.2 Selektivität und Permeabilität der TRPM5-Kanäle

Der TRPM5-spezifische Strom besitzt ein Umkehrpotential bei ca.  $0$  mV, was für einen nicht-selektiven Ionenkanal typisch ist (Abbildung 3.15 B). Der auswärts gerichtete Strom wird hierbei durch Kaliumionen ( $\text{K}^+$ ) getragen, während für den einwärts gerichteten Strom vermutlich Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) aus dem Extrazellulärraum verantwortlich sind. In Ionensubstitutionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Kanal für  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und Cäsiumionen ( $\text{Cs}^+$ ) ähnlich permeabel ist (Daten nicht gezeigt).

Um die Permeabilität für zweiwertige Ionen zu testen, wurden die TRPM5-Kanäle zunächst mit  $500$  nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiviert und die Zellen kurz darauf in eine isotonische  $120$  mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung überführt. Während der auswärts gerichtete Strom etwas anstieg, kam der einwärts gerichtete Strom zum Erliegen (Abbildung 3.16 A). Das Strom-Spannungsverhältnis zeigte unter diesen Bedingungen eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativen Werten, da keine geeigneten Ionen für den Einwärtsstrom zur Verfügung standen (Abbildung 3.16 B).

Das gleiche Experiment mit Bariumionen ( $\text{Ba}^{2+}$ ) statt  $\text{Ca}^{2+}$  lieferte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Divalent-permeable Kanäle wie TRPM7 oder der CRAC-Kanal haben die Eigenschaft, in Abwesenheit von zweiwertigen Ionen im extrazellulären Medium monovalente Ionen zu leiten, wodurch ein starker einwärts gerichteter Strom erzeugt wird (Hoth und Penner, 1992; Nadler *et al.*, 2001). Nach der Aktivierung von TRPM5 mit 20 U/ml Thrombin, welches einen schnellen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bewirkt (siehe unten), blieben die Einwärtsströme jedoch kleiner als die Auswärtsströme (Abbildung 3.16 C), und die Ströme waren im Strom-Spannungsverhältnis stark auswärts gerichtet (Abbildung 3.16 D). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass TRPM5 lediglich monovalente Ionen leitet und für divalente Ionen nicht permeabel ist.



**Abbildung 3.16: Patch-clamp-Ganzzellableitungen zur Untersuchung der Permeabilität von TRPM5.**

**A.** Nach der Aktivierung von TRPM5 mit 500 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurden die Ströme bei  $-80$  mV bzw.  $+80$  mV gemessen und die Wirkung einer isotonischen 120 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung untersucht ( $n = 3$ ). **B.** Strom-Spannungskurve vor (20 s) und nach (80 s) der isotonischen  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung. In der Vergrößerung wird die Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativen Werten verdeutlicht. **C.** Nach der Aktivierung von TRPM5 durch eine Zugabe von 20 U/ml Thrombin wurden die Ströme in divalent-freiem extrazellulärem Medium (DFM) gemessen. Die Inaktivierung des Kanals folgt einer Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante  $\tau = 5,9$  s ( $n = 5$ ). **D.** Die Strom-Spannungskurve während der DVF-Applikation. Veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.



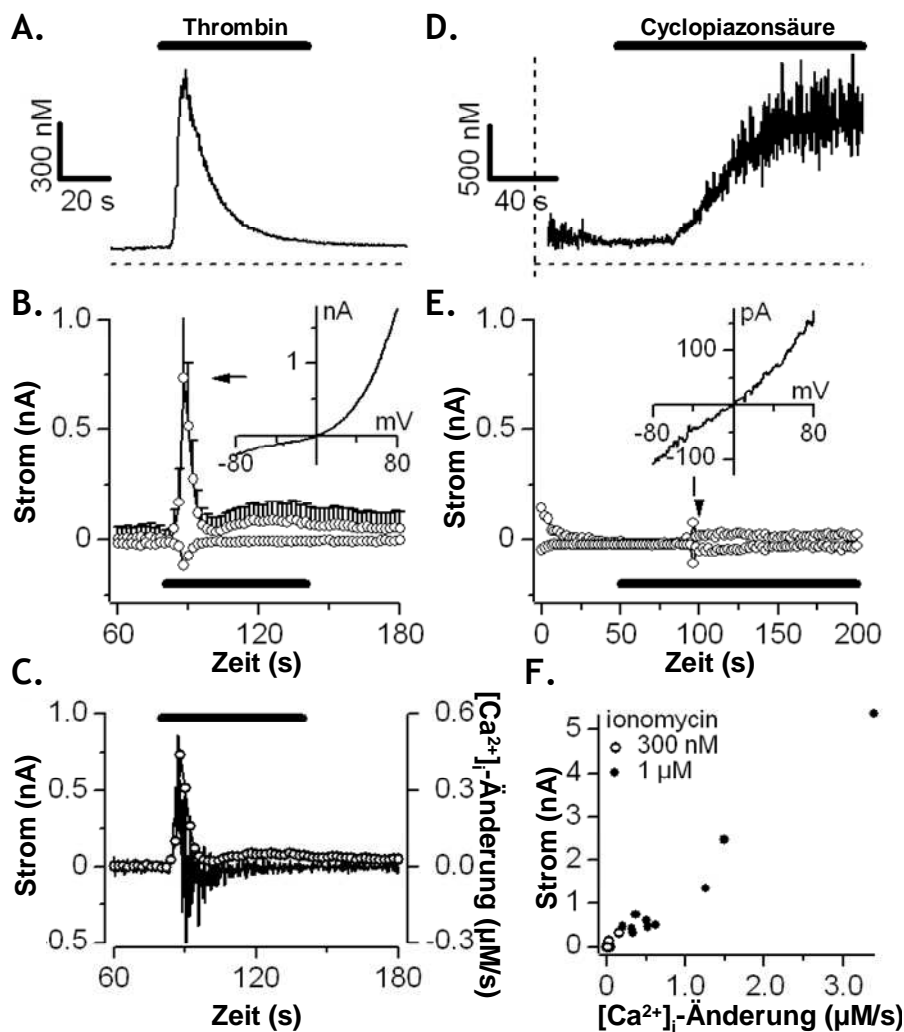
### 3.5.3 Aktivierung von TRPM5 in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs

Unter physiologischen Bedingungen kann die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  beispielsweise durch Rezeptorstimulation schnell und transient erhöht werden. Um zu testen, ob TRPM5 durch Rezeptorstimulation aktiviert werden kann, wurden die M1-Zellen mit Thrombin behandelt, wodurch ein rascher, kurzzeitiger  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg induziert wurde (Abbildung 3.17 A). Zeitgleich mit dem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurden erhöhte Einwärtsströme (bei +80 mV) bzw. Auswärtsströme (bei -80 mV) beobachtet, die durch die Strom-Spannungskurve, die bei maximaler Stromstärke aufgezeichnet wurde, TRPM5 zugeordnet werden konnten (Abbildung 3.17 B). Durch die Zugabe von 10 mM BAPTA wurden diese Ströme wieder vollständig inhibiert (Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Experimenten wurde die TRPM5-Aktivierung in Abhängigkeit von der zeitlichen  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung untersucht. Werden die durch Thrombin induzierten Auswärtsströme (aus Abbildung 3.17 B) mit der zeitlichen  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung ( $[Ca^{2+}]_i$ -Intervall/Zeitspanne =  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\Delta t$ , nach den Daten aus Abbildung 3.17 A berechnet) verglichen, erhält man eine vollständige Überlagerung der Signale (Abbildung 3.17 C).

Durch die Zugabe von Cyclopiazonsäure (CPA, *cyclopiazonic acid*) oder Ionomycin kann ein wesentlich langsamerer  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg als mit Thrombin induziert werden. Cyclopiazonsäure inhibiert die  $Ca^{2+}$ -ATPasen (SERCA, siehe Abbildung 1.1), welche  $Ca^{2+}$ -Ionen in das endoplasmatische und sarkoplasmatische Retikulum pumpen, wohingegen Ionomycin als  $Ca^{2+}$ -Ionophor in der Lage ist,  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Membranen zu transportieren (Morgan und Jacob, 1994; Seidler *et al.*, 1989).

In M1-Zellen wurde sowohl mit CPA als auch mit Ionomycin eine sukzessive  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bis über 1  $\mu M$  induziert (Abbildung 3.17 D und F). Im Gegensatz zu Thrombin, das bei vergleichbaren  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bereits TRPM5 aktiviert hätte, konnten durch CPA keine TRPM5-typischen Ströme ausgelöst werden (Abbildung 3.17 E). Durch die Zugabe verschiedener Ionomycinkonzentrationen wurde in einzelnen M1-Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  eine unterschiedlich schnelle Speicherentleerung induziert, die einen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg von mindestens 1  $\mu M$  verursachte, die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung jedoch nicht in allen Zellen schnell genug war, um eine maximale TRPM5-Aktivierung hervorzurufen (Abbildung 3.17 F). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass TRPM5 nicht auf die absolute Änderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, sondern auf die Geschwindigkeit dieser Änderung reagiert. Lediglich rasche  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen können TRPM5 aktivieren.



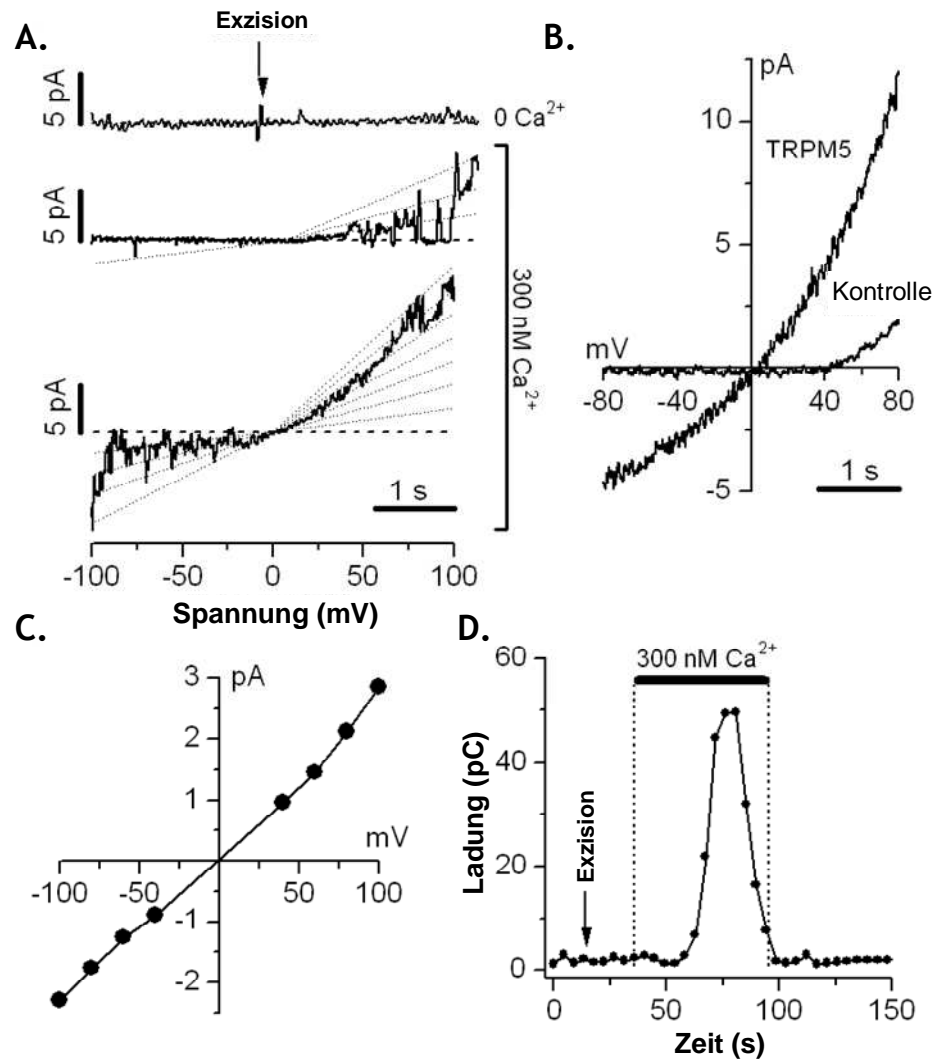
**Abbildung 3.17: Patch-clamp-Ganzzelleitungen zur Untersuchung der TRPM5-Aktivierungskinetik.**

A. Durch Thrombin induzierter  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, gemessen mit Fura-2. B. Durch 20 U/ml Thrombin induzierte TRPM5-Ströme bei  $-80$  mV und  $+80$  mV ( $n = 5$ ). Eingefügt ist die Strom-Spannungskurve. C. Auswärtsströme aus der Abbildung B und das differenzierte  $Ca^{2+}$ -Signal aus Abbildung A überlagert dargestellt. D. Durch  $50 \mu\text{M}$  Cyclopiazonsäure (CPA, *cyclopiazonic acid*) hervorgerufener langsamer  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ( $n = 9$ ). E. Ströme während der CPA-Applikation bei  $-80$  mV und  $+80$  mV. Der Pfeil indiziert die endogene TRPM4-Aktivität in HEK 293-Zellen. Eingefügt ist die Strom-Spannungskurve des gemessenen Stroms, um den Unterschied zu TRPM5-Stömen zu verdeutlichen. F. Maximale TRPM5-Ströme als Funktion der zeitlichen  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung. Die Zellen wurden mit  $0,3$  bzw.  $1,0 \mu\text{M}$  Ionomycin in  $Ca^{2+}$ -freiem Extrazellulärmedium stimuliert. In allen gezeigten Zellen wurde mindestens  $1 \mu\text{M}$   $[Ca^{2+}]_i$  erreicht, wobei die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung unterschiedlich war. Veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

### 3.5.4 Eigenschaften der TRPM5-Einzelkanäle

Um die Eigenschaften einzelner TRPM5-Kanäle zu untersuchen, wurden die Ströme statt in intakten Zellen in Membranfragmenten (engl. *patch*) gemessen. In der *Inside-out*-Konfiguration wurde auf die intrazelluläre Seite der Membran zunächst eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung gegeben. Wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 300 nM erhöht, floss ein deutlich messbarer Strom durch die Membran (Abbildung 3.18 A und B). Die Leitfähigkeit eines einzelnen TRPM5-Kanals betrug dabei 25 Pikosiemens (Abbildung 3.18 C). Auch in diesem Experiment wurde die transiente Natur des TRPM5-Stroms deutlich, denn die TRPM5-Aktivität nahm noch während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation ab (Abbildung 3.18 D). Da diese Versuche mit isolierten Membranfragmenten durchgeführt wurden, kommen zelluläre Faktoren für die Inaktivierung des Kanals nicht in Frage. Die rasche Inaktivierung ist nicht von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig und scheint entweder über weitere, noch unbekannte Faktoren reguliert zu werden oder eine „eingebaute“ Eigenschaft des TRPM5-Kanals zu sein.

Sowohl in Einzelkanalmessungen als auch in Ganzzelleableitungen wird deutlich, dass die TRPM5-Aktivität eine starke Spannungsabhängigkeit zeigt, denn bei positiven Potentialen wird sowohl die Offenwahrscheinlichkeit als auch die Offenzeit der Kanäle erhöht, wodurch ein starker auswärts gerichteter Strom entsteht (Abbildungen 3.15 B und 3.18 B).



**Abbildung 3.18: Ableitung von TRPM5-Einzelkanalströmen in der *Inside-out*-Konfiguration.**

**A.** Aktivität eines TRPM5-Kanals. Oben ist der Strom beim Abtrennen des Membranfragmentes in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung abgebildet. In der Mitte und unten sind aufeinander folgende Ströme in 300 nM Ca<sup>2+</sup> gezeigt. **B.** Strom-Spannungskurve eines TRPM5-Kanals in 300 nM Ca<sup>2+</sup> (n = 75). Als Kontrolle dienten HEK 293-Zellen (n = 98). **C.** Strom-Spannungsverhältnis des TRPM5-Kanals. Die Punkte geben den Durchschnitt von 15-25 Werten pro Spannung an, die in fünf Membranfragmenten bestimmt wurden. Die Steigung ergibt als Leitfähigkeit des Kanals 25 Pikosiemens. **D.** Durchschnittliche Ladung vor, während und nach der Behandlung mit 300 nM Ca<sup>2+</sup> (n = 5, dieselben Membranfragmente wie in A-C). Für die Ermittlung der Werte wurden Ströme zwischen 0 mV und +100 mV berücksichtigt. Veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

### 3.6 Funktion der kurzen Spleißvariante TRPM5-short

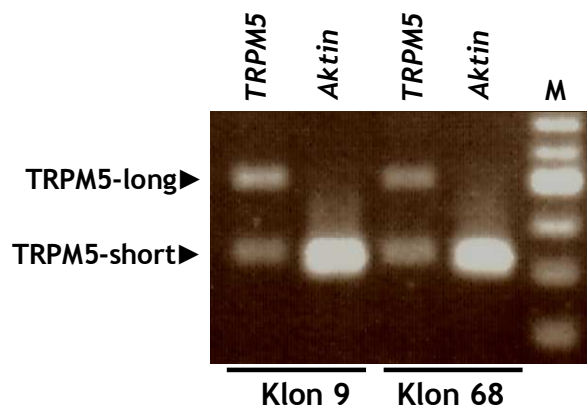
Das humane *TRPM5*-Gen besitzt zwei unterschiedlich lange Spleißformen, die durch alternatives Spleißen des Exons 18 entstehen. Während die längere TRPM5-Variante TRPM5-long ein funktionelles Kanalprotein darstellt, fehlen der kurzen Variante TRPM5-short diejenigen C-terminalen Proteinbereiche, die eine membrandurchspannende Kanalpore bilden. Vier der Transmembrandomänen sind jedoch auch bei TRPM5-short vorhanden.

Für TRPM1 und TRPM2, die zur selben Subfamilie wie TRPM5 gehören, sind ebenfalls solche kurzen Spleißvarianten bekannt. Diese sind in der Lage, die funktionellen Kanäle zu inhibieren. Während die lange Variante TRPM1-L in der Zellmembran lokalisiert ist, ist die kurze Variante TRPM1-S, die keine Transmembrandomänen besitzt, im Zytoplasma verteilt. TRPM1-S inhibiert bei einer Coexpression mit TRPM1-L dessen Translokation zur Zellmembran, so dass die Funktion des Kanals blockiert wird. Wird dagegen TRPM1-L allein exprimiert, ist der Kanal konstitutiv aktiv (Xu *et al.*, 2001). Das kurze TRPM2-S besitzt zwei N-terminale Transmembrandomänen und ist wie die lange Proteinform TRPM2-L in der Zellmembran lokalisiert, so dass eine Coexpression die Lokalisation nicht ändert. TRPM2-S kann jedoch mit TRPM2-L interagieren und auf diese Weise die Funktion des Kanals blockieren (Zhang, W. *et al.*, 2003). Ob ein ähnlicher Regulationsmechanismus für die TRPM5-Aktivität vorhanden ist, sollte durch Coexpression der beiden Spleißvarianten untersucht werden.

### **3.6.1 Coexpression von TRPM5-long und TRPM5-short**

Um die Coexpression von TRPM5-long und TRPM5-short zu untersuchen, wurde zunächst eine TRPM5-short-überexprimierende Zelllinie hergestellt; diese sollte mit dem TRPM5-long/EGFP-Konstrukt (siehe Kapitel 3.4.1) transfiziert werden.

Die Generierung der TRPM5-short-überexprimierenden HEK 293-Zelllinie erfolgte wie für M1 beschrieben (siehe 3.2.1). Einer der Klone (PS) wurde nach Erreichen der benötigten Zelldichte mit dem linearisierten TRPM5-long/EGFP-Konstrukt stabil transfiziert und die Zellen möglichst dünn ausplattiert. Da beide Konstrukte auf pcDNA3 basieren und somit das gleiche Selektionsantibiotikum benötigen, wurden nach der zweiten Transfektion (mit pcDNA3-TRPM5-long/EGFP) 120 Klone anhand der EGFP-Fluoreszenz selektioniert. Zwei der Klone (Klon 9 und Klon 68) waren EGFP-positiv und wurden mittels RT-PCR auf die Expression beider TRPM5-Spleißvarianten untersucht (Abbildung 3.19). Für die weiteren Versuche wurde Klon 9 („PS+PLE“) verwendet.

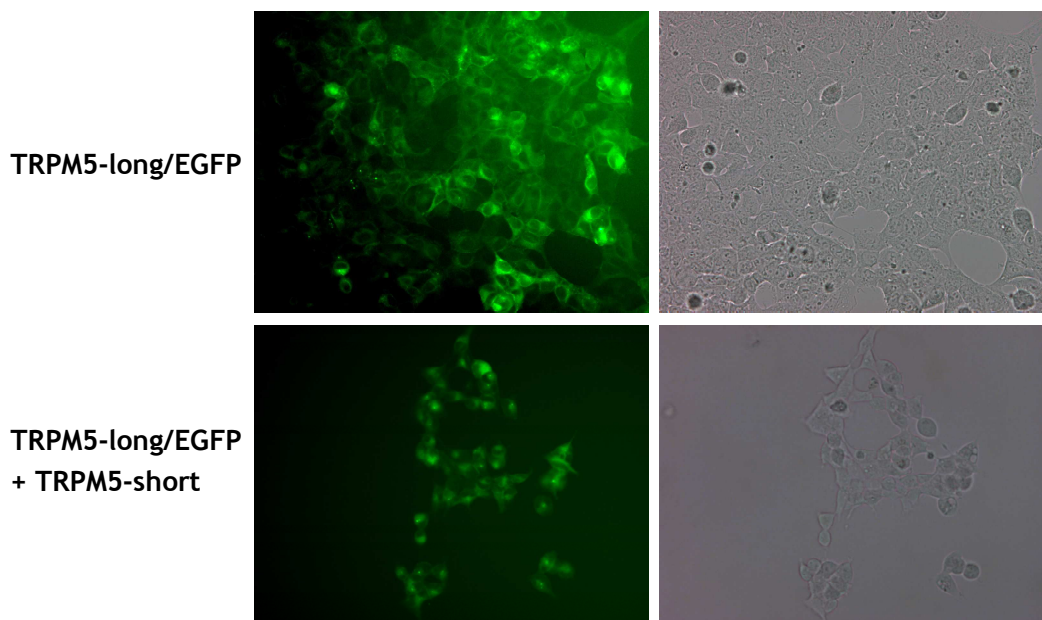


**Abbildung 3.19: RT-PCR zum Nachweis der Coexpression von TRPM5-long/EGFP und TRPM5-short in HEK 293-Klonen.**

Die Coexpression von TRPM5-long/EGFP und TRPM5-short wurde in den EGFP-positiven Klonen 9 und 68 mittels RT-PCR analysiert. Die PCRs mit den Oligonukleotiden TRPM5-F17/R21 und Aktin-F/R wurden mit 30 Zyklen durchgeführt. M = 100 bp-Marker.

### 3.6.2 Zelluläre Lokalisation von TRPM5-long bei Coexpression mit TRPM5-short

Die Lokalisation des Fusionsproteins TRPM5-long/EGFP wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Coexpression von TRPM5-long und TRPM5-short änderte die Lokalisation des EGFP-gekoppelten TRPM5-long-Proteins nicht, denn es konnte lediglich in der Zellmembran nachgewiesen werden (Abbildung 3.20).



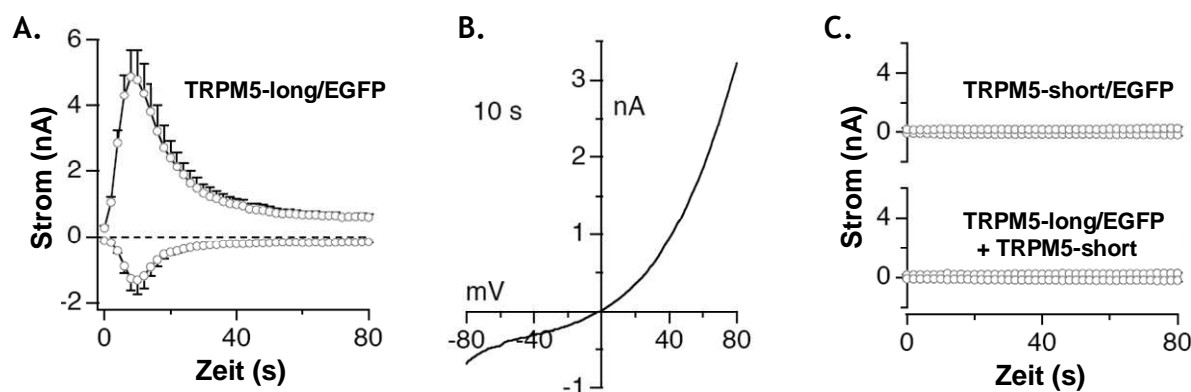
**Abbildung 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der TRPM5-long/EGFP- und TRPM5-short-coexprimierenden Zellen.**

Durch die Coexpression von TRPM5-long/EGFP und TRPM5-short in HEK 293-Zellen wurde untersucht, ob die kurze Spleißvariante in der Lage ist, die Lokalisation von TRPM5-long zu ändern.

### 3.6.3 Elektrophysiologische Charakterisierung des heteromeren TRPM5-Kanals

Mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken sollte untersucht werden, ob TRPM5-short in der Lage ist, die Aktivität des TRPM5-Kanals zu blockieren. Die drei hergestellten HEK 293-Zelllinien PSE (exprimiert TRPM5-short/EGFP), PLE (exprimiert TRPM5-long/EGFP) sowie PS+PLE (exprimiert TRPM5-short und TRPM5-long/EGFP) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof. R. Penner untersucht. Alle elektrophysiologischen Versuche wurden von Frau Mahealani Monteilh-Zoller durchgeführt.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Kopplung von EGFP an TRPM5 die Funktion des Kanals beeinflusst. Durch die Stimulation mit 500 nM  $[Ca^{2+}]_i$  konnten in PLE-Zellen starke TRPM5-spezifische Ströme induziert werden (Abbildung 3.21 A und B), die mit jenen der TRPM5-überexprimierenden M1-Zellen vergleichbar sind (vgl. Abbildung 3.14). In TRPM5-short/EGFP-überexprimierenden PSE-Zellen konnten dagegen unter gleichen Bedingungen keine Ströme gemessen werden (Abbildung 3.21 C oben). Werden TRPM5-long/EGFP und TRPM5-short coexprimiert, sind ebenfalls keine Ströme zu beobachten (Abbildung 3.21 C unten). Dieser Effekt war in 11 von 14 untersuchten Zellen zu beobachten, in den restlichen drei Zellen wurden mit Abbildung 3.21 A vergleichbare Ströme gemessen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.21: Patch-clamp-Ganzzelleableitungen zur Untersuchung der TRPM5-Aktivität bei Coexpression von TRPM5-long und TRPM5-short.**

**A.** Die TRPM5-spezifischen Ströme wurden in TRPM5-long/EGFP-überexprimierenden HEK 293-Zellen mit 500 nM  $[Ca^{2+}]_i$  induziert (n = 5). **B.** Strom-Spannungsverhältnis der TRPM5-spezifischen Ströme aus A. **C.** Ströme in TRPM5-short/EGFP-exprimierenden Zellen (n = 6) bzw. TRPM5-long/EGFP + TRPM5-short-coexprimierenden Zellen (n = 11/14) nach der Stimulation mit 500 nM  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.7 Interaktionsanalyse von TRPM5 und TRPM4

TRPM4 ist der nächste Verwandte des TRPM5-Proteins und bildet zusammen mit diesem eine Untergruppe der TRPM-Subfamilie. Aufgrund der Ähnlichkeit der Proteine – die Sequenzhomologie beträgt 41 % auf Aminosäureebene – scheint eine Assoziation der Proteine zu heteromeren Ionenkanälen wahrscheinlich (Fleig und Penner, 2004; Vriens *et al.*, 2004). In Expressionsanalysen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnte außerdem gezeigt werden, dass beide Gene in mehreren untersuchten Zelllinien zusammen exprimiert werden (siehe Kapitel 3.1.1). Aus diesen Gründen sollten TRPM5 und TRPM4 in HEK 293-Zellen coexprimiert werden, um die Interaktion mittels Coimmunpräzipitation zu untersuchen.

#### 3.7.1 Coexpression von TRPM5 und TRPM4 in HEK 293-Zellen

Für die Coimmunpräzipitation wurden mit EGFP bzw. mit dem Affinitäts-*tag* V5 gekoppelte Proteine (TRPM5-long/EGFP und TRPM4/V5) benutzt, da weder für TRPM5 noch für TRPM4 geeignete Antikörper zur Verfügung standen (vgl. hierzu Kapitel 3.3). Das Expressionsplasmid pcDNA4TO-V5-TRPM4b mit der cDNA der funktionellen Spleißvariante TRPM4b des *TRPM4*-Gens (Launay *et al.*, 2002), wurde uns freundlicherweise von Dr. P. Launay (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

Die PLE-Zelllinie, die das Fusionsprotein TRPM5-long/EGFP stabil überexprimiert (siehe Kapitel 3.4.1), wurde mit pcDNA4TO-V5-TRPM4b transient transfiziert und die zellulären Proteine nach 48 Stunden extrahiert. Als Kontrollzelllinie diente die PE-Zelllinie, die EGFP überexprimiert, und demzufolge keinen potenziellen Interaktionspartner für TRPM4 liefert.

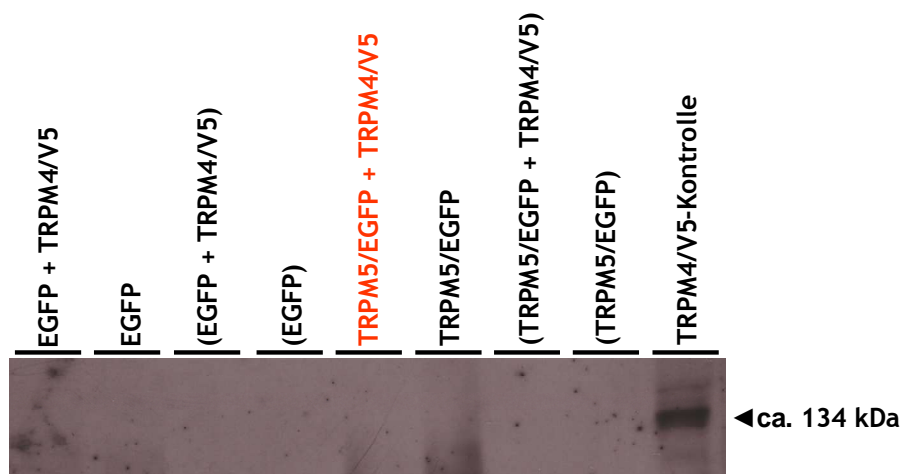
#### 3.7.2 Coimmunpräzipitation von TRPM5 und TRPM4

Die Coimmunpräzipitation sollte in zwei Ansätzen parallel durchgeführt werden. In einem Ansatz wurde der V5-spezifische Antikörper für die Präzipitation von TRPM4/V5 benutzt und der EGFP-spezifische Antikörper für den anschließenden *Western Blot* verwendet. Im zweiten Ansatz wurde der EGFP-spezifische Antikörper für die Proteinpräzipitation und der V5-spezifische Antikörper für den *Western Blot* verwendet.

Das Ergebnis des ersten Ansatzes konnte nicht ausgewertet werden, da der EGFP-spezifische Antikörper im *Western Blot* schon in Kontrollansätzen, die gar kein TRPM5/EGFP enthielten, Hintergrundbanden von ca. 160 kDa erzeugte, welche ziemlich genau dem Molekulargewicht des Fusionsproteins TRPM5/EGFP entsprechen (Daten nicht gezeigt). Im zweiten Ansatz mit



der umgekehrten Antikörperkonstellation konnte entgegen den Erwartungen keine Interaktion von TRPM5 und TRPM4 nachgewiesen werden (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: Western Blot zur Untersuchung der Interaktion von TRPM5 und TRPM4.**

Um die Interaktion von TRPM5 und TRPM4 zu untersuchen, wurden die EGFP- bzw. V5-gekoppelten Proteine in HEK 293-Zellen coexprimiert. Die Coimmunpräzipitation erfolgte mit dem EGFP-spezifischen Antikörper und der anschließende, hier abgebildete *Western Blot* mit dem V5-spezifischen Antikörper. Das Molekulargewicht des TRPM4/V5-Proteins beträgt ca. 134 kDa. Die Spuren stellen unterschiedliche Transformationsansätze dar; oben sind die in HEK 293-Zellen exprimierten Proteine angegeben. Derjenige Ansatz, der die Interaktion von TRPM5 und TRPM4 anzeigen soll, ist rot markiert; Negativkontrollen ohne den EGFP-spezifischen Antikörper sind eingeklammert. TRPM4/V5-Kontrolle = 100 µg Proteinextrakt aus pcDNA4TO-V5-TRPM4b-transfizierten HEK 293-Zellen.

### 3.8 Knock down von TRPM5 durch RNAi

Um die Funktion von TRPM5 mit Hilfe der RNAi-Technologie zu untersuchen, sollte die Methode zunächst in Zellkultur etabliert werden. Für die gezielte Herunterregulation des murinen und humanen *TRPM5*-Gens sollten zwei siRNA-Sequenzen ausgesucht und getestet werden. Die aus den Zellkulturexperimenten gewonnenen Daten bezüglich der Effizienz der gewählten siRNA-Sequenzen sollten anschließend zur Generierung eines transgenen *Trpm5*-*knock down*-Mausmodells dienen. Zum besseren Verständnis der siRNA-vermittelten Genherunterregulation in den nachfolgenden Experimenten werden im folgenden Kapitel die Grundlagen des RNAi-Mechanismus beschrieben. Übersichtsartikel zu dem Thema bieten Caplen, 2004, Dorsett und Tuschl, 2004 sowie Shankar *et al.*, 2005.

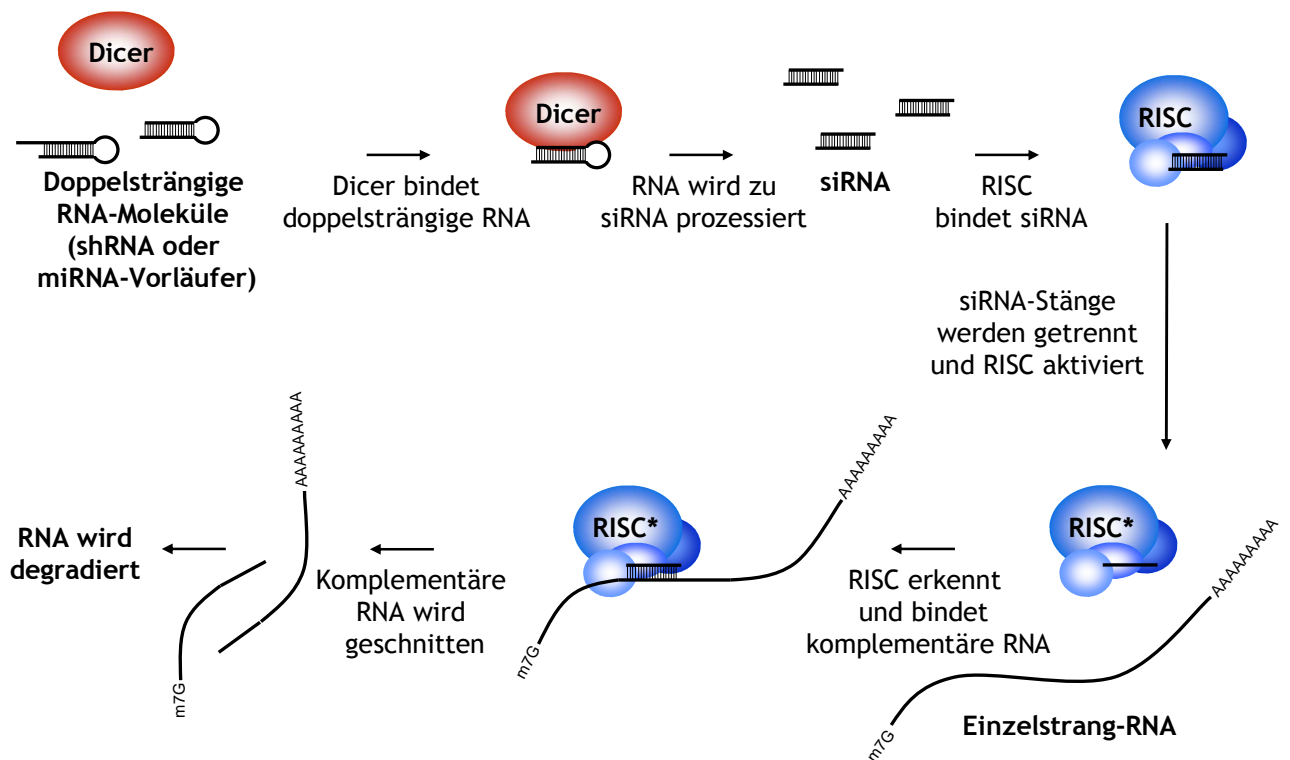
#### 3.8.1 Der RNAi-Mechanismus

Der Begriff RNAi (*RNA interference*) beschreibt einen post-transkriptionellen Mechanismus zur Herunterregulation der Genexpression, der durch kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, die siRNAs (*small interfering RNAs*), vermittelt wird. Im Gegensatz zum vollständigen

Ausschalten eines Gens, wie es bei dem *Knock out*-Verfahren der Fall ist, wird die Expression bei der RNAi-Technologie lediglich verringert, was als *Knock down* bezeichnet wird.

Der RNAi-Mechanismus wurde 1998 erstmals beschrieben. In *C. elegans* konnte durch Injektion langer, doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) eine sequenzspezifische Degradation von mRNA induziert werden, die zur gezielten Genstilllegung (engl. *gene silencing*) führte (Fire *et al.*, 1998). Die Entdecker der RNA-Interferenz, A. Fire und C. Mello, erhielten 2006 den Nobelpreis für Medizin. Bald nach der initialen Beschreibung stellte sich heraus, dass es sich um einen evolutionell konservierten Mechanismus handelt, der sowohl bei Prokaryoten als auch bei Pflanzen und Pilzen, *Drosophila melanogaster* und vielen weiteren Eukaryoten in ähnlicher Form wie bei *C. elegans* existiert. Später konnte gezeigt werden, dass die dsRNA-Moleküle in der Zelle zu 21-28 Nukleotiden langen siRNA-Molekülen prozessiert werden, die den sequenzspezifischen Abbau der mRNA dirigieren. Für Säugetierzellen konnte das neue Werkzeug zur Herunterregulation der Genexpression zunächst nicht verwendet werden, weil die langen dsRNA-Moleküle die Interferon-Antwort hervorriefen; diese stellt einen zellulären Schutzmechanismus gegen Virusinfektionen dar und führt zum unspezifischen mRNA-Abbau und zur Einstellung der Proteinsynthese. Zwei Arbeitsgruppen hatten jedoch unabhängig voneinander die Idee, synthetische siRNAs zu verwenden, um die Interferon-Antwort zu umgehen, und so fand der RNAi-Mechanismus schließlich auch in Säugetierzellen Anwendung (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001).

Ein natürlich vorkommender RNAi-Mechanismus wird in der Zelle durch kleine RNA-Moleküle, die miRNAs (*micro RNAs*), ausgelöst. Meist sind solche miRNAs an der Regulation von Kontrollgenen der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Sie bestehen ähnlich wie die siRNA-Moleküle aus 21-22 Nukleotiden langen Doppelsträngen, die mit Hilfe des Dicer-Enzyms aus 70-80 Nukleotiden langen haarnadelförmigen Vorläufer-Molekülen prozessiert werden. Ist die miRNA-Sequenz mit der Zielsequenz in der mRNA vollständig identisch, so wird die Degradation der mRNA auf die gleiche Weise induziert wie im Falle einer synthetischen siRNA (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23: Herunterregulation der Genexpression mittels RNAi in Säugetierzellen.**

Doppelsträngige RNA-Moleküle, beispielsweise Vorläufer von miRNA (*micro RNA*) oder synthetische shRNA (*short hairpin RNA*), werden in der Zelle durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer in 21-28 Nukleotiden lange siRNA (*small interfering RNA*)-Moleküle prozessiert. Diese besitzen an ihren 3'-Enden zwei Nukleotiden lange Überhänge. Der RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Proteinkomplex erkennt diese Struktur, bindet die siRNA und trennt die zwei RNA-Stränge voneinander durch seine Helicase-Aktivität. Einer der RNA-Stränge bleibt an den RISC-Komplex gebunden, wobei derjenige Strang bevorzugt wird, der am 5'-Ende die niedrigere thermodynamische Stabilität besitzt (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Dieser Strang wird als Matrize benutzt, um komplementäre RNA-Sequenzen im Zytoplasma zu detektieren. Sobald eine komplementäre mRNA bzw. einzelsträngige RNA identifiziert wird, kann RISC diese binden und schneiden. Die geschnittene mRNA wird schnell degradiert, wodurch die Translation zum Protein unterbunden wird. Da der RISC-gebundene RNA-Strang gegen RNasen geschützt ist, können durch ein einziges siRNA-Molekül mehrere Ziel-RNAs nacheinander abgebaut werden. (nach Shankar *et al.*, 2005; Abbildung leicht verändert in Prawitt *et al.*, 2004 veröffentlicht).

### 3.8.2 Knock down des humanen und murinen *TRPM5*-Gens in Zellkultur

#### 3.8.2.1 Auswahl der *TRPM5*-spezifischen siRNA-Sequenzen

Die Auswahl der siRNA-Sequenzen erfolgte nach dem *SiRNA user guide* von T. Tuschl, S. Elbashir, J. Harborth und K. Weber (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Um einen möglichst effizienten *Knock down*-Effekt zu erzielen, sollte das siRNA-Molekül aus zwei 21 Nukleotiden langen RNA-Strängen bestehen; diese sollten in der Weise miteinander paaren, dass an den 3'-Enden Überhänge von jeweils zwei Nukleotiden entstehen. Die 3'-Überhänge bestehen dabei idealerweise aus den Desoxyribonukleotiden „TT“. Die Zielsequenz, die letztendlich die Sequenz des siRNA-Moleküls vorgibt, sollte in der cDNA des Gens mindestens 50 bis 100 Basenpaare von dem Start-Codon entfernt liegen



### Murine *Trpm5*-cDNA

```

1 - atgcaaacaa ccagagctc ctgcccggc agccccccag atactgagga tggctgggag cccatcctat gcaggggaga
81 - gatcaacttc ggagggtctg ggaagaagcg agggcaagctt gtgaagggtgc caagcagtggt ggccccctcc gtgctttttg
161 - aactcctgct caccgagtgg caccctgccag ccccacactt ggtggtgtcc ctggtgggtg aggaacgacc tttggctatg
241 - aagtcgtggc ttcgggatgt cctgcgcgaag gggctggtga aagcagctca gagcacaggt gcctggatcc tgaccagtgc
321 - cctccacgtg ggctggccc gccatgttgg acaagctgta cgtgatcact ctctggctag cacatcccac aagatccctg
401 - tagtggccat cggaatggcc tctctggatc gaatccttca ccgtcaactt ctagatgggt tccaccaaaa ggaggatact
481 - cccatccact acccagcaga tgagggcaac attcagggac ccctctgccc cctggacagc aatctctccc acttcatcct
561 - tgtggagtca ggccgcttg gtagtgggaa cgacgggctg acagagctgc agctgagcct ggagaagcac atctctcagc
641 - agaggacagg ttatgggggc accagctgca tccagatacc tgtcctttgc ctggtgggtca atggtgacct caaccacctc
721 - gagaggattt ccagggcagt ggagcaggct gccccatggc tgatcctggc aggttctggt ggcattgctg atgtactcgc
801 - tgccctgggt agccagcctc atctcctggt gcccagggtg gctgagaagc agttcagaga gaaattcccc agtggatggt
881 - tctcttggga agccattgta cactggacag agctgttaca gaacattgct gcacaccccc acctgctcac agtatgtgac
961 - ttcgagcagg aggttcgga ggacctggac actgtcatcc tcaaggcact tgtgaaagcc tgcaagagcc acagccaaga
1041 - agcccaagac tacctagatg agctcaagtt agcagtggcc tgggatcgcg tggacattgc caagagtga atcttcaatg
1121 - gggcgtgga atggaagtcc tgtgacttgg aagaggtgat gacagatgcc ctctgagca acaagctga atcttgcctg
1201 - ctctttgtgg acagcgtgct tgacatggcc gaggttctga cctatgggcy gctgcagcag ctttaccatt ctgtgtcccc
1281 - caagagctc ctctttgac tctgctcagc taagcatgag gagggtaggc tgacactggc cggcctgggt gccagcagg
1361 - ctccgggact gccattggt ctgctcctcc tctcactcca cgaggtctcc cgcgtactca aagacttccct gcctgacgcc
1441 - tgccgtggct tctaccagga cgggcgcagg atggaggaga gagggccacc taagcggccc gcaggcaga agtggctgcc
1521 - agacctcagt aggaagagt aagacccttg agggatctg ttcctctggg ctgtgctgca gaatcgttat gatatggca
1601 - catacttctg ggccatgggc cgggaggggt tggctgctgc tctggctgcc tgcaagatca taaaggaaat gtcccacctg
1681 - gagaaagagg cagaggtggc ccgcaccatg cgtgaggcca agtatgagca gctggccctg gatctttctc cagagtgcta
1761 - cggcaacagt gaggaccgtg cctttgccct gctggtgcca aggaaccaca gctggagcag gaccacgtgc ctgacctg
1841 - ccaactgaa ctagccaag gcttctttg gccatgacgg tgtgcaagca tctctgacca agatctgggtg gggagacatg
1921 - gccacaggca caccatcct acggcttctg ggtgccttca cctgccagc cctcatctac acaaacctca tctccttcag
2001 - tgaggatgcc ccgcagagga tggacctaga agatctgcag gaggcagaca gcttggatat ggaagagayc ttctatgca
2081 - gccgggggtg ccaattggag aagctaacag aggcaccaag ggctccaggc gatctaggcc cacaagctgc tctctgctc
2161 - acaaggtgga ggaagtctg gggcgcctct gctgactgtg tctctgggaa tgtggctcag tacttgcctc ttctctctc
2241 - gttcacctat gtctgctgg tggacttcag gccaccacc caggggccgt ctggatccga ggttaccctc tatttctggg
2321 - tgttcacact ggtgctggag gaaatccgac agggcttctt cacagatgag gacacgcacc tggatgagaa atctactctg
2401 - tatgtggaag acaactggaa caagtgtgac atgggtggca tcttctctgt catgtggga gtcacctgta gaatggctcc
2481 - ctccgtggtt gaggctggca ggaccgttct ggccattgac ttcctggtgt tccacttccg gctcatccac atctttgcta
2561 - ttcacaagca gttgggtcct aagatcatca ttgtagagcg aatgatgaag gatgtcttct ttttctctt cttctgagc
2641 - gtatggcttg tggcctatgg tgtgacctc caggccctgc tgcaccccca tgatggccct tggagtgga ttttccgccc
2721 - tgtgctatcc aggccttacc tgcagatctt tgggcaaatc cctctggatg aaattgatga ggctcgtgtg aactgttctc
2801 - ttcaccctct gctgctggaa agctcggctt cctgcccata tctctatgct aactggctgg tcatctctct gctgggtacc
2881 - ttcctgcttg tcaactaatg gctgctcatg aacctctgta tgcctatgt cagctacaca ttcagggtgg tgcaaggcaa
2961 - tgacagacatg ttctggaagt ttcaacgcta ccacctcatc gttgaatacc atggaagacc agctctggcc ccgccctca
3041 - tctctgctcag ccacctgagc ctggtgctca agcaggtctt caggaaggaa gccagcata agcgacaaca tctggagaga
3121 - gacttgctg accccttggc ccagaagatc attacctggg aaacgggttca aaaggagaac ttctgagta ccattggaga
3201 - acggaggagg gacagcagg gggaggtgct gaggaaaac gcacacagag tggacttgat tgccaaatac atcggggggc
3281 - tgagagagca agaaaagagg atcaagtgtc tggaaatcaca ggccaactac tgtatgctcc tctgtctctc tatgacggat
3361 - acaactggctc caggaggcac ctactcaagc tctcagaact gtggttgacg gagtacagca gcctctgcta gagacagggg
3441 - gtacctagag tctggcttgc caccctctga cacctgca

```

**Abbildung 3.24: TRPM5-spezifische siRNAs und ihre Zielsequenzen in der humanen und murinen cDNA.** Die Zielsequenzen (blau: TRPM5-siRNA1; rot: TRPM5-siRNA2) wurden nach den Vorgaben von T. Tuschl, S. Elbashir, J. Harborth und K. Weber gewählt. Oben sind die daraus abgeleiteten Sequenzen der siRNA-Moleküle dargestellt. TRPM5-siRNA1 kann sowohl für das humane als auch das murine Transkript verwendet werden, während TRPM5-siRNA2 spezifisch für das murine Transkript ist.

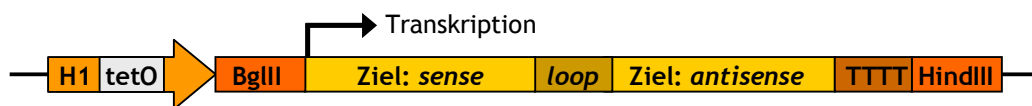
#### 3.8.2.2 RNAi-Konstrukte

RNAi-Konstrukte ermöglichen eine kontinuierliche Expression der gewünschten siRNA in einem Zellsystem oder Modellorganismus. In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNAi-Versuchen wurde der Tetrazyklin (Tet)-regulierbare shRNA-Expressionsvektor pTER verwendet (Van de Wetering *et al.*, 2003). Eine shRNA (*short hairpin RNA*) hat die Form einer Haarnadel; sie enthält zwei komplementäre RNA-Stränge, die durch eine kurze Schleife (engl. *loop*) voneinander getrennt sind. Die shRNA wird in der Zelle ähnlich wie die miRNA durch Dicer zu siRNA prozessiert (siehe Abbildung 3.23).

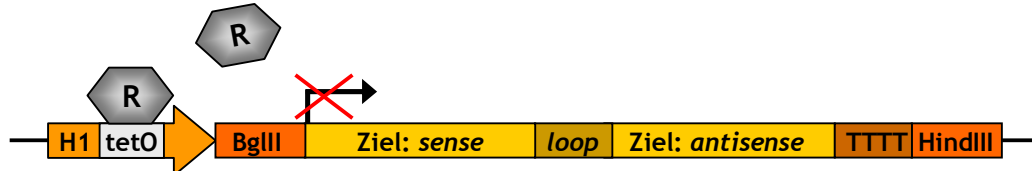
Das pTER-Plasmid wurde von Van de Wetering und Mitarbeitern aus dem pSUPER-Vektor hergestellt, indem der H1-Promotor des Vektors mit der Tet-Operatorsequenz (siehe unten) versehen wurde (Brummelkamp *et al.*, 2002; Van de Wetering *et al.*, 2003). Der H1-Promotor ist ein humaner RNA-Polymerase III-Promotor des *H1*-Gens. Das Genprodukt, die *H1*-RNA, stellt eine Komponente der nukleären RNase P dar. Vorteile dieses Promotors sind eine klar definierte Transkriptionsstartstelle sowie eine effektive Terminationssequenz, die aus fünf Thymin-Nukleotiden („TTTTT“) besteht (Myslinski *et al.*, 2001). Das fertige Transkript besitzt einen Überhang von zwei Uracil-Nukleotiden („UU“).

Das Tet-System basiert auf dem Tetrazyklin-Resistenz-Operon von *E. coli*. Die hier verwendete Variante nutzt die natürliche Eigenschaft des bakteriellen Tet-Repressors an den Tet-Operator zu binden und so die Transkription des nachgeschalteten Gens zu blockieren (Yao *et al.*, 1998). Durch das Vorschalten eines Tet-Operators wird die Expression der shRNA durch Tetrazyklin bzw. das Tetrazyklin-Analogon Doxzyklin regulierbar, denn das Antibiotikum verursacht eine Konformationsänderung des Repressors, wodurch dessen Funktion verhindert wird. Enthält eine Zelle nur das pTER-Konstrukt, wird die shRNA konstitutiv exprimiert (Abbildung 3.25 A). Für die Regulation der shRNA-Expression ist der Tet-Repressor notwendig, der beispielsweise durch ein zweites Konstrukt exprimiert werden kann. Tet-Repressor-Moleküle binden an die Tet-Operatorsequenz des H1-Promotors und blockieren so die Funktion des Promotors (Abbildung 3.25 B). Die Zugabe von Tetrazyklin führt zur Konformationsänderung der Repressormoleküle, wodurch deren Bindung an den Tet-Operator unterbunden wird. Dadurch ist die Promotoraktivität wieder hergestellt und die shRNA wird exprimiert (Abbildung 3.25 C).

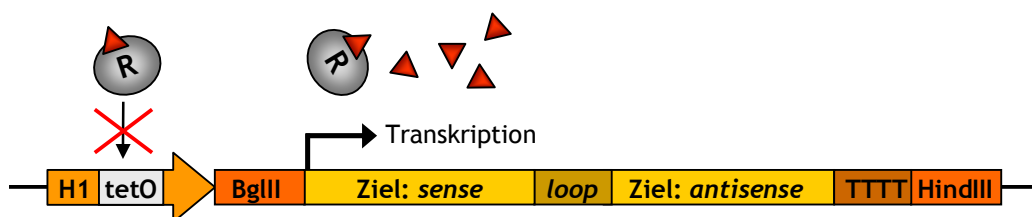
A. Konstitutive shRNA-Expression durch das pTER-Plasmid



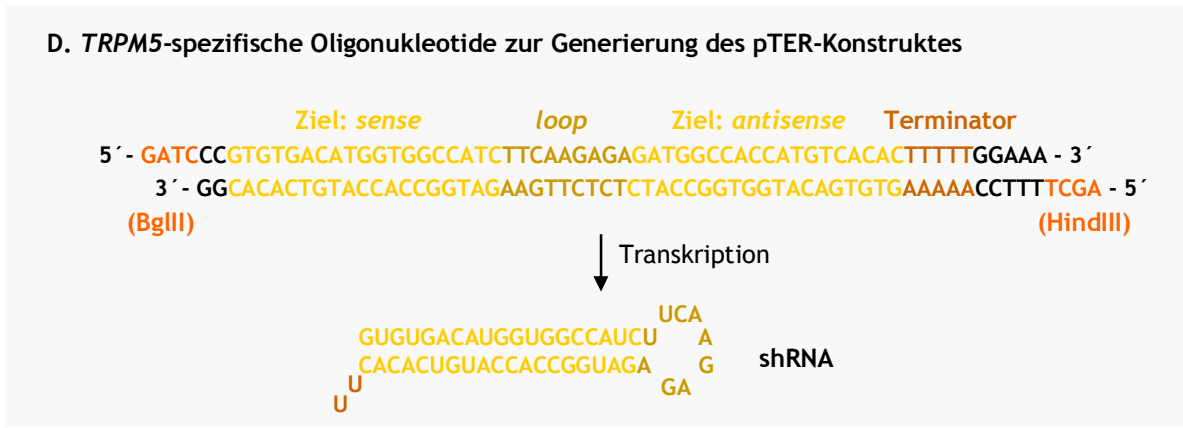
B. Funktion des Tet-Repressors (R)



C. Blockieren des Tet-Repressors mit Tetracyclin (Δ)



D. *TRPM5*-spezifische Oligonukleotide zur Generierung des pTER-Konstruktes



**Abbildung 3.25: Tetracyclin-regulierbare shRNA-Expression mit dem pTER-Plasmid.**

**A.** Die in pTER über die Restriktionsschnittstellen BglIII und HindIII eingefügte Sequenz wird unter der Kontrolle des H1-Promotors konstitutiv exprimiert. **B.** Wird der Tet-Repressor (R) coexprimiert, bindet er an den Tet-Operator (tetO) und blockiert die Transkription. **C.** Tetracyclin verursacht eine Konformationsänderung des Tet-Repressors, wodurch dessen Bindung an den Tet-Operator unterbunden wird. Dadurch kann die Transkription wieder stattfinden. **D.** Zur Herstellung *TRPM5*-spezifischer pTER-Konstrukte werden zwei bis auf die Enden komplementäre Oligonukleotide, die *TRPM5*-spezifische Sequenzen in *sense*- und *antisense*-Orientierung enthalten, gepaart und über BglIII und HindIII in pTER eingefügt. *Sense*- und *antisense*-Sequenz sind durch eine Schleifenregion (*loop*) voneinander getrennt. TTTTT stellt das Terminationssignal der Transkription dar. Das haarnadelförmige shRNA-Transkript wird im Zytoplasma durch das Dicer-Enzym zu siRNA prozessiert. Abgebildet ist das Oligonukleotidpaar pTER-M5-F/R für die Herstellung des pTER-*TRPM5*-siRNA1-Konstruktes.

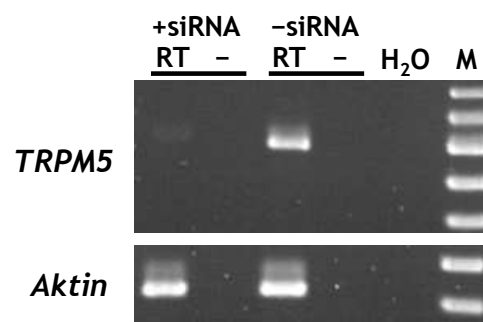
Für die Generierung von pTER-Konstrukten, die *TRPM5*-spezifische shRNA exprimieren, wurden Oligonukleotide der gewünschten Sequenz gepaart und in den pTER-Vektor eingefügt. Die Oligonukleotidpaare pTER-M5-F/R (für *TRPM5*-siRNA1) bzw. pTER-M5-

murin-F/R (für TRPM5-siRNA2) enthielten die *TRPM5*-spezifischen Zielsequenzen in *sense*- und *antisense*-Orientierung, die Terminationssequenz „TTTTT“ sowie geeignete Überhänge für die Insertion in das pTER-Plasmid über die Restriktionsschnittstellen BglIII und HindIII. Zwischen *sense*- und *antisense*-Sequenz liegen neun Nukleotide („TTCAAGAGA“), die durch Bildung einer Schleife („UUCAAGAGA“; Brummelkamp *et al.*, 2002) die Rückfaltung des Transkriptes zu einer shRNA ermöglichen. In der Abbildung 3.25 D sind die Oligonukleotide zur Generierung des pTER-TRPM5-siRNA1-Konstruktes dargestellt. Auf die gleiche Weise wurde pTER-TRPM5-siRNA2 hergestellt. Die fertigen Konstrukte wurden durch Sequenzierung der eingefügten Sequenzen und der Übergänge in das Plasmid überprüft.

### 3.8.2.3 Knock down von *TRPM5* mit siRNA-Molekülen und dem RNAi-Plasmid pTER

Die Funktionalität der ausgesuchten siRNA-Sequenzen wurde in *TRPM5*-überexprimierenden M1-Zellen (siehe Kapitel 3.2) überprüft. Die Zielsequenz der *TRPM5*-siRNA1 (siehe Abbildung 3.24), welche sowohl in der humanen als auch murinen cDNA vorhanden ist, sollte für die Herunterregulation beider Transkripte geeignet sein. Zunächst wurde die *Knock down*-Effizienz synthetischer siRNA-Moleküle und pTER-exprimierter shRNA anhand dieser Sequenz verglichen. Die *TRPM5*-siRNA1 wurde von der Firma Dharmacon hergestellt.

M1-Zellen wurden mit einem siRNA/Lipofectamin-Gemisch transfiziert und die RNA der Zellen nach 24 Stunden isoliert. Der *Knock down*-Effekt wurde mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Die Herunterregulation des *TRPM5*-Transkriptes war nach 25 Amplifikationszyklen deutlich zu sehen (Abbildung 3.26).

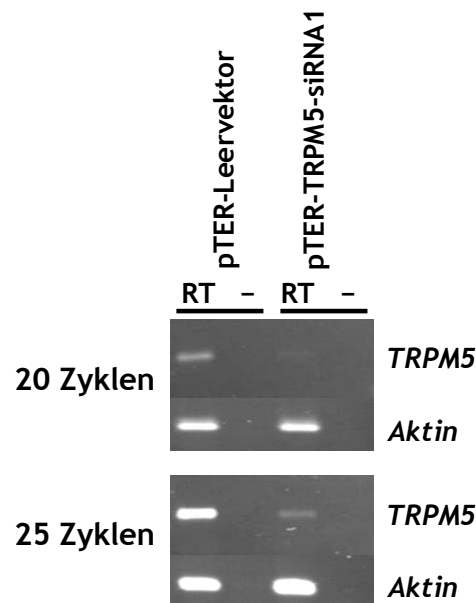


**Abbildung 3.26: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *TRPM5* mit siRNA.**

*TRPM5*-überexprimierende M1-Zellen wurden mit *TRPM5*-siRNA1 transfiziert und der RNAi-Effekt nach 24 Stunden auf RNA-Ebene untersucht. Die RT-PCRs mit den Oligonukleotiden *TRPM5*-F17F/21R bzw. Aktin-F/R wurden mit 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. +siRNA = *Knock down*-Ansatz, -siRNA = Kontrolle ohne siRNA, RT = RT-Ansatz, - = Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase, M = 100 bp-Marker.



Um herauszufinden, ob der mit siRNA-Molekülen erzielte *Knock down*-Effekt mit dem RNAi-Konstrukt reproduzierbar ist, wurden M1-Zellen mit pTER-TRPM5-siRNA1 transient transfiziert und die RNA nach 24 Stunden extrahiert. Auch hier konnte mittels RT-PCR ein deutlicher *Knock down* von *TRPM5* nach 20 und 25 Amplifikationszyklen nachgewiesen werden (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *TRPM5* mit dem pTER-Konstrukt.**

24 Stunden nach Transfektion der M1-Zellen mit pTER-TRPM5-siRNA1 wurde der RNAi-Effekt auf RNA-Ebene untersucht. Die RT-PCRs mit den Oligonukleotiden TRPM5-F17F/21R bzw. Aktin-F/R wurden mit 20 und 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. RT = RT-Ansatz, – = Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase.

#### 3.8.2.4 *Knock down*-Effizienz der pTER-Konstrukte

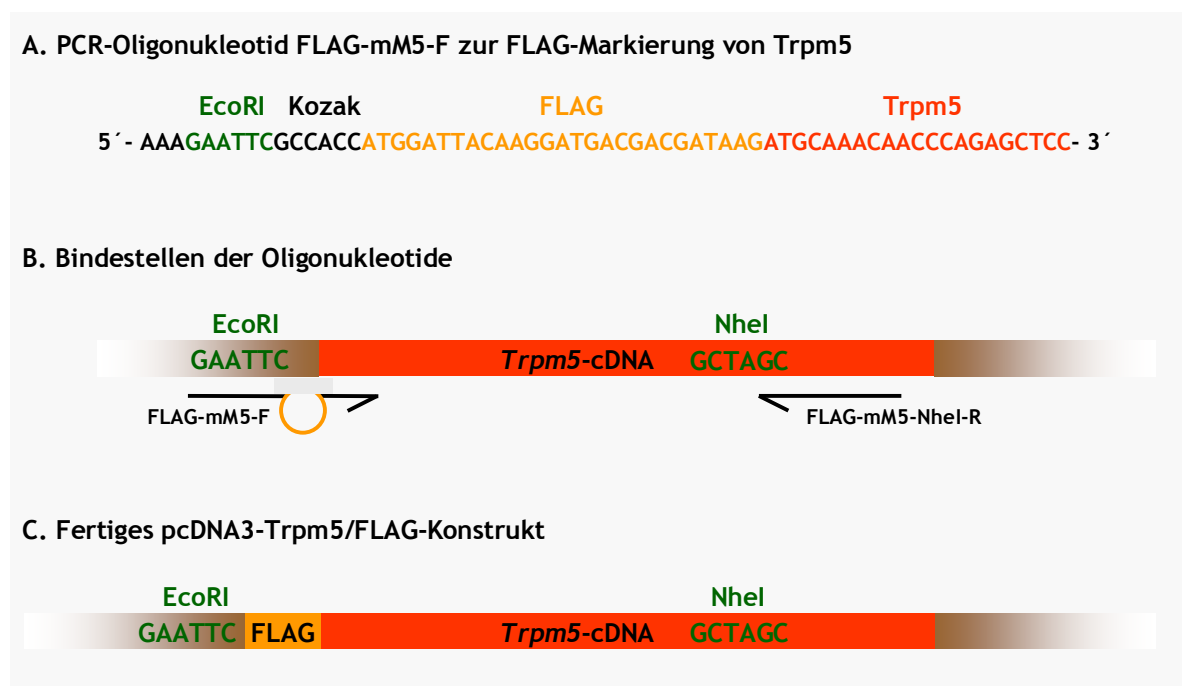
In Zellkulturexperimenten sollte die Effizienz der zwei hergestellten RNAi-Konstrukte pTER-TRPM5-siRNA1 und TRPM5-siRNA2 verglichen werden. Wird durch eines der pTER-Konstrukte eine ausreichende *Knock down*-Effizienz erzielt, eignet sich dieses Konstrukt für die Generierung eines transgenen *Trpm5-knock down*-Mausmodells.

#### *Herunterregulation von transgenem Trpm5/FLAG*

Die shRNA- bzw. siRNA-Funktionalität sollte mittels *Western Blot* auf Proteinebene nachgewiesen werden. Da kein geeigneter Antikörper für das murine *Trpm5* zur Verfügung stand, sollte das Protein am N-terminus mit einem FLAG-Affinitäts-tag versehen werden. Zur Generierung eines *Trpm5/FLAG*-exprimierenden Konstruktes wurde die *Trpm5*-cDNA zunächst mit *EcoRI* und *NotI* aus dem pHGCX-*Trpm5*-Expressionsplasmid herausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in das zuvor geschnittene pcDNA3-Plasmid

eingefügt. Das fertige pcDNA3-Trpm5-Konstrukt wurde durch Sequenzierung der *Trpm5*-cDNA sowie der Übergänge in den Vektor überprüft.

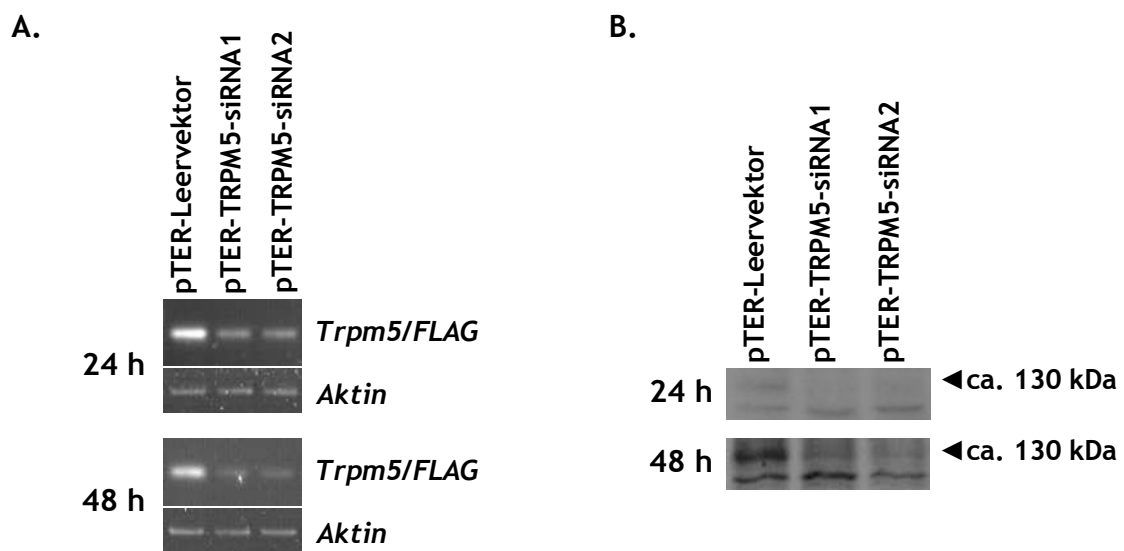
Im zweiten Schritt wurde FLAG in einer PCR-Reaktion an die *Trpm5*-cDNA gekoppelt. Das pcDNA3-Trpm5-Konstrukt diente dabei als Matrize. Durch das vorwärts gerichtete PCR-Oligonukleotid FLAG-mM5-F wurde die FLAG-Sequenz mit einer EcoRI-Schnittstelle und der Kozak-Konsensussequenz vor die *Trpm5*-cDNA eingefügt (Abbildung 3.28 A). Das rückwärts gerichtete Oligonukleotid FLAG-mM5-NheI-R wurde so gewählt, dass das fertige PCR-Produkt eine in der *Trpm5*-cDNA vorhandene NheI-Schnittstelle überspannt (Abbildung 3.28 B). Das PCR-Produkt und das pcDNA3-Trpm5-Konstrukt wurden mit EcoRI und NheI geschnitten und ligiert (Abbildung 3.28 C). Die eingefügte Sequenz sowie angrenzende Bereiche wurden durch Sequenzierung überprüft.



**Abbildung 3.28: Generierung des pcDNA3-Trpm5/FLAG-Konstruktes.**

**A.** Das vorwärts gerichtete PCR-Oligonukleotid FLAG-mM5-F enthält neben den ersten Nukleotiden der *Trpm5*-cDNA eine EcoRI-Schnittstelle, eine Kozak-Konsensussequenz und die FLAG-Sequenz. **B.** Das mit den Oligonukleotiden FLAG-mM5-F und FLAG-mM5-NheI-R hergestellte PCR-Produkt überspannt eine in der *Trpm5*-Sequenz vorhandene NheI-Schnittstelle. **C.** Das PCR-Produkt und das pcDNA3-Trpm5-Konstrukt wurden über die Schnittstellen EcoRI und NheI zusammengefügt. Im fertigen Konstrukt liegt die FLAG-Sequenz direkt vor der *Trpm5*-cDNA, im selben Leseraster wie diese.

Für die Herunterregulation von *Trpm5*/FLAG wurden murine MIN6-Zellen mit dem pcDNA3-*Trpm5*/FLAG-Konstrukt und jeweils einem der zwei pTER-Konstrukte cotransfiziert. Um genügend shRNA bzw. siRNA für einen effizienten *Knock down* zu erhalten, wurden die Plasmide dazu in einem Verhältnis von 2 (pTER) zu 1 (pcDNA3-*Trpm5*/FLAG) eingesetzt. Die RNA und Proteine der Zellen wurden 24 und 48 Stunden nach Transfektion extrahiert, um die Herunterregulation von *Trpm5*/FLAG mittels semiquantitativer RT-PCR und *Western Blot* nachzuweisen. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene war der *Knock down*-Effekt nach 48 Stunden deutlicher zu sehen als nach 24 Stunden. In der *Knock down*-Effizienz der pTER-Konstrukte konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.29).



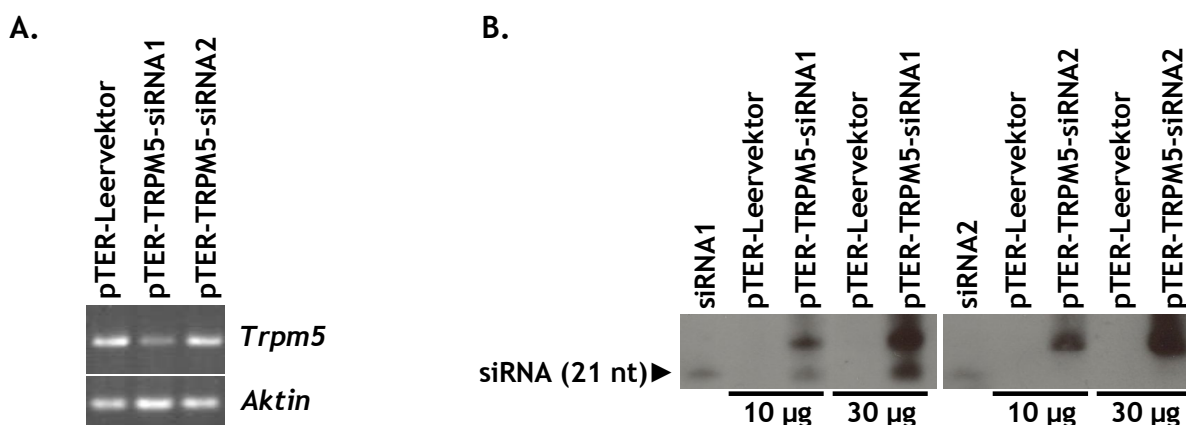
**Abbildung 3.29: Semiquantitative RT-PCR und *Western Blot* zum Nachweis der Herunterregulation von *Trpm5*/FLAG mit pTER-Konstrukten.**

Murine MIN6-Zellen wurden mit pcDNA3-*Trpm5*/FLAG und jeweils einem der pTER-Konstrukte cotransfiziert. RNA- und Proteinextraktion erfolgten 24 und 48 Stunden nach Transfektion. **A.** Semiquantitative RT-PCR mit 18 Amplifikationszyklen für das *Trpm5*/FLAG-Transkript und 20 Zyklen für *Aktin*. Die RT-PCRs wurden mit den Oligonukleotiden mM5-FLAG-F/R und Maus-Aktin-F/R durchgeführt. **B.** *Western Blot* mit FLAG-spezifischem Antikörper zum Nachweis von *Trpm5*/FLAG. Das Molekulargewicht von *Trpm5*/FLAG beträgt ca. 130 kDa.

### ***Herunterregulation von endogenem Trpm5***

In der murinen Betazelllinie MIN6-Zellen wurde im nächsten Schritt überprüft, ob endogen exprimiertes *Trpm5* mit den pTER-Konstrukten herunterreguliert werden kann. Dazu wurden die Zellen mit je einem der pTER-Konstrukte transfiziert und die RNA nach 48 Stunden extrahiert. Die Herunterregulation von *Trpm5* war mit dem pTER-TRPM5-siRNA1-Konstrukt deutlicher zu sehen als mit pTER-TRPM5-siRNA2 (Abbildung 3.30 A).

Um die Effizienz der pTER-Konstrukte weiter zu vergleichen, sollte die Expression der shRNA bzw. siRNA mittels *Northern Blot* nachgewiesen werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Zellen, die 48 Stunden nach Transfektion isoliert wurde, auf einem 12 % Polyacrylamid (PAA)/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die TRPM5-siRNA1 und TRPM5-siRNA2 wurden mit spezifischen Sonden (pTER-Hu-Sonde für siRNA1 und pTER-murin-Sonde für siRNA2) auf dem *Northern Blot* nachgewiesen. Während die TRPM5-siRNA1 deutliche Signale lieferte, konnten keine TRPM5-siRNA2-spezifischen Banden detektiert werden (Abbildung 3.30 B).



**Abbildung 3.30: RT-PCR und *Northern Blot* zum Nachweis der *Trpm5*-Herunterregulation und siRNA-Expression durch pTER-Konstrukte.**

MIN6-Zellen wurden mit den pTER-Konstrukten transfiziert und die RNA nach 48 Stunden extrahiert. **A.** Semiquantitative RT-PCR zum Vergleichen der *Knock down*-Effizienz. Die RT-PCRs mit den Oligonukleotiden *Trpm5*-20F/22R und Maus-Aktin-F/R wurden mit 25 (*Trpm5*) bzw. 20 Amplifikationszyklen (*Aktin*) durchgeführt. **B.** *Northern Blot* zum Nachweis der siRNA-Expression. Jeweils 10 und 30 µg GesamtrNA wurden auf 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Die aufgetrennten RNAs wurden mittels Elektroblothing auf eine Nylonmembran übertragen und die TRPM5-siRNAs mit spezifischen <sup>32</sup>P-5'-endmarkierten Sonden detektiert. Als Größenmarker dienten synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle (60 pM).

Die *Knock down*-Effizienz der pTER-exprimierten TRPM5-siRNAs wurde in verschiedenen Zellkulturversuchen vergleichend untersucht. Bei der Herunterregulation von transgenem, FLAG-gekoppelten *Trpm5* waren keine Unterschiede in der Effizienz zu erkennen, weder auf RNA-, noch auf Proteinebene. Bei der Herunterregulation von endogenem *Trpm5* in MIN6-Zellen konnte jedoch mit pTER-TRPM5-siRNA1 ein stärkerer *Knock down*-Effekt erzielt werden als mit pTER-TRPM5-siRNA2. Darüber hinaus konnte die durch pTER exprimierte TRPM5-siRNA1 im Gegensatz zur TRPM5-siRNA2 mittels *Northern Blot* nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde das pTER-TRPM5-siRNA1-Konstrukt für die Generierung der transgenen RNAi-Maus gewählt.

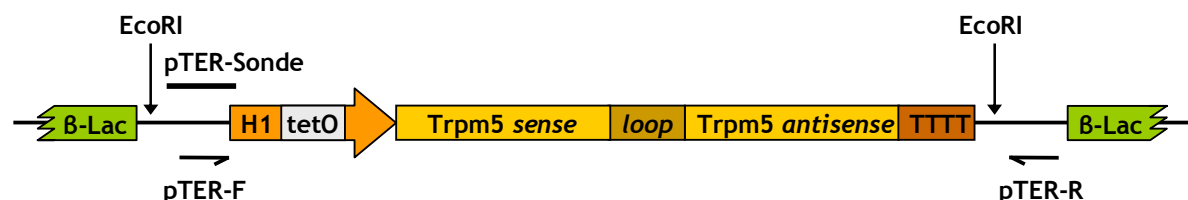
### 3.8.3 Generierung und Charakterisierung transgener *Trpm5-knock down*-Mauslinien

Die RNAi-Technologie stellt mit der teilweisen oder vollständigen Herunterregulation der Genaktivität eine attraktive Alternative zur klassischen *Knock out*-Maus dar. Im Vergleich zu der *Knock out*-Maus, die ein aufwendiges Konstrukt für die homologe Rekombination benötigt, beruht die Herstellung einer *Knock down*-Maus auf relativ einfachen Klonierungsschritten. Der Zeitaufwand für die Herstellung des Konstruktes bis hin zum fertigen Mausmodell beträgt bei der *Knock down*-Maus einige Monate, während die Herstellung einer *Knock out*-Maus mehrere Jahre dauern kann. Das RNAi-Konstrukt kann zum Beispiel als Transgen in die befruchtete Mausoozyte injiziert werden oder mit Hilfe von shRNA-exprimierenden Lentiviren in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) oder Embryonen gebracht werden.

#### 3.8.3.1 Generierung transgener *Trpm5-knock down*-Mauslinien

Die transgenen *Trpm5-Knock-down*-Mäuse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Bockamp (Toxikologie, Universität Mainz) hergestellt. Spezielle Maustechniken wie die Pronukleusinjektion, Herstellung scheinchwangerer C57BL/6-Ammenweibchen und der Transfer von Zygoten in scheinchwangere Ammenweibchen wurden von Dr. Leonid Eshkind und Swetlana Ohngemach durchgeführt.

Das pTER-TRPM5-siRNA1-Konstrukt wurde mit dem ScaI-Restriktionsenzym linearisiert und mittels Gelextraktion und Fällung aufgereinigt. Das linearisierte Konstrukt wurde in den paternalen Vorkern der befruchteten Eizelle injiziert. Den Nachkommen der Ammenweibchen wurden nach drei Wochen Schwanzbiopsien für DNA-Analysen entnommen, um potenzielle *Founder*-Tiere mittels PCR und *Southern Blot* zu identifizieren. Die Lage der verwendeten PCR-Oligonukleotide und der *Southern Blot*-Sonde ist in der Abbildung 3.31 dargestellt.



**Abbildung 3.31: PCR-Oligonukleotide und *Southern Blot*-Sonde zur Genotypisierung der transgenen *Trpm5-knock-down*-Mäuse.**

Für die Identifizierung transgener *Trpm5-knock-down*-Mäuse mittels PCR wurden die Oligonukleotide pTER-F/R verwendet. Im *Southern Blot* wurden die EcoRI verdauten DNA-Proben der Mäuse mit einer radioaktiv markierten pTER-spezifischen Sonde untersucht.  $\beta$ -Lac =  $\beta$ -Lactamase; wird bei der Linearisierung des Konstruktes durch ScaI geschnitten. Die restlichen Plasmidcharakteristika wurden in Abbildung 3.25 erläutert.

### 3.8.3.2 Identifizierung transgener *Founder*-Tiere

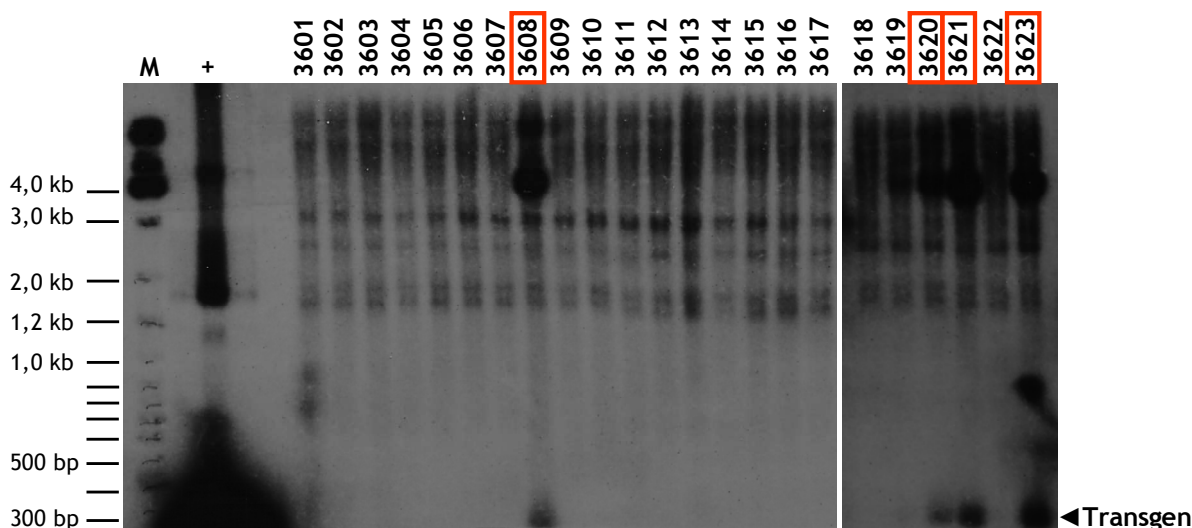
Die Pronukleusinjektion ergab 23 potenziell transgene Mäuse. Die DNA-Proben der Mäuse (nummeriert 3601-3623) wurden zunächst mittels PCR auf die Integration des Transgens untersucht. Fünf der Mäuse (3608, 3619, 3620, 3621 und 3623) wurden als positiv getestet (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32: PCR zur Identifizierung transgener *Founder*-Tiere.**

23 potenziell transgene Mäuse wurden mittels PCR auf die Integration des pTER-Transgens überprüft. Das Transgen wurde in der Schwanz-DNA mit den pTER-spezifischen Oligonukleotiden pTER-F/R nachgewiesen. Die als positiv getesteten Mäuse sind rot markiert. M = 100 bp-Marker.

Für die *Southern Blot*-Analyse wurden die DNA-Proben der Mäuse mit dem EcoRI-Restriktionsenzym verdaut. Mit einer pTER-spezifischen Sonde wurde bei den *Founder*-Mäusen 3608, 3620, 3621 und 3623 eine Bande von ca. 330 bp nachgewiesen, die der erwarteten Größe entspricht. Maus 3619 konnte nicht eindeutig als transgen identifiziert werden (Abbildung 3.33).



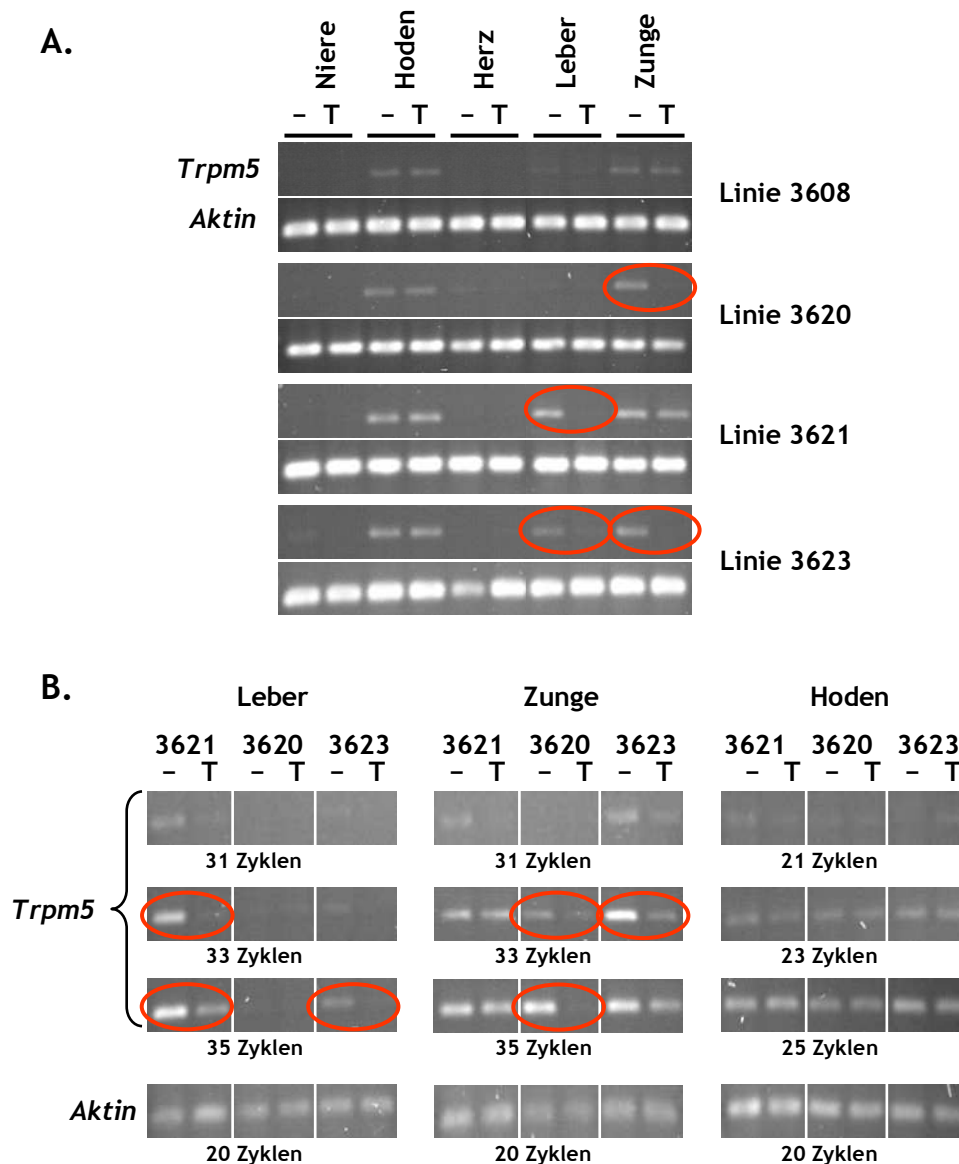
**Abbildung 3.33: *Southern Blot* zur Verifizierung transgener *Founder*-Tiere.**

Die genomische DNA der potenziell transgenen Mäuse wurde mit EcoRI verdaut und auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Die aufgetrennte DNA wurde auf eine Nylonmembran übertragen und das Transgen mit einer radioaktiv markierten pTER-spezifischen Sonde nachgewiesen. Die als positiv getesteten Mäuse sind rot markiert. + = Konstrukt-DNA, M = 2-Log-Marker.

### 3.8.3.3 *Knock down*-Effizienz in verschiedenen pTER-Mauslinien

Für die Etablierung der pTER-Mauslinien 3608, 3620, 3621 und 3623 wurden die *Founder*-Tiere mit C57BL/6-Wildtypmäusen gepaart. Da aus den Verpaarungen auch Wildtypmäuse hervorgingen, konnten diese als Kontrollmäuse für die Versuche mit transgenen Nachkommen verwendet werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwei zu vergleichende Mäuse vom selben Geschlecht sind und aus demselben Wurf stammen.

Die Nachkommen der *Founder*-Tiere, die der ersten Filialgeneration F1 entsprechen, wurden ebenso wie alle weiteren Generationen auf die Weitergabe des pTER-Transgens untersucht. Nachdem genügend transgene Nachkommen der Linien 3608, 3620, 3621 und 3623 in der F1-Generation vorhanden waren, wurde die *Knock down*-Effizienz in den verschiedenen Mauslinien getestet. Von sechs bis sieben Wochen alten Männchen wurde RNA aus Niere, Hoden, Herz, Leber und Zunge extrahiert und eine semiquantitative RT-PCR zum Nachweisen der *Trpm5*-Transkriptmenge durchgeführt. In jeder Mauslinie wurde eine transgene Maus mit einer wildtypischen Kontrollmaus verglichen. Die transgene Maus der Linie 3608 zeigte keinen Unterschied in der *Trpm5*-Transkriptmenge im Vergleich zur Wildtypmaus, wohingegen bei den anderen drei Linien eine deutliche Herunterregulation von *Trpm5* in der Leber (Linie 3621), Zunge (Linie 3620) bzw. Leber und Zunge (Linie 3623) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.34; ein Teil dieser Ergebnisse wurde in Prawitt *et al.*, 2004 veröffentlicht). In Hoden konnte bei keiner der pTER-Linien eine Reduktion der *Trpm5*-Transkriptmenge beobachtet werden. In Niere und Herz war die *Trpm5*-Expression generell sehr gering.



**Abbildung 3.34: RT-PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *Trpm5* in *Trpm5*-knock-down-Mäusen.**

Um die Herunterregulation von *Trpm5* zu untersuchen, wurde pro Mauslinie eine sechs bis sieben Wochen alte transgene Maus (T) mit einer gleichaltrigen und -geschlechtlichen Wildtypmaus (-), die aus demselben Wurf stammte, verglichen. Deutlich unterschiedliche Bandenstärken, die auf eine Herunterregulation des *Trpm5*-Transkriptes hindeuten, sind rot markiert. **A.** Der Nachweis von *Trpm5* mit den Oligonukleotiden Trpm5-20F/22R erfolgte in Niere, Herz, Leber und Zunge mit 35 Amplifikationszyklen, in Hoden mit 25 Zyklen. Der Nachweis von *Aktin* mit den Oligonukleotiden Maus-Aktin-F/R erfolgte mit 25 Amplifikationszyklen. **B.** Um die Ergebnisse in A zu verifizieren, wurden für die Mauslinien 3620, 3621 und 3623 RT und RT-PCR wiederholt. Abgebildet sind diejenigen Organe, die zumindest bei der Wildtypmaus eine *Trpm5*-Expression zeigten. Die Anzahl der Amplifikationszyklen ist angegeben. Teilweise veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2004.

Im Gegensatz zu der in MIN6-Zellen exprimierten TRPM5-siRNA1 (vgl. Abbildung 3.30) konnte die in pTER-Mäusen exprimierte siRNA nicht mittels *Northern Blot* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



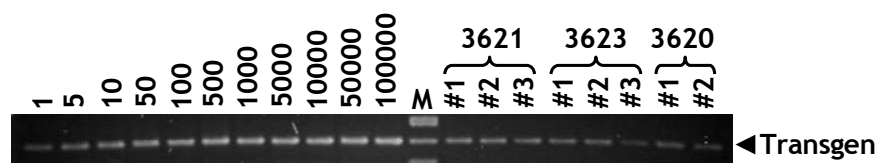
### 3.8.3.4 Quantifizierung der transgenen DNA in verschiedenen pTER-Mauslinien

Als mögliche Ursache für die unterschiedliche *Knock down*-Effizienz in den pTER-Linien sollte die Menge der in das Mausgenom integrierten transgenen DNA ermittelt werden. Die Quantifizierung der transgenen DNA erfolgte mittels PCR.

Die Masse eines integrierten Konstruktes (pro 2 µg genomischer DNA) wurde mit der folgenden Formel berechnet; hierbei wurde vorausgesetzt, dass die transgenen Tiere hemizygot sind:

$$\frac{\text{Masse der transgenen DNA } (\mu\text{g})}{1 \mu\text{g genomischer DNA}} = \frac{\text{Größe der transgenen DNA (bp)}}{2,5 \cdot 10^9 \text{ bp genomischer DNA}}$$

Zur Herstellung einer Referenzreihe mit 1-100 000 Konstruktkopien wurden elf PCR-Ansätze mit verschiedenen Verdünnungen der photometrisch quantifizierten pTER-DNA angefertigt; jedem Ansatz wurden zusätzlich 2 µg wildtypische Maus-DNA zugefügt. Parallel zu der Referenzreihe wurden PCRs mit den zu untersuchenden DNA-Proben der pTER-Mäuse durchgeführt; diese enthielten je 2 µg Maus-DNA als Matrize. Zur Auswertung wurden die Bandenintensitäten der PCR-Produkte auf einem Agarosegel verglichen. Die Analyse von zwei bis drei F1-Mäusen der pTER-Linien 3620, 3621 und 3623 zeigte, dass die pTER-Linie 3620 am wenigsten (etwa nur eine Kopie) des Transgens besitzt, während die Linie 3623 eine bis fünf und die Linie 3621 die meisten (ca. zehn Kopien) enthält (Abbildung 3.35).



**Abbildung 3.35: PCR zur Ermittlung der Transgenkopienanzahl in den pTER-Linien 3620, 3621 und 3623.**

Die PCR mit den Oligonukleotiden pTER-F/R wurde mit verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt; abgebildet sind 25 Amplifikationszyklen. Links ist die Referenzreihe mit 1-100 000 Transgenkopien, rechts sind die F1-Mäuse (2-3 pro Mauslinie) der getesteten pTER-Linien dargestellt.

Die mittels PCR ermittelte Transgenkopienanzahl in den pTER-Mäusen stimmt nicht mit der beobachteten unterschiedlichen *Knock down*-Effizienz (siehe Kapitel 3.8.3.3) überein. Obwohl bei der pTER-Linie 3623 sowohl in der Leber als auch in der Zunge eine deutliche

Herunterregulation des *Trpm5*-Transkriptes zu erkennen war, enthält diese weniger Transgene als die Linie 3621, die lediglich in der Leber einen *Knock down*-Effekt zeigte. Linie 3620 besitzt der PCR zufolge nur ein pTER-Integrat, zeigte aber eine sehr deutliche Herunterregulation von *Trpm5* in der Zunge. Ob die unterschiedlichen *Knock down*-Effekte, die in den verschiedenen pTER-Linien beobachtet wurden, mit der siRNA-Expressionsstärke korrelieren, die auch von der transkriptionellen Aktivität des Integrationsortes abhängt, konnte nicht untersucht werden.

### 3.8.3.5 Phänotypische Charakterisierung der *Trpm5-knock down*-Mäuse

Der Phänotyp der *Trpm5-knock down*-Mäuse war in keiner der pTER-Linien auffällig. Sowohl das äußere Erscheinungsbild der Mäuse als auch die Morphologie der inneren Organe waren bei *Knock down*-Mäusen und Wildtypmäusen gleich. Auch im Paarungsverhalten und in der Fruchtbarkeit der Mäuse konnten keine Abweichungen beobachtet werden.

#### *Geschmackstests*

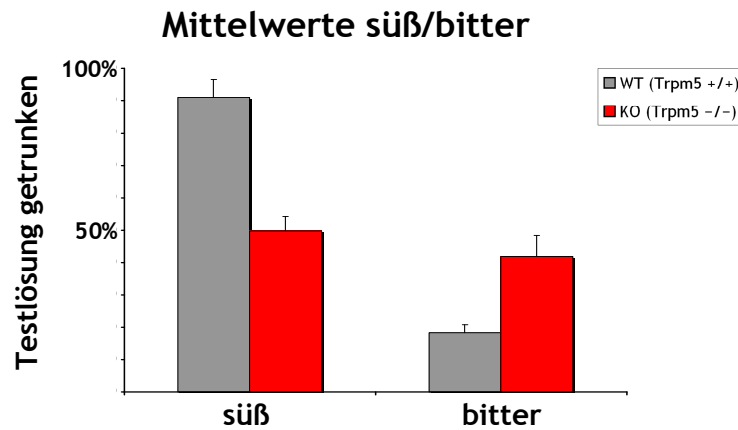
Während der Charakterisierung der pTER-Linien wurde die erste *Trpm5-knock out*-Maus veröffentlicht (Zhang, Y. *et al.*, 2003). In Geschmackstests konnte gezeigt werden, dass die *Knock out*-Maus nicht in der Lage ist, die Geschmacksrichtungen süß, bitter und *umami* zu schmecken, während sie sauer und salzig normal wahrnimmt. Der für phänotypische Analyse der *Knock out*-Maus angewandte *Two-bottle preference test*, auch *Two-bottle test* genannt, wurde auch für die Charakterisierung der pTER-Mäuse gewählt. Die von der Arbeitsgruppe Prof. Zuker (University of California, USA) zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung gestellten *Trpm5-knock out*-Mäuse (siehe Kapitel 3.9.3), die bei diesen drei Geschmacksrichtungen Auffälligkeiten zeigen, dienten als Kontrolle für den Geschmackstest.

#### *Two-bottle test mit Trpm5-knock out-Mäusen*

Als Kontrolle für die korrekte technische Durchführung der Methode und als Positivkontrolle für eine veränderte Geschmackswahrnehmung wurden vier Monate alte *Trpm5-knock out*-Mäuse, zwei Weibchen und zwei Männchen, untersucht. Da jede Maus eine aus demselben Wurf stammende gleichaltrige und -geschlechtliche Kontrollmaus benötigte, stammten diese Mäuse aus Verpaarungen zweier heterozygoter *Trpm5-knock out*-Mäuse (*Trpm5 +/-*). So konnten aus den Verpaarungen resultierende homozygote *Knock out*-Tiere (*Trpm5 -/-*) mit Wildtypmäusen (*Trpm5 +/+*) verglichen werden. Im Geschmackstest wurden die Geschmacksrichtungen süß und bitter getestet.

Die Präferenz der süßen Trinklösung sowie die Aversion bitteren Substanzen gegenüber war bei den Wildtypmäusen deutlich zu erkennen. Die *Trpm5-knock out*-Mäuse zeigten dagegen

keine Bevorzugung des mit Süßstoff versetzten Wassers und keine Abneigung gegen die bittere Trinklösung, denn die Trinkmenge betrug bei beiden Geschmacksrichtungen ca. 50 % (Abbildung 3.36).

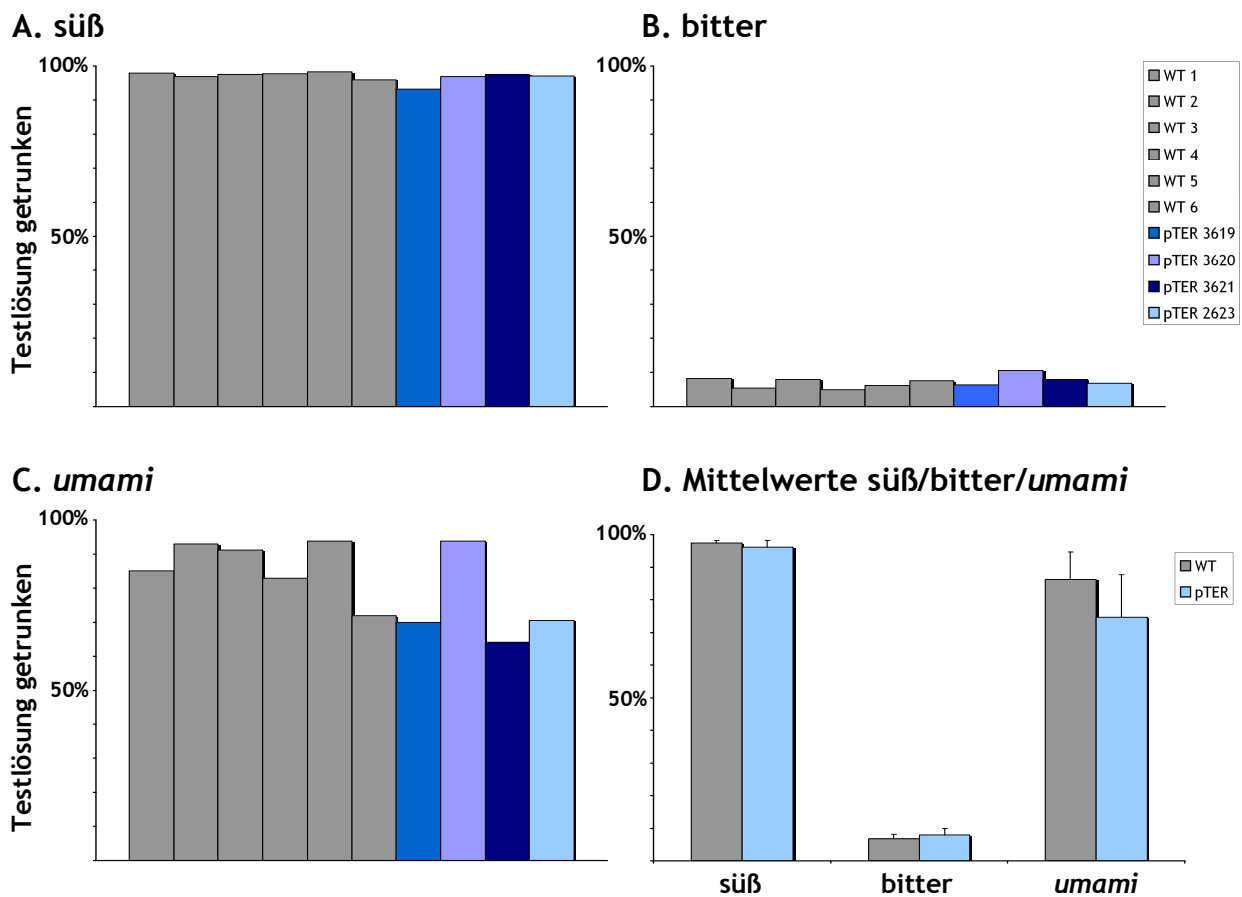


**Abbildung 3.36: Two-bottle test mit *Trpm5*-knock out-Mäusen.**

Der *Two-bottle test* mit *Trpm5*-knock out-Mäusen wurde mit 20 mM Acesulfam K (süß) und 5 mM Denatoniumbenzoat (bitter) durchgeführt (n = 4, Mittelwert ± Standardabweichung). Als Kontrolltiere dienten gleichaltige und -geschlechtliche Wildtypmäuse. Die von der Testlösung getrunkene Menge ist in Relation (%) zur getrunkenen Gesamtmenge angegeben. *Trpm5* -/- = *Knock out* (KO), *Trpm5* +/+ = Wildtyp (WT).

***Two-bottle test mit *Trpm5*-knock down-Mäusen***

Für die phänotypische Analyse der pTER-Mäuse wurden die männlichen *Founder*-Tiere der Linien 3620, 3621 und 3623 sowie Maus 3619, welche nicht eindeutig als transgen identifiziert wurde (vgl. Kapitel 3.8.3.2), in einem Alter von drei bis vier Monaten untersucht. Die *Founder*-Maus der Linie 3608 wurde nicht in den Test mit einbezogen, da dieses Weibchen zum Zeitpunkt der Geschmacksversuche schwanger war. Die sechs männlichen Kontrolltiere stammten aus denselben Würfen wie die *Founder*-Mäuse. Die pTER-Mäuse verhielten sich bei allen getesteten Geschmacksrichtungen den Wildtypmäusen ähnlich (Abbildung 3.37).



**Abbildung 3.37: Two-bottle test mit *Trpm5*-knock down-Mäusen.**

Die Geschmackswahrnehmung der pTER-Founder-Tiere wurde mit **A.** 20 mM Acesulfam K (süß), **B.** 5 mM Denatoniumbenzoat (bitter) und **C.** 30 mM L-Alanin (*umami*) untersucht. **D.** Mittelwerte der Geschmackstests ( $\pm$  Standardabweichung). Als Kontrolltiere dienten sechs gleichaltige und -geschlechtliche Wildtypmäuse (WT 1-6). Die von der Testlösung getrunkenene Menge ist in Relation (%) zur getrunkenen Gesamtmenge angegeben.

Die phänotypische Analyse der generierten *Trpm5*-knock down-Mäuse deutete auf keine Auffälligkeiten hin. In Geschmackstests verhielten sich die pTER-Mäuse den Wildtypmäusen sehr ähnlich (siehe Abbildung 3.37). Obwohl die Herunterregulation des *Trpm5*-Transkriptes in dem für die Geschmackswahrnehmung relevanten Zungengewebe bei den pTER-Linien 3620 und 3623 auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.34), ließ sich der Phänotyp der *Trpm5*-knock out-Maus nicht mit den pTER-Mäusen reproduzieren.

Da es sich bei den pTER-Mäusen lediglich um eine Herunterregulation des *Trpm5*-Transkriptes statt einer vollständigen Stilllegung des Gens handelt, und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine geringe Menge des Proteins für eine annähernd normale *Trpm5*-Funktion ausreicht, wurden für die weiteren funktionellen Untersuchungen ausschließlich *Trpm5*-knock out-Tiere verwendet. Aus Mäusen der pTER-Linien 3620, 3621 und 3623 wurden Inzuchtstämme hergestellt, indem die Tiere über zehn Generationen mit

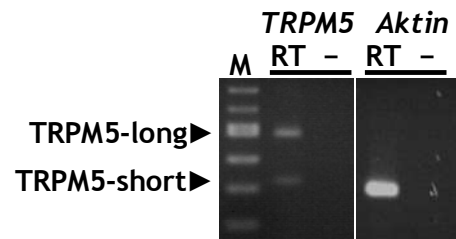
Wildtypmäusen des C57BL/6-Stammes gekreuzt wurden. Anschließend wurden die Linien von der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz kryokonserviert.

### 3.9 Funktion von TRPM5 in pankreatischen Betazellen

Die Beteiligung von TRPM5 an der Geschmackswahrnehmung erklärt die Expression des Gens im gustatorischen Gewebe, lässt aber die Frage offen, welche Funktion der TRPM5-Kanal in anderen Geweben hat. Neben der Zunge konnten *TRPM5*-Transkripte in fast allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.2).

Ende 2002 wurde von Irminger und Mitarbeitern bei der 38. Tagung der EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) eine Untersuchung zur differentiellen Genexpression in Langerhans'schen Inseln der Goto-Kakizaki-Ratte vorgestellt (Irminger *et al.*, 2002). Die Goto-Kakizaki (GK)-Ratte stellt ein Modell für den humanen Diabetes mellitus Typ II (NIDDM, *non-insulin dependent diabetes mellitus*) dar (Goto *et al.*, 1975). Sie besitzt einen charakteristischen Phänotyp mit einer verminderten Betazellanzahl, einer beeinträchtigten Insulinsekretion nach Glukosestimulation, erhöhten Nüchternblutzuckerwerten sowie einer Insulinresistenz der Leber und der peripheren Gewebe. Wie beim Menschen können diese Eigenschaften Spätkomplikationen wie Erkrankungen der Netzhaut (Retinopathien), der Niere (Nephropathien) und des Nervensystems (Neuropathien) verursachen. Um differentiell exprimierte Gene in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas zu identifizieren, haben Irminger und Mitarbeiter die Expressionsprofile der GK-Ratten und Kontrolltiere mittels Subtraktionshybridisierung verglichen und die Ergebnisse mittels *Real time*-RT-PCR verifiziert. Der Vergleich lieferte zwölf Gene, die in den GK-Inseln herunterreguliert sind; neben mitochondrialen Genen sowie Genen, die für  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SERCA) und dem Glukose-6-Phosphat (G6P)-Transporter kodieren, wurde auch *Trpm5* in der diabetischen Ratte deutlich (neunfach) herunterreguliert vorgefunden (Irminger *et al.*, 2002).

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen belegen, dass *Trpm5* im pankreatischen Gewebe exprimiert wird. Sowohl im murinen Pankreas (siehe Kapitel 3.1.2) als auch in Betazelllinien der Maus (MIN6) und der Ratte (INS-1 und RINm5F, siehe Kapitel 3.1.1) konnte eine *Trpm5*-Expression gezeigt werden. Um die Expression im humanen Gewebe zu untersuchen, wurden RT-PCRs mit aus humanen Langerhans'schen Inseln hergestellter cDNA durchgeführt. Die humane cDNA-Probe wurde von Dr. Marc-Alexander von Mach (Abteilung für klinische Toxikologie und Giftinformationszentrum, II Medizinische Klinik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. In der RT-PCR konnten beide *TRPM5*-Spleißvarianten nachgewiesen werden (Abbildung 3.38).



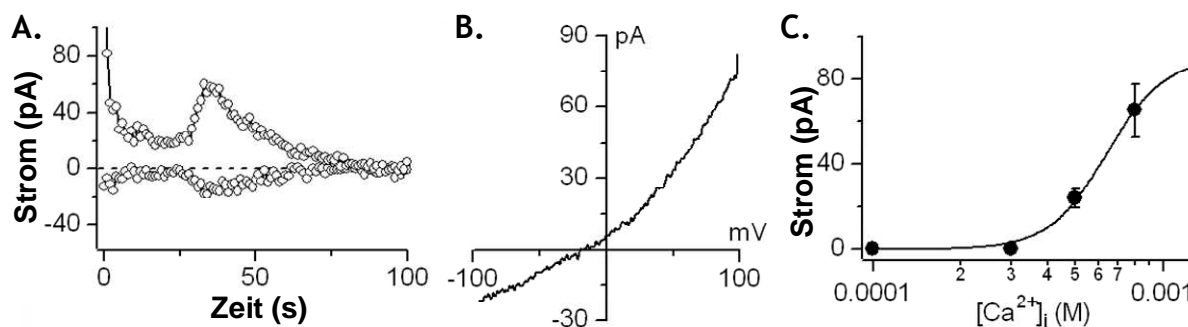
**Abbildung 3.38: RT-PCR zum Nachweis der *TRPM5*-Expression in humanen Langerhans'schen Inseln.** Die PCR mit den Oligonukleotiden TRPM5-F17/R21 wurde mit 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Als Kontrolle diente Aktin. RT = RT-Ansatz, – = Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase, M = 100 bp-Marker. Teilweise veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

Die Expression von *TRPM5* in den Langerhans'schen Inseln und dort speziell in den Betazellen legt die Vermutung nahe, dass der TRPM5-Kanal an  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskaden der Betazelle beteiligt ist.

### 3.9.1 Endogene *Trpm5*-Ströme in pankreatischen INS-1-Zellen

In INS-1-Zellen, die häufig zur Untersuchung der Insulinsekretion verwendet werden, sollte die Funktion von *Trpm5* in der Betazelle, vor allem dessen Beteiligung an der Insulinsekretion untersucht werden. Um die Funktion des *Trpm5*-Kanals in INS-1-Zellen nachzuweisen, wurden zunächst die endogenen Ströme der Zellen untersucht. Wie bereits bei der initialen Charakterisierung der TRPM5-spezifischen Ströme (siehe Kapitel 3.5), erfolgten die elektrophysiologischen Untersuchungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof R. Penner (Universität Hawaii, USA). Die Versuche wurden von Frau Mahealani Monteilh-Zoller durchgeführt; die hier gezeigten Ergebnisse wurden in Prawitt *et al.*, 2003 veröffentlicht.

In INS-1-Zellen konnten mittels *Patch-clamp*-Ganzzellableitungen ähnliche Ströme wie in *TRPM5*-überexprimierenden M1-Zellen (siehe Kapitel 3.5) beobachtet werden. Durch die Stimulation mit 800 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konnte in acht Zellen nach einer Verzögerungszeit von  $53 \pm 10$  Sekunden ein *Trpm5*-charakteristischer Strom beobachtet werden (Abbildung 3.39). Durch die Stimulation mit 500 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konnte bei drei gemessenen Zellen eine *Trpm5*-Aktivierung um  $63 \pm 11$  Sekunden verzögert beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.39: Patch-clamp-Ganzzelleitungen zum Nachweis der Trpm5-Funktion in INS-1-Zellen.**

**A.** Ströme einer INS-1-Zelle nach der Stimulation mit 800 nM  $[Ca^{2+}]_i$  bei  $-80$  mV und  $+80$  mV ( $n = 8$ ). Der initiale Abfall der Stromkurve ist auf die Inaktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals zurückzuführen. **B.** Strom-Spannungsverhältnis der Trpm5-spezifischen Ströme ( $n = 8$ ). **C.** Dosis-Wirkungskurve der Trpm5-spezifischen Ströme ( $n = 3-8$ ). Veröffentlicht in Prawitt *et al.*, 2003.

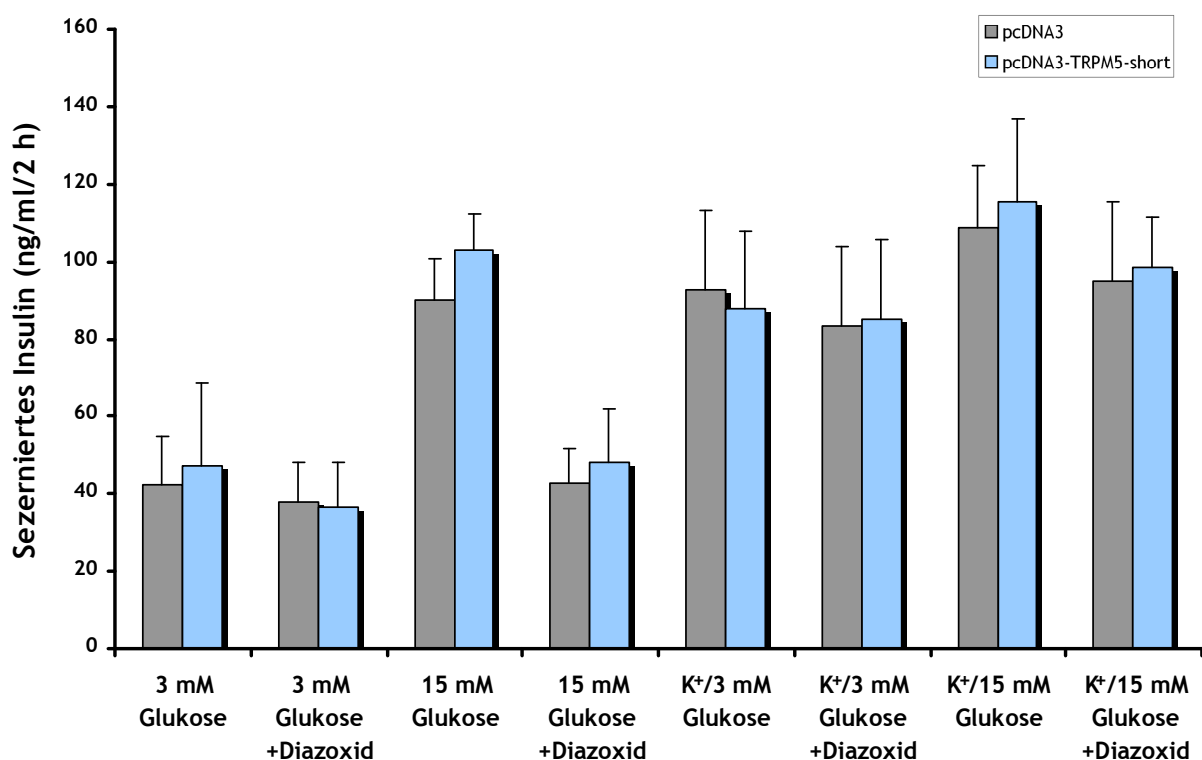
### 3.9.2 TRPM5-short-überexprimierende INS-1-Zellen

Wie in elektrophysiologischen Versuchen gezeigt werden konnte (Kapitel 3.6.3), führt die Expression von TRPM5-short zur Blockierung der TRPM5-Aktivität. In der Maus und in der Ratte konnten bisher keine dem TRPM5-short-Protein entsprechende Trpm5-Spleißvarianten nachgewiesen werden. Um die Insulinsekretion in einem Trpm5-defizienten Modellsystem untersuchen zu können, sollten endogen *Trpm5*-exprimierende INS-1-Zellen mit dem humanen TRPM5-short-Protein transfiziert werden, da zu diesem Zeitpunkt weder humane Betazelllinien noch die *Trpm5-knock out*-Maus (siehe Kapitel 3.9.3) zur Verfügung standen. Die Homologie zwischen dem humanen TRPM5 und dem Rattenprotein ist relativ hoch (83,1 %, berechnet mit dem SIM-Programm unter <http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>), demzufolge könnte das humane TRPM5-short-Protein auch in den Rattenzellen blockierend wirken.

#### 3.9.2.1 Insulinsekretion in TRPM5-short-überexprimierenden INS-1-Zellen

Die INS-1-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt pcDNA3-TRPM5-short (siehe Kapitel 3.4.1) bzw. dem pcDNA3-Leerplasmid transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde drei Tage nach der Transfektion anhand der EGFP-Fluoreszenz in parallel durchgeführten Kontrollansätzen mit pcDNA-EGFP (siehe Kapitel 3.4.1) überprüft. Nur Ansätze mit einer Transfektionseffizienz von über 75 % wurden drei Tage nach der Transfektion in Insulinsekretionsversuchen getestet. Die Anregung der Insulinsekretion erfolgte mit einem Glukose- bzw.  $K^+$ -haltigen Puffer. Diazoxid verhindert die glukoseinduzierte (aber nicht die  $K^+$ -induzierte) Insulinausschüttung, indem es den  $K_{ATP}$ -Kanal konstitutiv offen hält (siehe hierzu auch Kapitel 4.7).

Für den Insulinsekretionstest wurden die Zellen gewaschen und zwei Stunden in 3 mM Glukose präinkubiert. Die Insulinsekretion wurde durch Inkubation in 15 mM Glukose bzw. durch Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> (als KCl) angeregt. Nach zwei weiteren Stunden wurde der Überstand entnommen und die Insulinkonzentration mittels ELISA bestimmt. Zwischen den TRPM5-short-transfizierten Zellen und den Kontrollzellen waren keine Unterschiede in der sezernierten Insulinmenge zu beobachten (Abbildung 3.40). Sowohl mit hoch konzentrierter Glukose als auch mit K<sup>+</sup> konnte in beiden Ansätzen eine Insulinausschüttung induziert werden. Die glukoseinduzierte Insulinausschüttung wurde in beiden Ansätzen durch die Zugabe von 250 µM Diazoxid inhibiert.



**Abbildung 3.40: Insulinsekretion in TRPM5-short-überexprimierenden INS-1-Zellen.**

INS-1-Zellen wurden mit pcDNA3-TRPM5-short transient transfiziert und der Insulinsekretionstest nach drei Tagen durchgeführt (n = 5, Mittelwert ± Standardabweichung). Die Stimulation der Insulinausschüttung erfolgte entweder mit 15 mM Glukose oder durch Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> (als KCl). Zur Inhibition der glukoseinduzierten Sekretion wurde 250 µM Diazoxid zugegeben. Die sezernierte Insulinmenge wurde nach zwei Stunden im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Inkubation bei 3 mM liefert den Basalwert der Insulinsekretion in unstimulierten INS-1-Zellen. Als Kontrolle dienten mit dem pcDNA3-Leerplasmid transfizierte INS-1-Zellen.

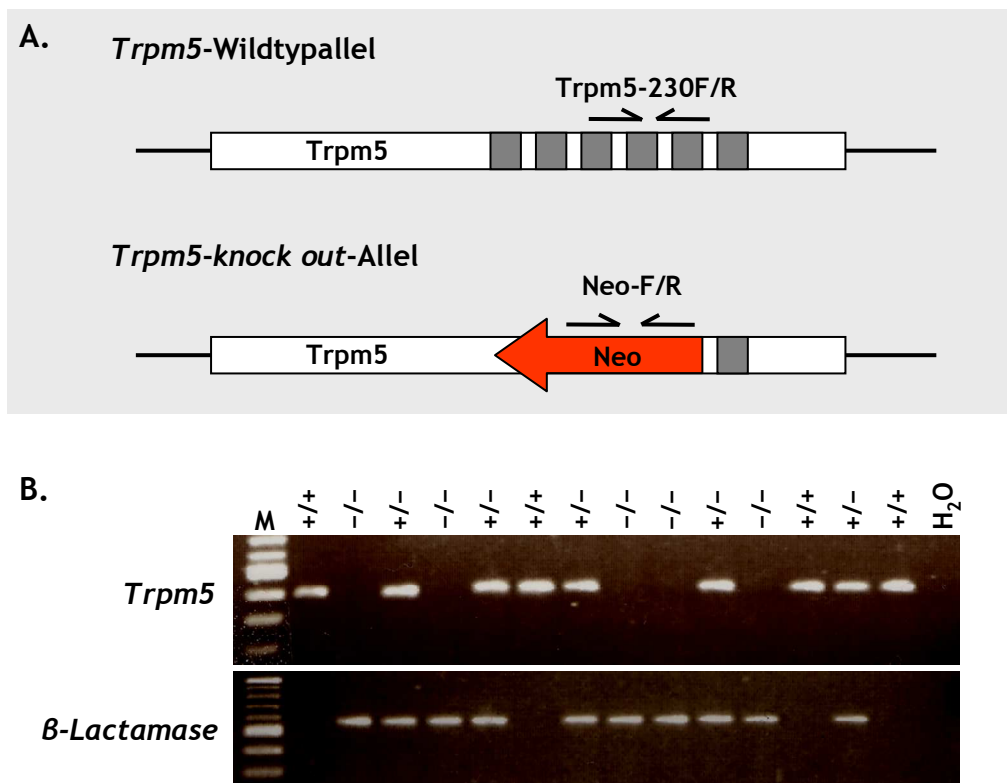
### 3.9.3 Insulinsekretion in der *Trpm5-knock out*-Maus

Nach der Veröffentlichung der *Trpm5-knock out*-Maus (Zhang, Y. *et al.*, 2003) wurden bei der Arbeitsgruppe Prof. Zuker (University of California, USA) vier homozygote *Knock out*-



Mäuse, zwei Weibchen und zwei Männchen, bestellt. Diese wurden unter der Leitung von Dr. K. Reifenberg in der SPF (*specific pathogen free*)-Haltung der ZVTE der Universität Mainz aufgenommen. Aufgrund ihres hohen Alters konnten die gelieferten Mäuse untereinander leider keine Nachkommen zeugen. Die homozygoten Männchen konnten jedoch erfolgreich mit wildtypischen Weibchen des C57BL/6-Stammes verpaart werden, so dass 2005 schließlich genügend Mäuse für die Geschmackstests (siehe Kapitel 3.8.3.5) und für die nachfolgenden Versuche zur Verfügung standen.

Bei der Herstellung der *Trpm5-knock out*-Maus wurde der genomische Bereich des *Trpm5*-Gens, der für die ersten fünf Transmembrandomänen kodiert (Exon 15 bis Exon 19), deletiert und durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Aus diesem Grund kann die PCR-basierte Genotypisierung der Mäuse (*Trpm5* +/+, *Trpm5* +/- und *Trpm5* -/-) mit zwei Oligonukleotidpaaren durchgeführt werden, die innerhalb des deletierten Bereiches (*Trpm5*-230F/R) bzw. in der Neo-Kassette (Neo-F/R) binden (Abbildung 3.41 A). Homozygote *Knock out*-Tiere (*Trpm5* -/-) erzeugen ein Produkt mit den Oligonukleotiden Neo-F/R, während die Oligonukleotide *Trpm5*-230F/R nicht an die DNA binden können. Wildtypmäuse erzeugen wiederum lediglich mit *Trpm5*-230F/R ein Produkt und die heterozygoten *Knock out*-Mäuse mit beiden Oligonukleotidpaaren (Abbildung 3.41 B).



**Abbildung 3.41: Genotypisierung der *Trpm5*-knock out-Mäuse mittels PCR.**

A. Schematische Darstellung des *Trpm5*-Wildtyp- und *Trpm5*-knock out-Allels sowie der Lage der für die Genotypisierung verwendeten PCR-Oligonukleotidpaare. Im *Trpm5*-knock out-Allel sind die Exons 15-19, die für die fünf ersten Transmembrandomänen (graue Kästchen) kodieren, deletiert und durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Die *Trpm5*-spezifischen Oligonukleotide Trpm5-230F/R ergeben ein Produkt von 390 bp, die in der  $\beta$ -Lactamase-Sequenz der Neo-Kassette bindenden Oligonukleotide Neo-F/R ein Produkt von 590 bp. B. PCR zur Genotypisierung der Nachkommen zweier heterozygoter *Trpm5*-knock out-Mäuse. Die Mäuse der abgebildeten PCR stammen aus verschiedenen Würfen. -/- = homozygote Knock out-Maus, +/- = heterozygote Knock out-Maus, ++ = Wildtypmaus, M = 100 bp-Marker.

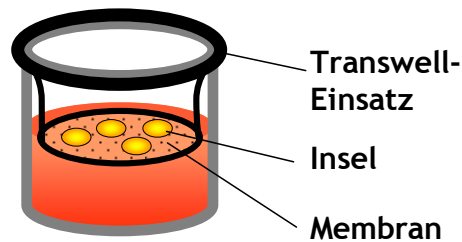
### 3.9.3.1 Insulinsekretion in Langerhans'schen Inseln der *Trpm5*-knock out-Maus

Um die Insulinsekretion in der Maus als Gesamtorganismus zu untersuchen, wird der Plasmainsulinspiegel nach einer intraperitonealen Glukosegabe beobachtet. Für die Darstellung beider Sekretionsphasen (siehe hierzu auch Abbildung 4.2) müssen die Zeitabstände zwischen den einzelnen Insulinmessungen sehr kurz gewählt werden; üblicherweise findet kurz vor der Glukoseinjektion sowie 2, 5, 15 und 30 Minuten nach der Injektion eine Messung statt. Da zur Serumgewinnung relativ viel Blut benötigt wird und die Versuchstiere durch das mehrmalige Anritzen der Schwanzvene in kurzen Zeitabständen insgesamt sehr viel Blut verlieren, wurde hier auf die Insulinbestimmung im Gesamtorganismus verzichtet. Die Insulinsekretionskinetik der *Trpm5*-knock out-Mäuse wurde stattdessen in Zellkultur anhand des Sekretionsverhaltens der isolierten Langerhans'schen Inseln untersucht.

Für Insulinsekretionanalysen mit isolierten Langerhans'schen Inseln wird standardmäßig das Perifusionssystem (Panten *et al.*, 1977) verwendet, welches eine exakte Messung der ausgeschütteten Insulinmenge alle 15 bis 60 Sekunden ermöglicht. Da unserem Labor keine Perifusionsapparatur zur Verfügung stand, wurden die Insulinsekretionstests „von Hand“ durchgeführt. Als Grundlage für die Versuchsanordnung diente eine von Srivastava und Goren publizierte Methode (Srivastava und Goren, 2003), die geringfügig modifiziert wurde.

Der Insulinsekretionsversuch wurde am Tag nach der Inselpräparation durchgeführt. Nachdem die Inseln über Nacht in 3 mM Glukose kultiviert wurden, erfolgte eine 30-minütige Präinkubation in 2,8 mM Glukose. Anschließend wurde die Insulinsekretion durch 16,8 mM Glukose stimuliert. Nach 1, 2, 5, 10 und 30 Minuten wurde ein Aliquot des Überstandes entnommen. Um den Gesamtinsulingehalt der Inseln zu ermitteln, wurde das restliche Insulin anschließend mit saurem Ethanol extrahiert. Die Menge des sezernierten Insulins sowie des Gesamtinsulins wurde mittels ELISA bestimmt.

Die Insulinbestimmung im Zellüberstand gestaltete sich als sehr fehleranfällig. Während der Stimulation der Insulinsekretion wurden die Zellkulturgefäße auf einem Schüttler inkubiert, um das Insulin im Medium gleichmäßig zu verteilen. Durch die Rotation lösten sich jedoch einige Inseln von ihrer Unterlage oder einzelne Zellen aus dem Inselzellverband. Diese wurden dann mit dem Überstand abgezogen und verfälschten auch nach einem Zentrifugationsschritt die Insulinmesswerte im ELISA. Da isolierte Inseln ihre Fähigkeit, Insulin zu sezernieren, für mindestens 14 Tage beibehalten (Arkhammar *et al.*, 1998), wurde zunächst getestet, ob die Inselzellen nach längerer Kultivierungszeit besser an ihrer Unterlage haften bleiben. Da sich die Zellen auch nach 14-tägiger Kultivierung während der Inkubation von der Unterlage lösten, wurden schließlich statt der gewöhnlichen 24-Loch-Platten sogenannte Transwell-Gefäße der Firma Corning verwendet. Die gewählten Gefäße enthielten Membraneinsätze mit 3 µm großen Poren. Die Inselzellen verblieben während der Inkubation im Transwell-Einsatz und wurden nicht im gesamten Medium verteilt. Das sezernierte Insulin konnte dagegen frei durch die Membran diffundieren, so dass für die Insulinbestimmung zellfreies Medium entnommen werden konnte (Abbildung 3.42).



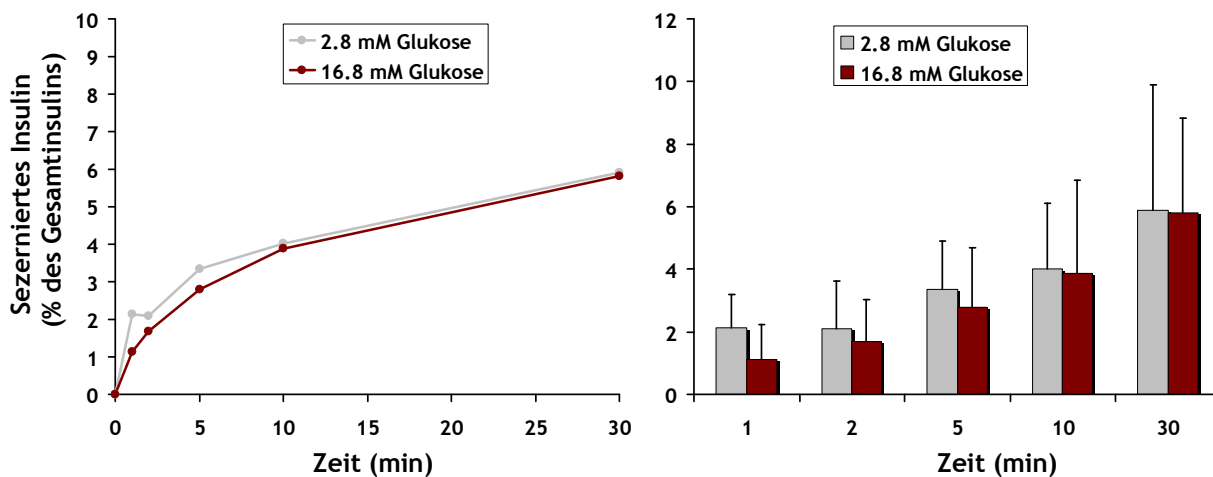
**Abbildung 3.42: Kultivierung der isolierten Langerhans'schen Inseln in Transwell-Gefäßen.**

Für die Kultivierung der Langerhans'schen Inseln wurden Transwell-Einsätze (Corning, Wiesbaden) verwendet, die eine Polycarbonatmembran mit 3 µm breiten Poren enthalten. Während Nährstoffe und Insulin frei durch die Membran diffundieren, können die Inselzellen die Membran nicht passieren. Die sezernierte Insulinmenge wurde im Zellüberstand (unterhalb des Transwell-Einsatzes) gemessen.

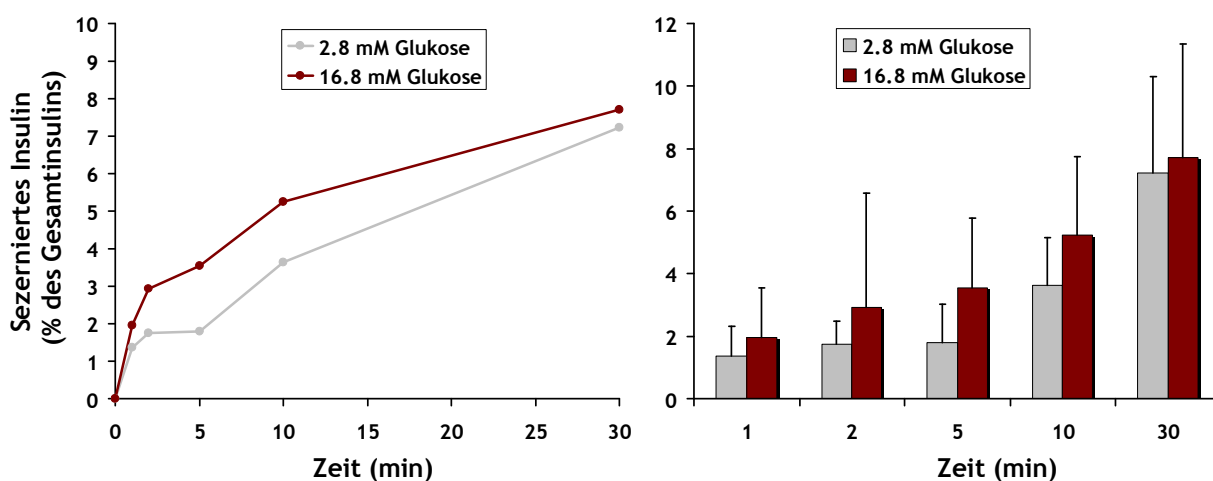
Um die Insulinsekretion in *Trpm5-knock out*- und Wildtypmäusen vergleichen zu können, wurden die Inseln aus jeweils zwei zu vergleichenden Tieren zur gleichen Zeit und unter exakt gleichen Bedingungen präpariert. Im Laufe des Experimentes stellte sich heraus, dass für einen optimalen Versuchsablauf ein erfolgreicher Collagenaseverdau von entscheidender Bedeutung ist. Schon geringe Temperaturschwankungen im Inkubator verlangsamten oder beschleunigten die Reaktion, so dass die Inseln nach einem unvollständigen Verdau in zu kühlem Puffer noch teilweise vom Pankreasgewebe umgeben waren, während der Verdau nach einer zu warmen Inkubation zu weit fortgeschritten war, wodurch die Inseln beschädigt wurden. Darüber hinaus durfte das über Kopf-Schütteln der Reaktionsgefäße während des Verdau nicht zu sanft sein, weil die Inseln sich dann nicht vom restlichen Gewebe trennten; bei zu kräftiger Handhabung zerfielen die Inseln wiederum in Einzelzellen.

Nach Optimierung dieser Methode konnten die Inseln aus fünf *Trpm5-knock out*-Mäusen und fünf Wildtypmäusen erfolgreich präpariert werden. Diese zeigen in der Insulinsekretion deutliche Unterschiede (Abbildung 3.43). Während die Wildtypinseln auf die Stimulation mit 16,8 mM Glukose mit einer erhöhten Insulinausschüttung reagieren, konnte in den *Trpm5-knock out*-Inseln keine Stimulation der Insulinsekretion beobachtet werden. Da aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten, die bei der Inselpräparation aufgetreten sind, lediglich fünf Mäuse pro Genotyp ausgewertet werden konnten, sind die Standardabweichungen der einzelnen Mittelwerte relativ hoch, so dass dieses Ergebnis mit Vorsicht interpretiert werden muss. Es liefert jedoch einen möglichen Hinweis auf eine gestörte Sekretionskinetik in den *Trpm5-knock out*-Inseln, die einer weiteren Untersuchung bedarf.

**A. *Trpm5* -/-**



**B. *Trpm5* +/+**



**Abbildung 3.43: Insulinsekretion in isolierten Langerhans’schen Inseln der *Trpm5*-knock out-Maus.**

Insulinsekretion in isolierten Langerhans’schen Inseln der homozygoten *Trpm5*-knock out-Maus (A.) und der Wildtypmaus (B.), n = 5. Die Stimulation der Insulinsekretion erfolgte mit 16,8 mM Glukose. Nach 1, 2, 5, 10 und 30 Minuten wurde die sezernierte Insulinmenge im Zellüberstand von jeweils 10 Inseln mittels ELISA bestimmt. Die basale Insulinsekretion wurde mit 2,8 mM Glukose untersucht. Das sezernierte Insulin ist in Relation (%) zur Gesamtinsulinmenge der Inseln angegeben. Die Ergebnisse sind neben den Kurvendiagrammen nochmals als Balkendiagramm dargestellt, um die Standardabweichungen hervorzuheben. *Trpm5* -/- = *Trpm5*-Knock out-Maus, *Trpm5* +/+ = Wildtypmaus.

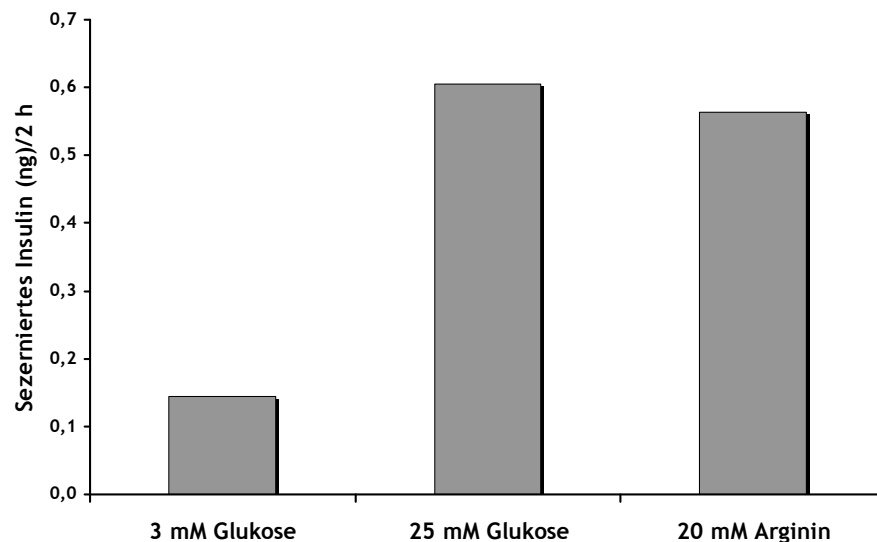
**3.9.3.2 Immortalisierung von pankreatischen Betazellen**

Bei den Insulinsekretionsanalysen mit isolierten Langerhans’schen Inseln konnte der Collagenaseverdau als „kritischer Schritt“ definiert werden. Um dieses Problem zu umgehen und um konstantere Versuchsbedingungen für den Sekretionstest zu erhalten, wurde als weitere Methode die Immortalisierung von pankreatischen Betazellen etabliert. Eine *Trpm5*-knock out-Betazelllinie würde – zusammen mit einer wildtypischen Kontrollzelllinie – nicht nur für Insulinsekretionsanalysen, sondern auch für weitere funktionelle Untersuchungen des *Trpm5*-Kanals ein geeignetes Zellsystem bieten.

Für die Immortalisierung wurde das retrovirale Konstrukt pLXSN16E6E7 verwendet, welches die Gene *E6* und *E7* des humanen Papillomvirus (HPV) enthält (Halbert *et al.*, 1991). Die Genprodukte, die sogenannten Onkoproteine E6 und E7, sind in der Lage, den Zellzyklus und somit das Proliferationsverhalten der Zellen zu beeinflussen, indem sie unter anderem die Tumorsuppressoren p53 und Rb (Retinoblastom) binden (Dyson *et al.*, 1989; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Kaur *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989; Werness *et al.*, 1990). Für eine erfolgreiche Immortalisierung der Zellen ist eine Zellteilung erforderlich, damit das Konstrukt in das Genom integriert werden kann. Da sich die Betazellen im differenzierten Zustand nur selten teilen, ist die Transfektionseffizienz dieses Zelltyps sehr gering.

Für die Immortalisierung wurden zehn Langerhans'sche Inseln eines neun Wochen alten C57BL/6-Wildtypmännchens (Nummer C69) isoliert. Die Transfektion der Verpackungszelllinie BOSC23 mit dem E6/E7-Konstrukt erfolgte mittels Kalziumphosphatpräzipitation (Pear *et al.*, 1993). Die transkribierte RNA wurde in den BOSC23-Zellen in infektiöse, replikationsinkompetente Partikel verpackt, die mit dem Zellüberstand abgenommen wurden und für die Infektion der Inselzellen verwendet wurden. Die Generierung der Viruspartikel sowie die Infektion und Selektion der Inselzellen wurde von Dr. E. Lausch durchgeführt.

Aus der Immortalisierung und anschließender Neomycinselektion ging nach einer Kultivierungsdauer von vier Monaten ein Klon (C69) hervor. Da sich im Inselzellverband neben Betazellen weitere Zelltypen, unter anderem Alpha- und Deltazellen befinden, die für die Glukagon- bzw. Somatostatinsekretion zuständig sind, sollte mit einem einfachen Insulinsekretionstest überprüft werden, ob es sich bei der hergestellten C69-Zelllinie um Betazellen handelt. Die Zellen wurden in der vierten Passage über Nacht an eine niedrige Glukosekonzentration (5 mM) gewöhnt. Am nächsten Tag erfolgte eine zweistündige Präinkubation in 3 mM Glukose. Anschließend wurde die Insulinsekretion mit einer zweistündigen Inkubation in 25 mM Glukose bzw. 20 mM Arginin angeregt. Im Gegensatz zur glukoseinduzierten Insulinsekretion (siehe Kapitel 4.7.3) depolarisiert Arginin aufgrund seiner positiven Ladung direkt die Zellmembran und stimuliert so die Insulinsekretion (Henquin, 2004). Beide Stimuli konnten in C69-Zellen eine Insulinausschüttung induzieren (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44: Insulinsekretion in der murinen Betazelllinie C69.**

Mit einem Insulinsekretionstest wurde überprüft, ob es sich bei den immortalisierten Inselzellen der C69-Wildtypmaus um Betazellen handelt. Die Stimulation der Insulinsekretion erfolgte mit 25 mM Glukose bzw. 20 mM Arginin für zwei Stunden. Die Inkubation in 3 mM Glukose lieferte den Basalwert der Insulinsekretion.

Die wildtypischen Inselzellen konnten erfolgreich immortalisiert und kultiviert werden. Mit dem Insulinsekretionstest konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Inselzellen um Betazellen handelt, die ihre Fähigkeit zur Insulinsekretion beibehalten haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine *Trpm5-knock out*-Zelllinie etabliert werden.

### 3.9.3.3 Glukosetoleranztest

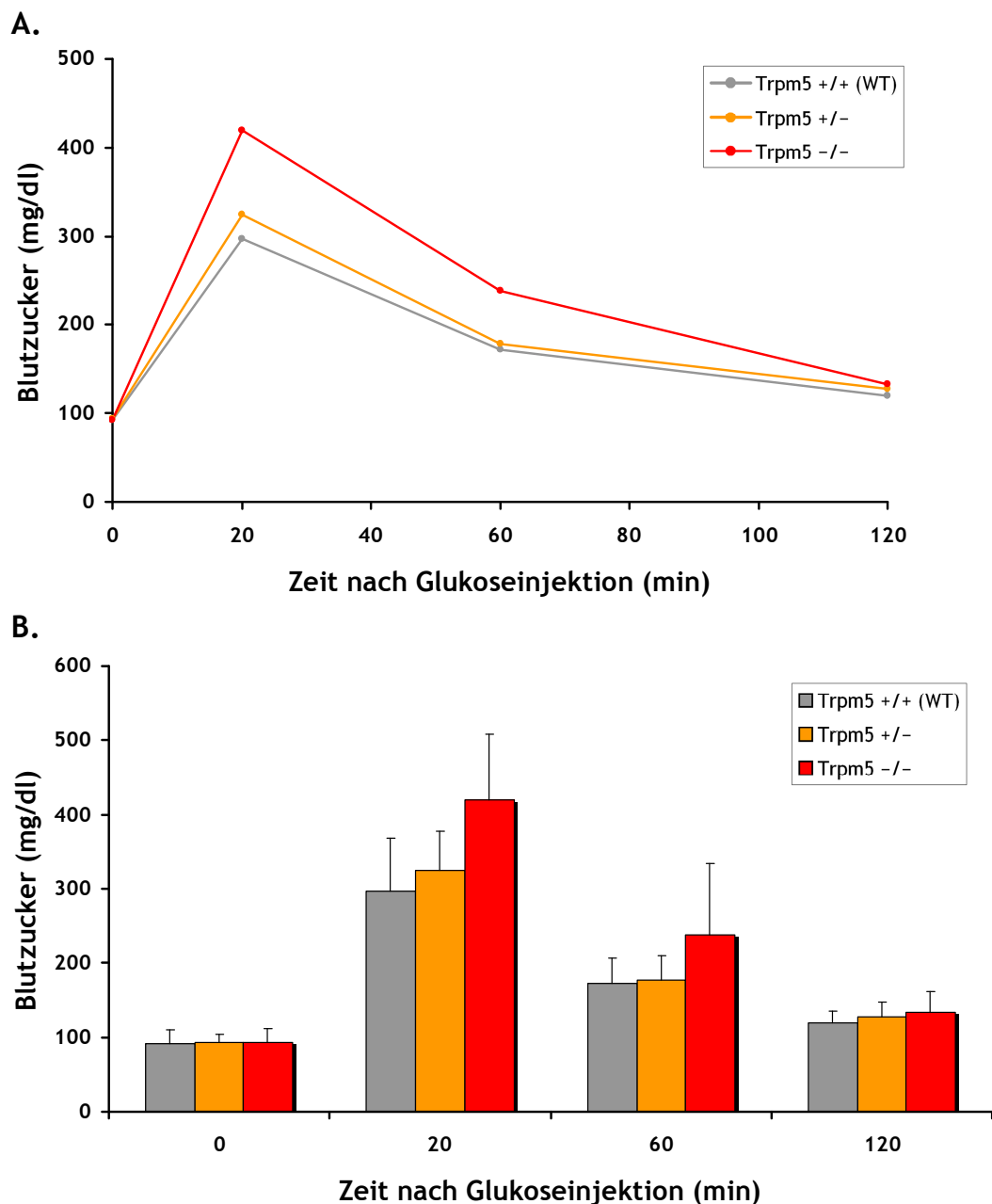
Im Glukosetoleranztest wird die Wirkung der verabreichten Glukose auf den Blutzuckerspiegel untersucht. Dabei steigt der Blutzuckerwert zunächst stark an, wodurch die Insulinausschüttung im Pankreas angeregt wird. Das ausgeschüttete Insulin führt unter anderem in Muskeln, Fettgewebe und Leber zur Aufnahme, Verwertung und Speicherung der Glukose, wodurch der Blutzuckerspiegel sinkt.

Die Mäuse wurden am Tag vor dem Glukosetoleranztest gewogen. Sie wurden über Nacht gehungert, d. h. ihnen wurde das Futter, aber nicht das Trinkwasser entzogen. Am nächsten Tag wurde 2 g D(+)-Glukose pro Kilogramm Körpergewicht in die Bauchhöhle der Mäuse (intraperitoneal) injiziert. Vor dem Versuch sowie 20, 60 und 120 Minuten nach der Injektion wurde den Mäusen durch Anritzen mit einer Rasierklinge eine Blutprobe aus der Schwanzvene entnommen und der Blutzuckerwert gemessen.

Der Glukosetoleranztest wurde mit homozygoten und heterozygoten *Trpm5-knock out*-Mäusen durchgeführt. Pro Genotyp wurden zehn Mäuse (vier Männchen und sechs Weibchen) in einem Alter von fünf bis zehn Wochen untersucht. Als Kontrollmäuse dienten

gleichaltrige und -geschlechtliche Wildtypmäuse. Jede untersuchte homozygote *Knock out*-Maus (*Trpm5*  $-/-$ ) besaß somit eine gleichaltrige- und geschlechtliche heterozygote Vergleichsmaus (*Trpm5*  $+/-$ ) und wildtypische Kontrollmaus (*Trpm5*  $+/+$ ). Die Ergebnisse des Glukosetoleranztests zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den homozygoten *Knock out*-Mäusen und den heterozygoten *Knock out*-Mäusen bzw. Wildtypmäusen (Abbildung 3.45). 20 und 60 Minuten nach der Glukoseinjektion ist der Blutzuckerwert der homozygoten *Knock out*-Mäuse erheblich erhöht. Nach 120 Minuten sinkt er wieder auf einen normalen Wert zurück. Zu beachten sind die Nüchternblutzuckerwerte zu Beginn des Experimentes; diese lagen bei allen Mäusen in einem vergleichbaren Bereich.

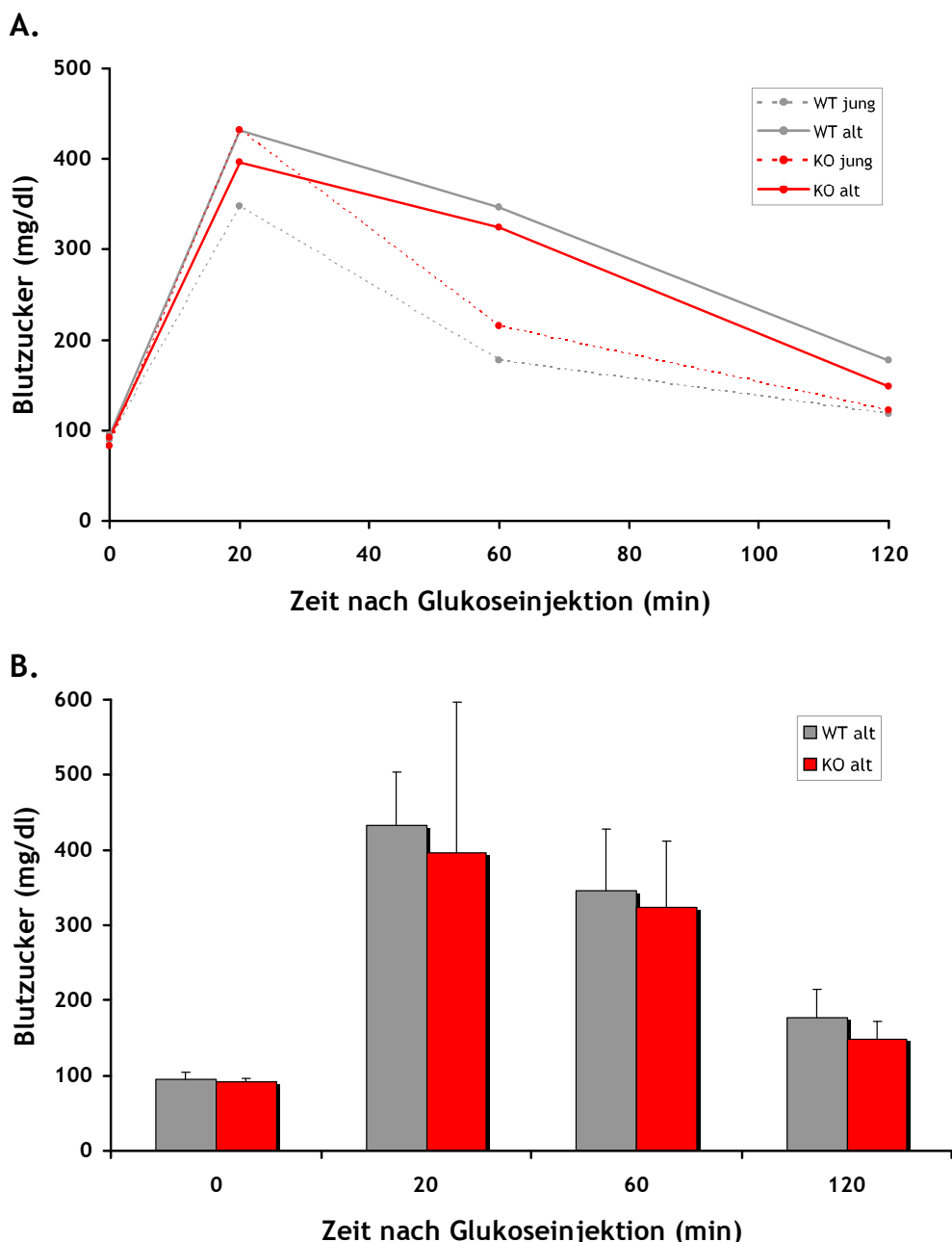




**Abbildung 3.45: Glukosetoleranztest mit homozygoten und heterozygoten *Trpm5*-knock out-Mäusen.**

**A.** Für den Glukosetoleranztest wurden 5-10 Wochen alte Mäuse über Nacht gehungert, bevor sie mit 2 g/kg Glukose intraperitoneal injiziert wurden. Kurz vor der Injektion (0 min) sowie 20, 60 und 120 min danach wurde der Blutzucker gemessen (n = 10). **B.** Ergebnisse aus A als Balkendiagramm, für eine übersichtliche Darstellung der Standardabweichungen. *Trpm5* -/- = homozygote *Knock out*-Maus, *Trpm5* +/- = heterozygote *Knock out*-Maus, *Trpm5* +/+ = Wildtypmaus (WT).

Der Glukosetoleranztest wurde mit drei der zuvor getesteten homozygoten *Knock out*-Mäuse sowie drei Wildtypmäusen (jeweils einem Männchen und zwei Weibchen) zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. In einem Alter von 44 Wochen zeigen sowohl die *Trpm5*-knock out-Mäuse als auch die Wildtypmäuse eine zunehmende Glukoseintoleranz, diese ist an der langsamen Regulation der künstlich erhöhten Blutzuckerwerte erkennbar (Abbildung 3.46). Zwischen den *Knock out*-Mäusen und Wildtypmäusen ist kein Unterschied mehr zu erkennen.



**Abbildung 3.46: Glukosetoleranz der jungen und alten *Trpm5-knock out*-Mäuse im Vergleich.**

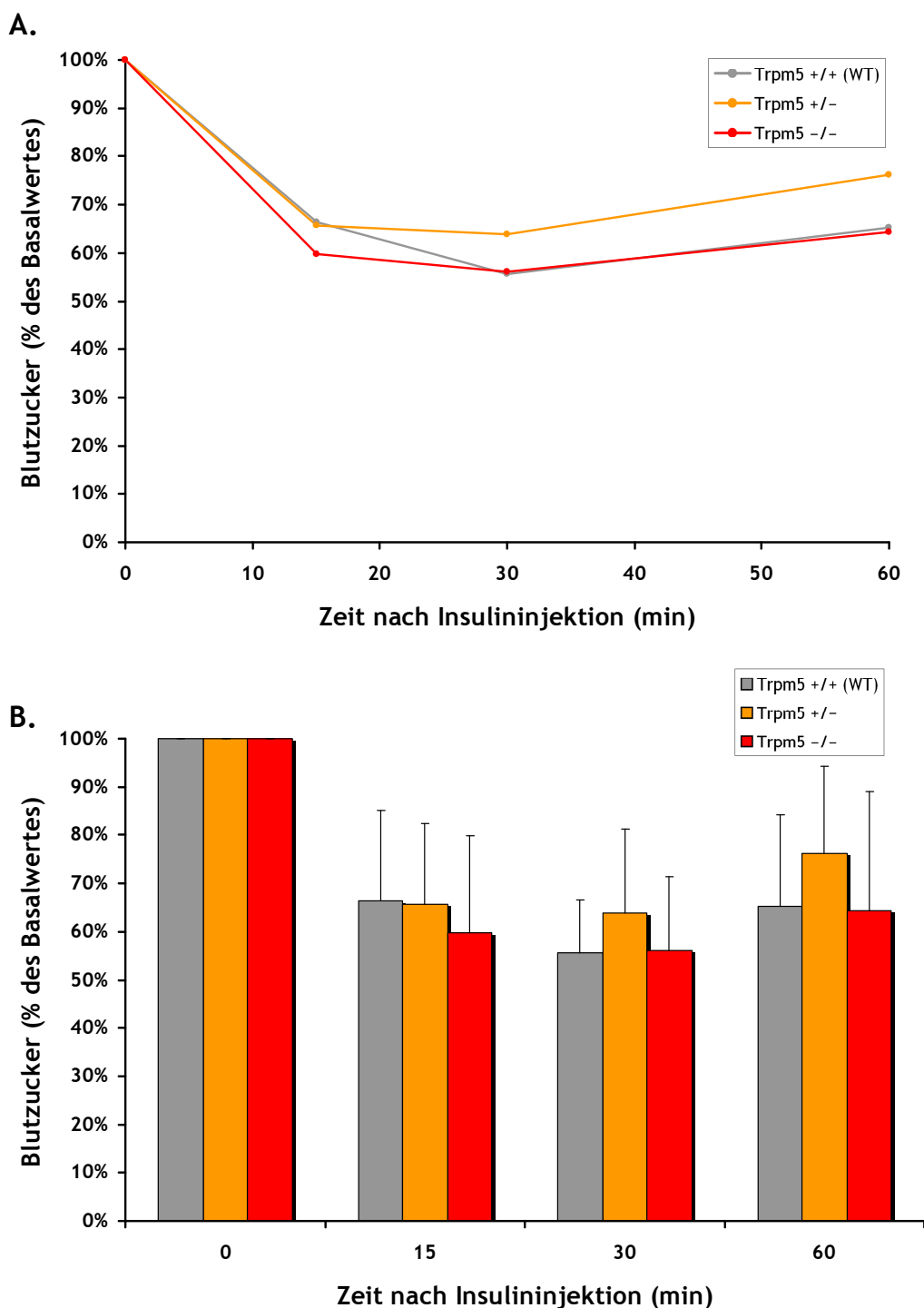
Der Glukosetoleranztest wurde mit den *Trpm5-knock out*-Mäusen und Wildtypmäusen in einem Alter von 5-10 sowie 44 Wochen durchgeführt (n = 3). **A.** Vergleich der Glukosetoleranz in einem Alter von 5-10 und 44 Wochen. Bei den jüngeren Mäusen kommt der Unterschied zu Abbildung 3.47 A dadurch zustande, dass hier lediglich drei Mäuse pro Genotyp berücksichtigt wurden. **B.** Glukosetoleranztest mit 44 Wochen alten Mäusen als Balkendiagramm dargestellt, um die Standardabweichungen als Fehlerbalken darstellen zu können. KO = homozygote *Trpm5-knock out*-Maus, WT = Wildtypmaus.

### 3.9.3.4 Insulintoleranztest

Im Insulintoleranztest wird der Blutzuckerspiegel der Maus nach der Zufuhr von exogenem Insulin untersucht. Das in den Bauchraum verabreichte Insulin gelangt in den Blutkreislauf und führt wie in Kapitel 3.9.3.3 beschrieben zur Verminderung des Blutglukosewertes.

Die Mäuse wurden vor dem Versuch gewogen und normal gefüttert. Pro Kilogramm Körpergewicht wurden 0,75 Einheiten Insulin in die Bauchhöhle der Maus injiziert. Kurz vor dem Versuch sowie 15, 30 und 60 Minuten nach der Injektion wurde eine Blutprobe aus der Schwanzvene der Maus entnommen.

Der Insulintoleranztest wurde mit denselben Mäusen wie der Glukosetoleranztest durchgeführt. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Messung sechs bis zwölf Wochen alt. Alle Mäuse zeigten eine ähnliche Reaktion auf das verabreichte Insulin (Abbildung 3.47). Die Blutzuckerwerte der homozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse und der Wildtypmäuse sind fast identisch. Die Abweichung der heterozygoten *Trpm5-knock out*-Mäusen von diesen Werten ist vernachlässigbar gering und kann durch die individuellen Unterschiede erklärt werden, die schon bei Mäusen desselben Alters, Genotyps und Geschlechts zu beobachten waren. Diese individuellen Schwankungen führten zu relativ großen Standardabweichungen (Abbildung 3.47 B).



**Abbildung 3.47: Insulintoleranztest mit homozygoten und heterozygoten *Trpm5*-knock out-Mäusen.**

**A.** Vor der intraperitonealen Injektion von 0,75 U/kg Insulin (0 min) sowie 15, 30 und 60 min nach der Injektion wurde der Blutzuckerwert der 6-12 Wochen alten Mäuse gemessen (n = 10). Die Blutglukosewerte sind in Relation (%) zu dem Anfangswert (0 min) angegeben **B.** Ergebnisse aus A als Balkendiagramm dargestellt, um die Standardabweichungen als Fehlerbalken darstellen zu können. *Trpm5* -/- = homozygote *Knock out*-Maus, *Trpm5* +/- = heterozygote *Knock out*-Maus, *Trpm5* +/+ = Wildtypmaus (WT).

### 3.9.3.5 Bestimmung des Langzeitblutzuckerwertes

Der Glukosehaushalt eines Organismus kann mit Hilfe verschiedener Blutmarker untersucht werden. Für die Bestimmung des Langzeitblutzuckerwertes wird der Glykosylierungsgrad der

im Blut vorhandenen Proteine untersucht. HbA1c und Fructosamin sind Kontrollmarker des mittleren Blutzuckerspiegels; sie sind sowohl für die Diabetesdiagnose als auch für die Beobachtung des weiteren Krankheitsverlaufes von besonderer Bedeutung. Da sie nicht durch exogene Faktoren wie Stress beeinflusst werden, sind sie für die Untersuchung von Versuchstieren besonders gut geeignet.

HbA1c ist eine Form des Hämoglobins (Hb), das Glukosemoleküle bindet und Informationen über die durchschnittliche Blutglukosekonzentration der vorangegangenen zwei bis drei Monaten liefert. Das „Blutzuckergedächtnis“ kommt durch die Lebensdauer der Erythrozyten zustande. Fructosamin zeigt den Glykosylierungsgrad von Serumproteinen, hauptsächlich Albuminen und Globulinen an und spiegelt die durchschnittliche Blutglukosekonzentration der letzten ein bis drei Wochen wider. Der Fructosaminwert der *Trpm5-knock out*-Maus wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz bestimmt, der HbA1c-Wert konnte mit den für humane Proben geeichten Geräten nicht ermittelt werden. Die Messungen wurden von Dr. Heidi Rossmann durchgeführt.

Die Fructosaminbestimmung wurde bei sechs *Trpm5-knock out*-Mäusen, drei Männchen und drei Weibchen in einem Alter von sechs Monaten durchgeführt. Dazu wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum, nachdem das Blut 30 Minuten bei Raumtemperatur geronnen war, durch eine zehnminütige Zentrifugation abgetrennt. Die in den Mausseren gemessenen Fructosaminwerte sind in der Tabelle 3.2 dargestellt. Zwischen den *Trpm5-knock out*-Mäusen ( $289 \pm 28 \mu\text{M/l}$ ) und den Wildtypmäusen ( $294 \pm 29 \mu\text{M/l}$ ) konnten keine signifikanten Unterschiede in den Fructosaminwerten beobachtet werden.

**Tabelle 3.2: Fructosaminwerte der *Trpm5-knock out*-Mäuse.**

Der Fructosaminwert wurde in den Seren sechs Monate alter *Trpm5-knock out*-Mäuse bestimmt (n = 6). Jede Maus besaß eine gleichaltrige und- geschlechtliche Wildtypmaus als Kontrolle, die aus demselben Wurf stammte. -/- = *Knock out*, +/+ = Wildtyp, MW = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Maus-Nr.	Trpm5-Genotyp	♂/♀	Fructosamin (μM/l)	Maus-Nr.	Trpm5-Genotyp	♂/♀	Fructosamin (μM/l)
z323	-/-	♂	270	z308	+/+	♂	288
z324	-/-	♂	267	z326	+/+	♂	270
z477	-/-	♂	305	z479	+/+	♂	345
z313	-/-	♀	279	z314	+/+	♀	264
z329	-/-	♀	273	z321	+/+	♀	294
z487	-/-	♀	340	z484	+/+	♀	305
<b>MW</b>	<b>-/-</b>	<b>♂+♀</b>	<b>289 ± 28</b>	<b>MW</b>	<b>+/+</b>	<b>♂+♀</b>	<b>294 ± 29</b>

## 4 DISKUSSION

Das zur TRP (*transient receptor potential*)-Familie gehörende TRPM5 stellte ursprünglich einen Kandidaten für tumorassoziierte Erkrankungen dar, die mit genetischen und epigenetischen Veränderungen in der humanen Chromosomenregion 11p15.5 einhergehen (Prawitt *et al.*, 2000). Die Ursache für das erhöhte Tumorrisiko, welches beispielsweise bei BWS (Beckwith-Wiedemann-Syndrom)-Patienten beobachtet wird, war zu diesem Zeitpunkt – und ist bis heute – weitestgehend unbekannt. So kann davon ausgegangen werden, dass in der Chromosomenregion 11p15.5 Gene mit onkogenem oder tumorsupprimierendem Charakter liegen müssen (Koi *et al.*, 1993; Reid *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Expression des *TRPM5*-Gens als auch die Funktion des TRPM5-Kanals in verschiedenen Zelltypen untersucht, um einen Zusammenhang zwischen *TRPM5* und den Erkrankungen, die mit seinem genomischen Locus assoziiert sind, herzustellen. Um die Funktion von *Trpm5* in einem Gesamtorganismus zu erforschen, wurde ein auf RNAi (*RNA interference*) basierendes *Trpm5-knock down*-Mausmodell generiert, welches eine reduzierte Menge des *Trpm5*-Kanalproteins exprimiert. Weitere funktionelle Versuche wurden mit der zur gleichen Zeit veröffentlichten *Trpm5-knock out*-Maus (Zhang, Y. *et al.*, 2003) durchgeführt.

### 4.1 Expression von *TRPM5*

Zu der Gewebespezifität der *TRPM5*-Expression wurden bisher widersprüchliche Daten veröffentlicht. Das *TRPM5*-Gen, früher *MTR1* genannt, wurde im Jahr 2000 von Dr. D. Prawitt und Dr. T. Enklaar in unserem Labor erstmals beschrieben. Die initiale Charakterisierung brachte ein sehr breites Expressionsmuster hervor – Transkripte des Gens fanden sich in nahezu allen untersuchten humanen und murinen Geweben, wie Niere, Leber, Lunge, Herz, Darm, Pankreas, Milz, Gehirn und Gonade (Enklaar *et al.*, 2000; Prawitt *et al.*, 2000). Auch zwei weitere Arbeitsgruppen konnten *Trpm5*-Transkripte in zahlreichen Mausorganen nachweisen (Fonfria *et al.*, 2006; Kunert-Keil *et al.*, 2006). Von einer weitaus spezifischeren Expression berichteten Pérez und Mitarbeiter; sie konnten lediglich in wenigen murinen Geweben überhaupt eine *Trpm5*-Expression nachweisen, die in Geschmackssinneszellen, Dünndarm und Magen stark, in Uterus und Hoden dagegen schwach zu verzeichnen war (Pérez *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003).

Zur Verifizierung des *TRPM5*-Expressionsmusters wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene humane, murine und Rattenzelllinien sowie Mausorgane mittels RT-PCR

untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl in B-Zellen des Immunsystems (A20.2J, Ramos), neuronalen Zellen (CATH.a), Epithelzellen (HeLa) sowie pankreatischen Betazellen (MIN6, INS-1 und RINm5F) *TRPM5*-Transkripte vorhanden sind. In anderen Zellen des Immunsystems, wie T-Zellen (Jurkat), monozytären Zellen (U937) und Mastzellen (RBL-2H3), sowie in Gefäßmuskelzellen (A7r5), Nierenepithelzellen (HEK 293), Phäochromozytomzellen (PC12) und Wilmstumorzellen (G401 und WT128) konnte dagegen keine *TRPM5*-Expression beobachtet werden (siehe Tabelle 3.1). Abgesehen von den Ramos-Zellen konnten in allen *TRPM5*-positiven Zelllinien auch Transkripte von *TRPM4*, des nächst verwandten TRP-Mitgliedes nachgewiesen werden. Diese Beobachtung führte zu zwei Hypothesen: dass TRPM5 und TRPM4 miteinander zu Heteromultimeren assoziieren können, was daraufhin in Coimmunpräzipitationsversuchen untersucht wurde – diese werden in Kapitel 4.5 beschrieben – und dass sie in derselben Signalkaskade funktionieren – was in Kapitel 4.7.4.1 ausführlich diskutiert wird.

Die mit murinen Geweben durchgeführten Expressionsanalysen bestätigen die Ergebnisse von Prawitt und Enklaar, da in allen untersuchten Mausorganen zumindest eine schwache *Trpm5*-Expression gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3.1). In Lunge, Auge, Pankreas, Milz und Hoden sechs Monate alter C57BL/6-Mäuse war die Expression besonders stark; in Herz, Leber und Zunge etwas schwächer. In Niere und Gehirn waren die *Trpm5*-spezifischen Signale sehr schwach, aber dennoch vorhanden.

## 4.2 Etablierung TRPM5-spezifischer Antikörper

Um die Ergebnisse der Expressionsanalysen, die auf RNA-Ebene durchgeführt wurden, auf Proteinebene zu verifizieren, sollten *Western Blot*-Analysen mit Zellextrakten und immunhistochemische Analysen mit Mausgeweben durchgeführt werden. Da zu Beginn dieser Dissertation kein TRPM5-spezifischer Antikörper bekannt war, wurden zum einen eigene Antikörper synthetisiert, zum anderen wurden unserem Labor von den Arbeitsgruppen Dr. B. Miller (Milton S. Hershey Medical Center, Pennsylvania, USA) und Prof. E. Liman (University of Southern California, USA) synthetisierte Antikörper zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus diente die Aminosäuresequenz des Epitops, der von Zhang und Mitarbeitern zur Generierung eines *Trpm5*-spezifischen Antikörpers verwendet wurde (Zhang, Y. *et al.*, 2003) als Grundlage für die Herstellung eines weiteren eigenen Antikörpers (TRPM5-1909), so dass in Rahmen der vorliegenden Arbeit insgesamt sechs gegen das murine und/oder humane TRPM5-Protein generierte polyklonale Antikörper auf ihre Spezifität getestet wurden.

Keiner der Antikörper konnte in *Western Blot*- oder in immunhistochemischen Analysen als TRPM5-spezifisch bewertet werden, obwohl der Antikörper TRPM5-1909 in *Western Blot*-Analysen mit einigen Zellextrakten, die aus endogen *Trpm5*-exprimierenden Zellen und Geweben stammten, eine deutliche Proteinbande hervorrief, deren Größe dem theoretischen Molekulargewicht des *Trpm5*-Proteins (ca. 130 kDa) entspricht. Dieses Signal hob sich vor allem in der pankreatischen Betazelllinie MIN6 deutlich von den Hintergrundbanden ab (siehe Abbildung 3.6); es konnte jedoch in nachfolgenden Experimenten als ein wahrscheinlich *Trpm5*-unspezifisches Signal eingestuft werden, das vermutlich durch Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen, unbekanntem Protein hervorgerufen wurde. Dass der von Zhang und Mitarbeitern publizierte Antikörper, der von ihnen erfolgreich zur Detektion des *Trpm5*-Proteins im Zungengewebe verwendet wurde (Zhang, Y. *et al.*, 2003), in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte, kann dadurch erklärt werden, dass zwar in beiden Fällen die gleiche Epitopsequenz zur Antikörperherstellung verwendet wurde, im Rahmen dieser Arbeit jedoch ein neues Tier immunisiert werden musste, welches individuelle Antikörper bildete, die sich von dem publizierten Antikörper unterscheiden.

Die Kreuzreaktivität stellt vermutlich ein generelles Problem bei der Herstellung von TRP-spezifischen Antikörpern dar, da die Sequenzkonserviertheit innerhalb der TRP-Familie die individuellen Sequenzabschnitte der einzelnen TRPs, die sich als Epitope eignen, entscheidend einschränkt. Insbesondere unter Subfamilienmitgliedern kann die Sequenzkonserviertheit sehr hoch sein; so weisen einige Proteine der TRPC- und TRPV-Familien eine Homologie von 75-80 % auf Aminosäureebene auf (Clapham, 2003; Dietrich *et al.*, 2005). Die Sequenzhomologie zwischen TRPM5 und dem nächst verwandten Protein, TRPM4, beträgt zwar nur 41 % auf Aminosäureebene (Vriens *et al.*, 2004), doch haben alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Antikörper, die gegen TRPM5 generiert wurden, in *Western Blot*-Analysen mit HEK 293-Zellextrakten zahlreiche Proteinbanden erzeugt (siehe Abbildungen 3.8 und 3.9), die höchstwahrscheinlich durch Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen TRPs oder verwandten Kanalproteinen zustande kamen, da die HEK 293-Zellen *TRPM5* nicht endogen exprimieren (vgl. Tabelle 3.1).

Dass die getesteten Antikörper nicht spezifisch für TRPM5 sind, kann verschiedene Ursachen haben. Im Falle der Antikörper TRPM5-C und TRPM5-1975 liegen die ausgesuchten Peptidsequenzen, die als Epitope verwendet wurden, zwischen den zwei letzten Transmembrandomänen des TRPM5-Proteins (siehe Abbildung 3.5). Möglicherweise wird durch die komplexe dreidimensionale Struktur dieser porenbildenden Region, welche die



individuellen Selektivitäts- und Permeabilitätseigenschaften eines Ionenkanals definiert (Owsianik *et al.*, 2006b), eine Antikörperbindung verhindert. Außerdem lagern sich an dieser Proteinregion vier TRP-Untereinheiten zusammen, auch wenn die eigentliche Interaktion über andere Proteindomänen stattfindet, um die hydrophile Pore des Ionenkanals zu bilden (Vannier *et al.*, 1998; siehe Abbildung 1.3). So könnten in immunhistochemischen Analysen, die *in situ* stattfinden, für die Antikörper relevante Bindungsstellen durch die Assoziation der TRP-Proteine blockiert werden. Zugänglicher wären in diesem Falle die Bindungsstellen für die übrigen vier untersuchten Antikörper, deren Epitope intrazelluläre Peptidsequenzen darstellen: TRPM5-N am langen N-terminalen Abschnitt des TRPM5-Proteins, sowie TRPM5-1909, TRPM5-1976 und TRPM5-TB3 am C-terminalen Ende des Proteins. Dass auch diese Antikörper nicht in der Lage waren, TRPM5 spezifisch zu detektieren, könnte an der Faltung des TRPM5-Proteins in diesen Bereichen liegen, die möglicherweise keine effektive Antikörperbindung erlaubt. Da die zur Immunisierung verwendeten Epitope in der Regel 16-20 Aminosäuren lang waren – lediglich für TRPM5-TB3 wurde ein 70 Aminosäuren langes Peptid als Epitop verwendet – könnten die Bindungsstellen der Antikörper in dem nativen TRPM5-Protein andere dreidimensionale Strukturen annehmen als in Peptidform. Möglicherweise könnte dieses Problem durch die Verwendung längerer Epitope umgangen werden; im Idealfall könnte das gesamte TRPM5-Protein zur Immunisierung der Tiere eingesetzt werden, um geeignete Antikörper zu generieren.

### **4.3 Charakterisierung der *TRPM5*-überexprimierenden HEK 293-Zelllinie**

Für die funktionellen Untersuchungen des humanen TRPM5-Proteins wurde eine *TRPM5*-überexprimierende Zelllinie generiert. Hierzu wurde die humane Nierenepithelzelllinie HEK 293 (*human embryonic kidney*) gewählt, die in der Ionenkanalforschung, insbesondere in der Elektrophysiologie, breite Anwendung findet. Die Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA3-TRPM5 stabil transfiziert, so dass die daraus resultierende M1-Zelllinie die lange Spleißvariante des humanen TRPM5-Proteins (TRPM5-long) konstitutiv überexprimiert. Die Kontrollzelllinie P1 wurde mit dem gleichen Expressionsvektor, der jedoch keine *TRPM5*-cDNA enthielt, hergestellt (siehe Abbildung 3.2).

#### **4.3.1 Auswirkung der *TRPM5*-Überexpression auf die Zellproliferation**

Bereits mehrere TRPs sind mit der tumorigenen Entartung von Zellen in Verbindung gebracht worden (TRPM1, TRPM8, TRPV1, TRPV6; Duncan *et al.*, 1998; Lazzeri *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2001; Tsavaler *et al.*, 2001). In diesen Fällen sind jedoch nicht die Gene der TRPs selbst von Mutationen betroffen, sondern die Expression der Gene ist in verschiedenen

Tumorarten im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht oder vermindert. Während *TRPM1* nach dem heutigen Wissensstand lediglich in Melanomzellen eine veränderte Expression zeigt, wird *TRPV6* in Karzinomen verschiedenen Ursprungs (Prostata, Kolon, Schilddrüse, Brust und Ovar) erhöht exprimiert (Fixemer *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2001; Wissenbach *et al.*, 2001; Zhuang *et al.*, 2002). Oft korreliert die Expressionsstärke – direkt oder umgekehrt proportional – mit dem Schweregrad der Erkrankung, wie im Falle des *TRPM1*-Gens, dessen Expression mit steigender Aggressivität des Melanoms abnimmt (Duncan *et al.*, 1998). Obwohl für *TRPM1* und *TRPM8* tumorsupprimierende bzw. onkogene Eigenschaften postuliert wurden, gehört die veränderte Expression der TRP-Gene wahrscheinlich eher zu den sekundären als zu den primären Ereignissen der Tumorentwicklung (Prevarskaya *et al.*, 2007). Trotzdem können sich einige TRPs zukünftig als geeignete Marker erweisen, um Voraussagen über den Verlauf einer Erkrankung zu treffen, darüber hinaus stellen die betroffenen TRPs auch potenzielle therapeutische Ziele dar (Prevarskaya *et al.*, 2007).

Da das *TRPM5*-Gen in einer Chromosomenregion liegt, die mit tumorassoziierten Erkrankungen in Verbindung steht, wurde mit Hilfe der M1-Zelllinie untersucht, ob die Überexpression von *TRPM5* Auswirkungen auf die Zellproliferation hat. Weder im Zellzyklusprofil noch im Proliferationsassay konnten Auffälligkeiten beobachtet werden, und auch in *in vivo*-Untersuchungen mit immundefizienten Mäusen zeigten die Zellen keine tumorigenen Eigenschaften. Zusammen betrachtet liefern diese Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass *TRPM5* direkt an der Regulation der Zellproliferation oder an der Tumorentstehung beteiligt ist. Eine Beteiligung an sekundären Ereignissen der Tumorentwicklung wäre dennoch denkbar, da eine *TRPM5*-Expression in vielen Wilmstumoren und Rhabdomyosarkomen nachgewiesen wurde (Prawitt *et al.*, 2000).

#### **4.3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften des TRPM5-Kanals**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof R. Penner (Universität Hawaii, USA) durchgeführte *Patch-clamp*-Ganzzellaufnahmen der M1-Zellen zeigten, dass *TRPM5* nicht konstitutiv aktiv ist, sondern erst bei hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aktiviert wird. Hierbei ist jedoch nicht die absolute Konzentration, sondern die Geschwindigkeit des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs von entscheidender Bedeutung. Ein rascher, kurzzeitiger  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg kann beispielsweise durch Thrombin induziert werden: Die Thrombin-vermittelte Rezeptorstimulation führt zur Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, die sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und sarkoplasmatischen Retikulum (SR) befinden, und zum speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (SOCE, *store-operated calcium*

entry, siehe Abbildung 1.1) aus dem Extrazellulärraum (Sandoval *et al.*, 2001). Cyclopiazonsäure (CPA, *cyclopiazonic acid*) und Ionomycin rufen dagegen einen wesentlich langsameren  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg hervor, hierbei inhibiert CPA membranständige  $Ca^{2+}$ -ATPasen im ER und SR, wodurch der  $Ca^{2+}$ -Transport in diese Organellen blockiert wird und Ionomycin ist als  $Ca^{2+}$ -Ionophor in der Lage,  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Membranen zu transportieren (Seidler *et al.*, 1989; Morgan und Jacob, 1994). Während Thrombin in der Lage war, den TRPM5-Kanal zu aktivieren, konnten weder CPA noch Ionomycin TRPM5-spezifische Ströme induzieren (siehe Abbildung 3.17), obwohl mit diesen Substanzen eine ebenso hohe oder sogar höhere intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration als mit Thrombin erreicht wurde.

Die  $Ca^{2+}$ -Speicherabhängigkeit des TRPM5-Kanals wurde mit BAPTA und  $IP_3$  getestet. BAPTA (1,2-bis[2-aminophenoxy]ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) bindet als  $Ca^{2+}$ -Chelator  $Ca^{2+}$ -Ionen in der intrazellulären Lösung, was zum passiven Nachströmen von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern führt.  $IP_3$  (Inositol [1,4,5]-Trisphosphat) bindet wiederum an seinen Rezeptor in der Membran des ER bzw. SR, wodurch ein  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus intrazellulären Speichern mit nachfolgendem  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch den SOCE-Mechanismus induziert wird. Weder mit BAPTA noch mit der Kombination BAPTA/ $IP_3$  konnte TRPM5 aktiviert werden. TRPM5 stellt somit zwar einen  $Ca^{2+}$ -aktivierbaren, aber  $Ca^{2+}$ -speicherunabhängigen Kanal dar.

Die TRPM5-spezifischen Ströme nahmen nur bis zu einer bestimmten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu. Bei 840 nM  $[Ca^{2+}]_i$  wurde die Hälfte der maximal erreichbaren Aktivität der Kanäle erreicht ( $EC_{50}$ , *median effective concentration* = 840 nM) und ab 1  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]_i$  nahm die Aktivität wieder ab ( $IC_{50}$ , *median inhibition concentration* = 1  $\mu$ M, siehe Abbildung 3.15). Diese Eigenschaft unterscheidet TRPM5 von dem nahe verwandten TRPM4-Kanal, der zwar einen ähnlichen  $EC_{50}$ -Wert besitzt, jedoch bis 1,8  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]_i$  keine Inaktivierung zeigt (siehe Abbildung 3.15 C; Launay *et al.*, 2002). Die TRPM5-spezifische Aktivierungskinetik ist durch eine schnelle Aktivierung und schnelle Inaktivierung charakterisiert. Diese rasche Inaktivierung – eine weitere Eigenschaft, die TRPM5 von TRPM4 unterscheidet – ist unabhängig von  $[Ca^{2+}]_i$  und stellt vermutlich einen in TRPM5 „eingebauten“ Mechanismus dar.

Zwischen TRPM5 und TRPM4 finden sich jedoch auch Gemeinsamkeiten: Wie TRPM4 ist auch TRPM5 ein  $Ca^{2+}$ -aktivierter, nicht-selektiver (CAN, *Ca<sup>2+</sup>-activated non-selective*) Kationenkanal, der monovalente Ionen leitet und impermeabel für  $Ca^{2+}$ -Ionen ist (siehe Abbildung 3.16). Die ursprünglich in kardialen Zellen (Colquhoun *et al.*, 1981) beschriebenen

CAN-Kanäle sind für die Kontrolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms essentiell, da sie die Zellmembran depolarisieren können. In elektrisch erregbaren Zellen, deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hauptsächlich über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgt, erhöht eine Membrandepolarisation den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, während in elektrisch nicht-erregbaren Zellen, deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch SOCs vermittelt wird oder rezeptorabhängig verläuft, eine Membrandepolarisation sich inhibitorisch auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auswirkt (Mohr und Fewtrell, 1987; Petersen, 2002). TRPM4 und TRPM5 sind bisher die einzigen CANs, die molekular identifiziert wurden (Vennekens *et al.*, 2007). Weitere Gemeinsamkeiten von TRPM4 und TRPM5 konnten in der Leitfähigkeit der Kanäle beobachtet werden; die Ableitung der TRPM5-Einzelkanalströme in der *Inside-out*-Konfiguration ergab als Leitfähigkeit 25 Pikosiemens, die der Leitfähigkeit des TRPM4-Kanals ähnelt (siehe Abbildung 3.18 C; Launay *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind beide Kanäle spannungsabhängig, da bei positiven Potentialen die Offenwahrscheinlichkeiten und Offenzeiten der Kanäle erhöht sind, wodurch starke, auswärts gerichtete Ströme entstehen (siehe Abbildungen 3.15 B und 3.18 B; Nilius *et al.*, 2003).

Zeitnah zu den hier beschriebenen elektrophysiologischen Versuchen wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen ähnliche Untersuchungen durchgeführt (Hofmann *et al.*, 2003; Liu und Liman, 2003). Die Ergebnisse stimmen mit den oben geschilderten Daten in ihren wesentlichen Aspekten, wie der transienten Natur des TRPM5-spezifischen Stromes, der Regulation des Kanals durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der Leitfähigkeit, der Selektivität für monovalente Ionen sowie der Spannungsabhängigkeit überein. Als einziger Unterschied ist die zur TRPM5-Aktivierung benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu nennen, die bei den anderen Arbeitsgruppen deutlich höher lag ( $\text{EC}_{50} = 20\text{-}30 \mu\text{M}$  im Vergleich zu  $840 \text{ nM}$ ). Dieser Unterschied kommt entweder durch die unterschiedliche Versuchsanordnung zustande oder er spiegelt die tatsächliche funktionelle Vielfalt des Kanals unter verschiedenen physiologischen Bedingungen wider. Liu und Mitarbeiter zeigten außerdem, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des TRPM5-Kanals durch  $\text{PIP}_2$  reguliert wird (Liu und Liman, 2003).

#### **4.4 Zelluläre Lokalisation der TRPM5-Spleißvarianten und Funktion von TRPM5-short**

Bisher wurden lediglich für den Menschen zwei verschiedene *TRPM5*-Spleißvarianten beschrieben; für andere Organismen sind keine alternativen Spleißformen bekannt. Das Spleißen des Exons 18 im humanen *TRPM5*-Transkript verkürzt das Genprodukt nicht nur um das fehlende Exon, denn die nachfolgenden Nukleotide des Exons 19 erfahren eine Leserasterverschiebung, die bereits nach neun Nukleotiden ein vorzeitiges Stop-Codon

erzeugt. Während TRPM5-long, das 1165 Aminosäuren besitzt, ein funktionelles Kanalprotein darstellt, fehlen dem nur 872 Aminosäuren großen TRPM5-short diejenigen C-terminalen Proteinbereiche, die für den Aufbau der membrandurchspannenden Kanalpore verantwortlich sind. Vier der sechs TRPM5-typischen Transmembrandomänen bleiben bei TRPM5-short jedoch erhalten. Auch für TRPM1 und TRPM2, die zu den nahen Verwandten des TRPM5 Proteins gehören, sind kurze Spleißvarianten beschrieben worden. Diese funktionieren auf unterschiedliche Weise als Kanalblocker: TRPM1-S, welches keine Transmembrandomänen besitzt, liegt im Zytoplasma verteilt vor. Es ist in der Lage, die Kanalaktivität zu unterbinden, indem es die Translokation von TRPM1-L zur Zellmembran verhindert (Xu *et al.*, 2001). TRPM2-S wiederum besitzt zwei N-terminale Transmembrandomänen und ist wie TRPM2-L in der Zellmembran lokalisiert. Werden beide Spleißformen in derselben Zelle exprimiert, wird der TRPM2-Kanal durch die Interaktion der Proteine blockiert (Zhang, W. *et al.*, 2003).

Um die Lokalisation der beiden humanen TRPM5-Spleißformen in der Zelle zu untersuchen, wurden sie an EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gekoppelt. Dazu wurde die EGFP-cDNA vor die Sequenz der jeweiligen TRPM5-Variante in die zuvor hergestellten pcDNA3-TRPM5-Konstrukte eingefügt. Mit den fertigen Fusionskonstrukten wurden TRPM5/EGFP-überexprimierende HEK 293-Zelllinien (PLE und PSE) hergestellt, die das entsprechende Fusionsprotein aus N-terminalem EGFP und C-terminalem TRPM5 stabil überexprimieren. Anhand der EGFP-Fluoreszenz konnte gezeigt werden, dass beide TRPM5-Spleißvarianten vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert sind (siehe Abbildung 3.14). Höchstwahrscheinlich ist dies auch bei endogen exprimiertem TRPM5 der Fall, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass TRPM5, ähnlich wie das nahe verwandte TRPM4 (Cheng *et al.*, 2007) zusätzlich in Vesikeln gelagert wird und bei Bedarf zur Zelloberfläche transportiert und in die Zellmembran integriert wird.

Durch Coexpression der beiden TRPM5-Spleißformen in HEK 293-Zellen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich die Lokalisation der langen Spleißvariante oder die Aktivität des TRPM5-Kanals durch die Anwesenheit von TRPM5-short ändert. Dazu wurde zunächst eine TRPM5-short-überexprimierende HEK 293-Zelllinie (PS) hergestellt, die mit dem TRPM5-long/EGFP-Expressionskonstrukt transfiziert wurde, so dass in der fertigen Zelllinie (PS+PLE) schließlich beide TRPM5-Varianten exprimiert wurden. Fluoreszenzmikroskopisch war keine Änderung in der Lokalisation von TRPM5-long zu beobachten (siehe Abbildung 3.20). Elektrophysiologische Versuche, die in Kooperation mit

der Arbeitsgruppe Prof. A. Fleig und Prof R. Penner durchgeführt wurden, belegten – nachdem gezeigt wurde, dass die Kopplung von EGFP an TRPM5-long die Aktivität des TRPM5-Kanals nicht beeinflusst – dass die kurze Spleißform die Aktivität des TRPM5-Kanals inhibieren kann (siehe Abbildung 3.21): Nach einer Stimulation mit 500 nM  $[Ca^{2+}]_i$  wurden in elf von 14 untersuchten Zellen keine TRPM5-spezifischen Ströme gemessen. Dass in drei der 14 Zellen TRPM5-spezifische Ströme gemessen wurden, kann beispielsweise dadurch zustande kommen, dass die TRPM5-short-Expression in diesen Zellen nicht ausreichend stark war, um alle in der Zelle vorhandenen TRPM5-Kanäle vollständig zu blockieren. Auch in Zellen, die lediglich TRPM5-short exprimieren, wurden erwartungsgemäß keine TRPM5-typischen Ströme detektiert.

Dieser Regulationsmechanismus ist vermutlich nicht für alle Mitglieder der TRP-Familie charakteristisch, da bisher lediglich für wenige Familienmitglieder solche inhibierenden Spleißvarianten beschrieben wurden. Darüber hinaus kommen wahrscheinlich auch speziesspezifische Unterschiede vor, denn während die kurze TRPM5-Spleißvariante nur beim Menschen und nicht in der Maus identifiziert wurde (Prawitt *et al.*, 2000) – und auch TRPM2-S bisher lediglich in humanen Zellen beschrieben wurde (Zhang *et al.*, 2006) – kommt TRPM1-S sowohl in humanen als auch murinen Zellen vor (Duncan *et al.*, 1998; Fang und Setaluri, 2000).

#### 4.5 Interaktion von TRPM5 und TRPM4

TRPM5 und TRPM4, die auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 41 % aufweisen, bilden zusammen eine Subgruppe der TRPM-Familie (Fleig und Penner, 2004; Kraft und Harteneck, 2005; Vriens *et al.*, 2004). Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, sind sich TRPM5 und TRPM4 auch in ihren Kanaleigenschaften in vieler Hinsicht ähnlich: Beide werden durch  $Ca^{2+}$  aktiviert, leiten monovalente Kationen in nicht-selektiver Weise und sind weitestgehend impermeabel für divalente Ionen. TRPM5 unterscheidet sich jedoch vor allem durch seine Aktivierungskinetik – schnelle Aktivierung und ebenso schnelle Inaktivierung – von TRPM4, da letzterer nach der Aktivierung länger (mehrere hundert Millisekunden; Zhang *et al.*, 2005) offen bleibt.

Viele der TRP-Proteine können miteinander zu funktionellen Kanälen assoziieren. Vor allem Mitglieder der TRPC-Familie bilden untereinander in verschiedenen Kombinationen heteromere Kanäle, deren Eigenschaften sich von jenen der homomeren Kanäle wesentlich unterscheiden können. Auch für TRPM6 und TRPM7 wurde eine solche Assoziation zu heteromeren Kanälen beschrieben, während für TRPM5 und TRPM4 eine Interaktion bisher

lediglich vermutet wurde (Chubanov *et al.*, 2004; Fleig und Penner, 2004). Um die Interaktion von TRPM5 und TRPM4 mittels Coimmunpräzipitation genauer zu untersuchen, wurden die Proteine in HEK 293-Zellen coexprimiert. Da weder für TRPM5 noch für TRPM4 geeignete Antikörper zur Verfügung standen, wurde EGFP-gekoppeltes TRPM5 und mit dem Affinitäts-tag V5 versehenes TRPM4 verwendet. Die in Kapitel 4.4 beschriebene TRPM5-long/EGFP-exprimierende HEK 293-Zelllinie wurde mit dem Expressionsplasmid pcDNA4TO-V5-TRPM4b transfiziert und die Proteine 48 Stunden nach Transfektion für die Coimmunpräzipitation isoliert. Da der EGFP-spezifische Antikörper im *Western Blot* Hintergrundbanden erzeugte, die ein falsch positives Ergebnis lieferten, wurde dieser Antikörper für den Präzipitationsschritt benutzt, während der V5-spezifische Antikörper für den anschließenden *Western Blot* verwendet wurde. Obwohl eine Heteromerisierung der Proteine auch in Hinblick auf die gemeinsame Expression in verschiedenen Zelllinien (vgl. Kapitel 4.1) wahrscheinlich erschien, konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.22). Parallel durchgeführte Coimmunpräzipitationsanalysen von Dr. P. Launay und Mitarbeitern (Harvard Medical School, Boston, USA) mit FLAG-gekoppeltem TRPM5 und V5-gekoppeltem TRPM4 wiesen ebenfalls auf keine Interaktion hin (persönliche Mitteilung). TRPM5 und TRPM4 scheinen also demzufolge keine Heteromere zu bilden, sondern funktionieren eher als individuelle Kanäle in einer gemeinsamen Signalkaskade, die in Kapitel 4.7.4.1 beschrieben wird.

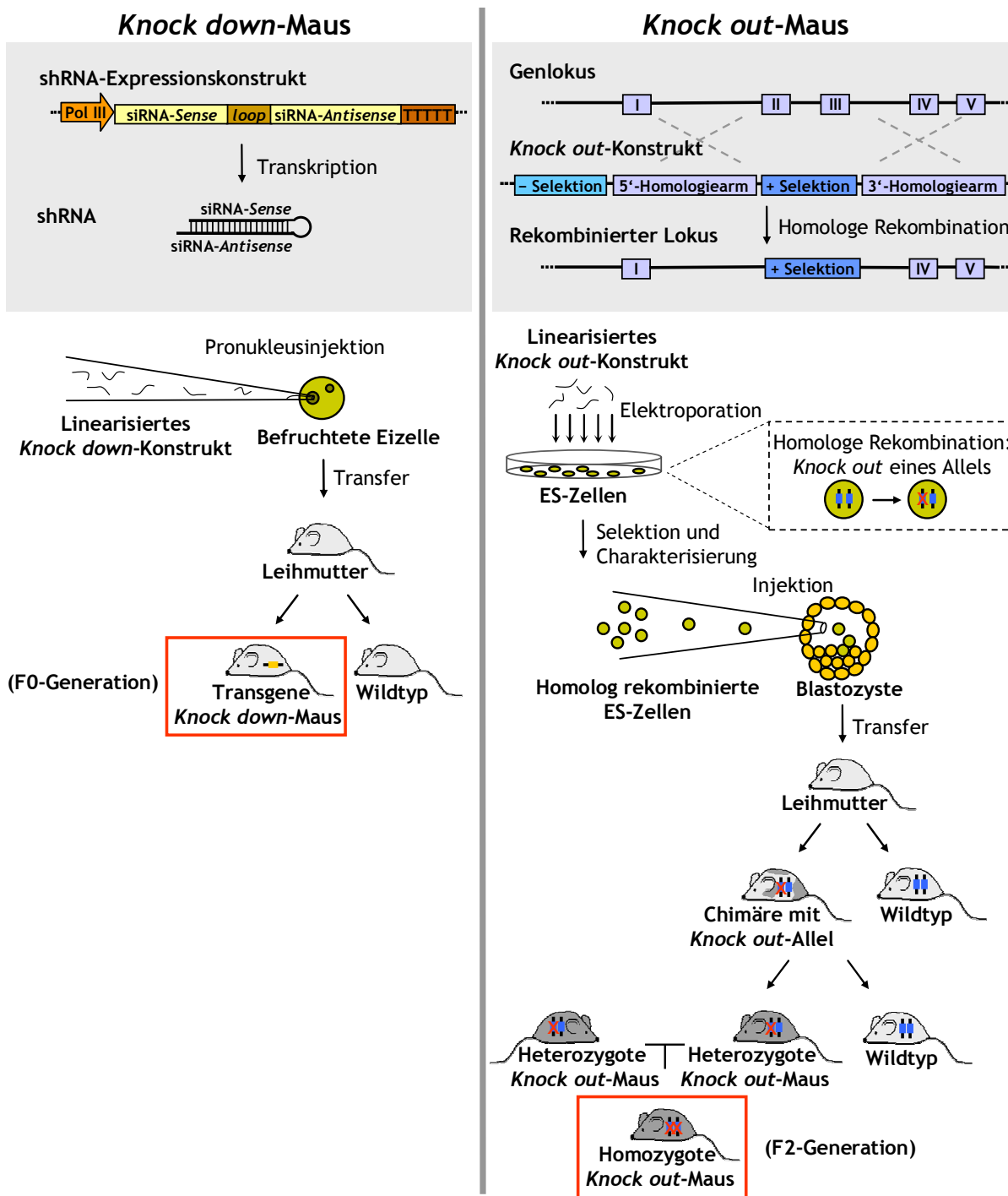
#### 4.6 *Trpm5-knock down*-Mäuse

Genetische Mausmodelle gehören zum Standard der heutigen biomedizinischen Forschung. RNAi stellt bei der Herstellung der Mausmodelle eine attraktive Alternative zu der klassischen *Knock out*-Technologie dar, weil sie zum einen relativ kostengünstig ist und zum anderen in der Regel weit weniger Zeit in Anspruch nimmt (Abbildung 4.1). Ist die mittels RNAi erreichte Herunterregulation stark, so kann der *Knock down*-Effekt sogar mit einem vollständigen *Knock out* verglichen werden. So konnten beispielsweise mit *Rasa1* (*Ras-GTPase-aktivierendes Protein 1*)- und *Sod2* (*Superoxiddismutase 2*)-*knock down*-Mäusen die entsprechenden *Knock-out*-Phänotypen rekapituliert werden (Kunath *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2006).

Die ersten RNAi-basierten *Knock down*-Mausmodelle wurden hergestellt, indem die siRNA in die Schwanzvene oder in die Bauchhöhle der Maus injiziert wurde. Durch die Schwanzveneninjektion konnte zum Beispiel das *Fas*-Gen in der Leber der Maus und durch die Intraperitonealinjektion *TNF- $\alpha$*  herunterreguliert werden (Song *et al.*, 2003; Sorensen *et*

*al.*, 2003). Da mit diesen Methoden jedoch meist nur kurzzeitige *Knock down*-Effekte erzielt wurden und die Verteilung der siRNA im Gesamtorganismus schwer vorauszusagen war, wurden bald siRNA- und shRNA-Expressionssysteme entwickelt, die eine konstitutive posttranskriptionelle Herunterregulation des gewünschten Gens ermöglichen (Brummelkamp *et al.*, 2002; Hasuwa *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002; Miyagishi und Taira, 2002; Paddison *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002). Diese siRNA- bzw. shRNA-Vektoren, die für die Transkription der kurzen RNA meist einen RNA-Polymerase III-Promotor wie U6 oder H1 enthalten und über Kontrollelemente des Cre-Lox-, Tet- oder ähnlichen Systems verfügen, exprimieren entweder zwei kurze RNA-Moleküle, die in der Zelle zu funktionellen siRNA-Molekülen paaren, oder – wie das in Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete pTER-Plasmid (Van de Wetering *et al.*, 2003) – kurze, haarnadelförmige shRNA (*short hairpin RNA*)-Moleküle, die in der Zelle durch das Dicer-Enzym zu siRNA prozessiert werden (siehe hierzu auch Abbildung 3.23).





**Abbildung 4.1: Generierung von *Knock down*- und *Knock out*-Mäusen.**

Dargestellt sind die benötigten Konstrukte und die einzelnen Schritte bis hin zum fertigen Mausmodell. Zur Herstellung einer *Knock down*-Maus kann das RNAi-Konstrukt beispielsweise als Transgen in die befruchtete Mausoozyte injiziert werden. Zur Generierung einer *Knock out*-Maus wird das *Knock out*-Konstrukt mittels homologer Rekombination in das Genom von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) integriert, wo es das endogene Gen ersetzt. Während die *Knock down*-Maus schon in der Filialgeneration F0 vorhanden ist, erhält man die homozygote *Knock out*-Maus aufgrund weiterer Kreuzungsschritte erst in der F2-Generation (Abbildung leicht verändert in Prawitt *et al.*, 2004 veröffentlicht).

#### 4.6.1 Generierung der transgenen *Trpm5-knock down*-Mauslinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei *TRPM5*-spezifische siRNA-Sequenzen (*TRPM5*-siRNA1 und *TRPM5*-siRNA2, siehe Abbildung 3.24) ausgesucht. Auf diesen basierend wurden zwei shRNA-Expressionskonstrukte (*pTER-TRPM5-siRNA1* und *pTER-TRPM5-siRNA2*) hergestellt, deren Funktionalität und *Knock down*-Effizienz in Zellkulturexperimenten getestet wurde. Um den Grad der Genstilllegung sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene beurteilen zu können, wurde hierzu das murine *Trpm5*-Gen mit einem FLAG-Affinitäts-tag versehen. Das fertige *Trpm5/FLAG*-Expressionskonstrukt wurde durch Cotransfektion mit je einem der *pTER*-Konstrukte in murine Zellen gebracht, und der *Knock down*-Effekt wurde mittels semiquantitativer RT-PCR und *Western Blot* untersucht. Beide Konstrukte waren im gleichen Maße in der Lage, *Trpm5/FLAG* herunterzuregulieren (siehe Abbildung 3.29). Nach längeren Versuchszeiten konnte der *Knock down*-Effekt erhöht werden: 48 Stunden nach Transfektion war der *Knock down*-Effekt sowohl auf Transkript- als auch Proteinebene deutlicher zu erkennen als 24 Stunden nach Transfektion. Wahrscheinlich war nach dieser Zeit das Verhältnis der exprimierten siRNA zum Zieltranskript günstiger, um eine effiziente Herunterregulation zu erzielen; außerdem kam vermutlich erst nach dieser längeren Versuchszeit die Halbwertszeit des *Trpm5/FLAG*-Proteins zum Tragen.

Bei endogen exprimiertem *Trpm5*, welches in MIN6-Zellen lediglich auf RNA-Ebene untersucht werden konnte, waren minimale Unterschiede zwischen den zwei *pTER*-Konstrukten zu beobachten: Mit *pTER-TRPM5-siRNA1* konnte eine stärkere *Knock down*-Wirkung erzielt werden als mit *pTER-TRPM5-siRNA2* (siehe Abbildung 3.30 A). Dass dieses Ergebnis nicht mit der ersten Beobachtung übereinstimmt, liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Expressionsstärke der Ziel-Transkripte (überexprimiertes *Trpm5/FLAG* im Vergleich zu endogenem *Trpm5*), wobei die *Trpm5*-Expression in MIN6-Zellen eher den physiologischen Verhältnissen entspricht. Aufgrund dieser Überlegung und der Tatsache, dass ausschließlich die durch *pTER-TRPM5-siRNA1* exprimierte siRNA mittels *Northern Blot* nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.30 B), wurde das *pTER-TRPM5-siRNA1*-Konstrukt für die Herstellung der transgenen *Trpm5-knock down*-Maus gewählt. Diese Maus sollte im Falle einer ausreichenden *Knock down*-Effizienz phänotypisch charakterisiert werden und weiteren funktionellen Tests zur Verfügung stehen. Da der H1-Promotor des *pTER*-Plasmids mit dem Tet-Operator ausgestattet ist, bestünde darüber hinaus die Möglichkeit, die siRNA-Expression und damit die Genstilllegung durch Tetrazyklin regulierbar zu gestalten (siehe Abbildung 3.25); dazu müsste die *Knock down*-Maus jedoch zuvor mit einer Tet-Repressor-Maus verpaart werden. In Abwesenheit des Tet-Repressors ist

der H1-Promotor konstitutiv aktiv, so dass eine kontinuierliche siRNA-Expression gewährleistet ist.

#### 4.6.2 Initiale Charakterisierung der *Trpm5-knock down*-Mauslinien

Aus der Pronukleusinjektion, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Bockamp (Toxikologie, Universität Mainz) durchgeführt wurde, gingen 23 potenziell transgene Mäuse hervor. Vier von diesen Mäusen wurden als tatsächlich transgen identifiziert und konnten als pTER-Mauslinien (pTER 3608, 3620, 3621 und 3623) etabliert werden. Um zu untersuchen, wie effektiv die *Trpm5*-Herunterregulation in den pTER-Mäusen ist, wurde die *Trpm5*-Expressionsstärke in fünf Organen (Niere, Hoden, Herz, Leber und Zunge) bei sechs bis sieben Wochen alten Mäusen der F1-Generation bestimmt und mit der Expressionsstärke wildtypischer Referenzmäuse, die aus denselben Würfen stammten, verglichen. Da die für die RNAi-vermittelte Genregulation benötigten Komponenten (zum Beispiel Dicer oder Proteine des RISC-Komplexes; siehe hierzu auch Abbildung 3.23) zelltyp- und entwicklungsstadienspezifisch exprimiert werden (Oberdoerffer *et al.*, 2005), überrascht es nicht, dass die Reduktion des *Trpm5*-Transkriptes in verschiedenen Geweben offensichtlich unterschiedlich stark ist: Der *Knock down*-Effekt ist hauptsächlich in der Leber und in der Zunge zu erkennen (siehe Abbildung 3.34). Unerwartet ist jedoch das Ergebnis im Hodengewebe, da hier bei keiner der pTER-Linien eine Transkriptreduktion zu beobachten ist, obwohl beispielsweise in den Sertolizellen nachweislich Komponenten der RNAi-Maschinerie exprimiert werden (Papaioannou *et al.*, 2009). Möglicherweise sind jedoch nicht alle RNAi-Komponenten vorhanden, oder sie üben in diesen Zellen andere Funktionen als in anderen Zelltypen aus. Da das Verhältnis der siRNA zum Zieltranskript die RNAi-Effizienz entscheidend beeinflusst (Oberdoerffer *et al.*, 2005), ist auch möglich, dass bei den pTER-Mäusen die Expressionsstärke der siRNA im Vergleich zur *Trpm5*-Transkriptmenge nicht in allen Geweben optimal ist, so dass es aus diesem Grund nicht in allen Organen zu einer detektierbaren Herunterregulation kommt. Eine stärkere siRNA-Expression durch ein effizienteres Expressionskonstrukt würde jedoch vermutlich keine Lösung für dieses Problem darstellen, da bei der Anwendung der RNAi-Technik toxische bzw. inflammatorische Effekte beobachtet wurden, die vor allem durch die hohe und konstitutive Expression der shRNA bzw. siRNA zustande kommen. So interferiert die hoch exprimierte shRNA zum Beispiel in Hepatozyten wahrscheinlich mit der natürlichen Funktion der miRNA, da beide um die Faktoren der zellulären RNAi-Maschinerie konkurrieren (Grimm *et al.*, 2006).

Unter den Mauslinien ist die *Knock-down*-Effizienz unterschiedlich stark ausgeprägt: Während bei pTER 3608 gar keine *Trpm5*-Herunterregulation beobachtet werden konnte, wurden bei pTER 3623 sowohl in der Leber als auch in der Zunge deutlich reduzierte Transkriptmengen beobachtet. Diese unterschiedliche *Knock-down*-Effizienz der pTER-Linien kann als epi-allelische Reihe (engl. *epi-allelic series*; Hemann *et al.*, 2003) betrachtet werden (Prawitt *et al.*, 2004), obwohl solche Reihen der graduellen Genstilllegung üblicherweise durch unterschiedlich effiziente siRNAs hergestellt werden, die gegen verschiedene Sequenzen innerhalb eines Zielgens gerichtet sind, wie beispielsweise für *p53* (Hemann *et al.*, 2003) sowie *Erk1* und *Erk2* (Wille *et al.*, 2007) beschrieben wurde. Solche Reihen sind insbesondere für Gendosis-Fragestellungen interessant und ermöglichen auch diejenigen Gene zu untersuchen, deren vollständiges Ausschalten einen embryonal letalen Phänotyp verursachen würde (Prawitt *et al.*, 2004). Eine unterschiedlich stark ausgeprägte *Knock-down*-Effizienz ist jedoch auch unter Verwendung derselben siRNA-Sequenz kein seltenes Phänomen, so wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen individuelle Unterschiede bei transgenen *Knock-down*-Mäusen beschrieben (Carmell *et al.*, 2003; Hasuwa *et al.*, 2002; Kunath *et al.*, 2003; Tiscornia *et al.*, 2003). Als Ursache kommen mehrere Faktoren in Frage, die häufig mit der Herstellungsmethode der transgenen Mäuse zusammenhängen. Die in der vorliegenden Arbeit generierten pTER-Mauslinien wurden durch Pronukleusinjektion hergestellt, hierbei wurde die linearisierte Konstrukt-DNA „von Hand“ in die paternalen Vorkerne von befruchteten Eizellen injiziert. Es ist möglich, sogar relativ wahrscheinlich, dass die Vorkerne minimal unterschiedliche Mengen der Konstrukt-DNA erhielten, und dass sie unterschiedliche Mengen dieser DNA in ihr Genom integriert haben. Die in den pTER-Linien beobachtete unterschiedliche *Knock-down*-Effizienz korreliert jedoch nicht mit der Anzahl der in das Mausgenom integrierten Transgene (siehe Abbildung 3.35), denn während die pTER-Linie 3621, welche lediglich in der Leber eine Reduktion der *Trpm5*-Transkriptmenge aufwies, die meisten Transgene in ihr Genom integriert hatte, wurden in der Linie 3620, welche eine ebenso deutliche Transkriptreduktion in der Zunge zeigte, die wenigsten Kopien des Transgens nachgewiesen. Die pTER-Linie 3623, welche sowohl in der Leber als auch in der Zunge verringerte Transkriptmengen aufwies, besaß dagegen eine mittlere Menge der Transgen-DNA. Da das Transgen bei der Pronukleusinjektion ungerichtet in die Maus-DNA integriert wird, stellen sogenannte Positionseffekte eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedliche *Knock-down*-Effizienz der pTER-Linien dar. Zu den Positionseffekten gehören stimulierende *Enhancer*- und reprimierende *Silencer*-Elemente, welche die transkriptionelle Aktivität an einem chromosomalen Locus regulieren (Wilson *et*

*al.*, 1990). Die Integration des Transgens in einen transkriptionell aktiven Ort wird sicherlich eine stärkere siRNA-Expression und damit eine stärkere Herunterregulation des Zielgens als die Integration in stillere Genombereiche bewirken (Prawitt *et al.*, 2004). Dieser Faktor scheint die unterschiedliche *Knock-down*-Effizienz der pTER-Linien eher zu erklären als die Transgenmenge.

### 4.6.3 Phänotypische Charakterisierung der *Trpm5-knock down*-Mäuse

Parallel zu der initialen Charakterisierung der *Trpm5-knock down*-Mäuse wurde von Zhang und Mitarbeitern eine *Trpm5-knock out*-Maus veröffentlicht. Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte dem Trpm5-Kanal erstmals eine physiologische Funktion als eine Komponente der Geschmackstransduktion zugewiesen werden (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Auch andere Arbeitsgruppen waren vor allem aufgrund der Coexpression des *Trpm5*-Gens mit Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade, wie  $\alpha$ -Gustucin,  $G\gamma_{13}$ , PLC- $\beta_2$  und *IP<sub>3</sub>R3* auf den Trpm5-Kanal aufmerksam geworden und sagten ihm eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in Geschmackssinneszellen voraus (Pérez *et al.*, 2002). Geschmackstests mit *Trpm5-knock out*-Mäusen zeigten, dass speziell die Geschmacksrichtungen süß, bitter und *umami* durch Trpm5 vermittelt werden; abgesehen von der beeinträchtigten Geschmackswahrnehmung schienen die *Trpm5-knock out*-Maus phänotypisch unauffällig zu sein (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der Geschmackswahrnehmung sowie die Beteiligung des Trpm5-Kanals an diesem Vorgang näher erläutert.

#### 4.6.3.1 Funktion von TRPM5 bei der Geschmacksperezeption

Durch den Geschmackssinn wahrgenommene chemische Sinnesreize sind für die Prüfung der aufgenommenen Nahrung essentiell, weil sie Informationen über die Qualität und Bekömmlichkeit sowie den Nährstoffgehalt der aufgenommenen Nahrung liefern. Für die Geschmackswahrnehmung sind die Geschmacksknospen verantwortlich, die aus bis zu 100 Geschmackssinneszellen bestehen und auf der Zunge und im übrigen Mundraum verteilt vorkommen (Lindemann, 2001). Säugetiere können nach dem heutigen Wissensstand fünf verschiedene Geschmacksrichtungen unterscheiden: Süß, bitter, salzig, sauer und *umami*, die über distinkte Geschmackssinneszellen vermittelt werden (Chandrashekar *et al.*, 2006). *Umami* (japanisch für wohlschmeckend) umfasst beim Menschen den Geschmack von Glutamat und Aspartat, bei anderen Säugetieren auch den Geschmack weiterer Aminosäuren. Der Geschmack ist vor allem beim Menschen ein sehr komplexer und schwer zu

untersuchender Sinneseindruck, da er nicht nur aus gustatorischen Reizen entsteht, sondern auch durch Eindrücke des Geruchs- und Tastsinns sowie visuelle Reize beeinflusst wird.

Für die Aufnahme von süß-, bitter- und *umami*-Reizen sind spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, *G protein-coupled receptors*) verantwortlich. Diese bestehen meist aus Proteinen der T1R- und T2R-Familie (TR für *taste receptor*), welche an das heterotrimere G-Protein Gustducin gekoppelt sind (Chandrashekar *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Die Aufnahme eines Geschmacksstoffes durch seinen Rezeptor führt zum Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP (Guanosindiphosphat)-Moleküls durch GTP (Guanosintriphosphat) und zur Spaltung des Gustducins in  $G\alpha$  und ein  $G\beta\gamma$ -Dimer. Letzteres aktiviert PLC- $\beta_2$ , welches  $PIP_2$  zu DAG und  $IP_3$  umsetzt, und  $IP_3$  führt zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern.  $G\alpha$  stimuliert wiederum je nach Geschmacksstoff entweder eine Phosphodiesterase, wodurch die Konzentration zyklischer Nukleotide im Zytosol abnimmt oder eine Adenylylzyklase, welche die Konzentration der zyklischen Nukleotide erhöht (Lindemann, 2001; Margolskee, 2002). In beiden Fällen beeinflusst die veränderte *Second messenger*-Konzentration die Aktivität der in der Geschmackssinneszelle vorhandenen Ionenkanäle. Die erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die durch süß-, bitter-, und *umami*-Reize entsteht, führt zur Aktivierung von membranständigen TRPM5-Kanälen, die einen raschen, transienten Kationeneinstrom bewirken und zur Depolarisation der Zellmembran führen. Das Signal wird schließlich über chemische Synapsen oder andere Wege an die Geschmacksnerven weitergeleitet (Clapp *et al.*, 2006). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Trpm5-Kanal nicht nur bei der Geschmackswahrnehmung, sondern auch bei dem Geruchssinn, und zwar bei der Aufnahme von Botenstoffen wie Pheromonen eine Rolle spielt (Lin *et al.*, 2007).

Neben TRPM5 spielen auch andere TRPs bei der Geschmackspertzeption eine Rolle. So ist zum Beispiel TRPV1 an der Übertragung von salzigen Signalen beteiligt, während PKD1L3 und PKD2L1 der TRPP-Subfamilie für die Wahrnehmung von sauren Geschmacksstoffen verantwortlich sind (Ishimaru *et al.*, 2006; Lyall *et al.*, 2004). Die Temperaturabhängigkeit des TRPM5-Kanals – zwischen 15 und 35°C nimmt die Aktivität des Kanals mit steigender Temperatur zu – wirkt sich insofern auf die Geschmackswahrnehmung aus, als dass mit Temperatur auch die Geschmacksintensität steigt, wie für die Geschmacksrichtung süß gezeigt werden konnte (Talavera *et al.*, 2005).

#### 4.6.3.2 Geschmackstests mit *Trpm5-knock down*- und *Trpm5-knock out*-Mäusen

Die Erkenntnis, dass *Trpm5* an der Geschmackswahrnehmung beteiligt ist, führte zu einer relativ einfachen Möglichkeit, die pTER-Mauslinien phänotypisch zu charakterisieren. Zuvor konnten bei den *Trpm5-knock down*-Mäusen keine phänotypischen Auffälligkeiten beobachtet werden; sowohl das äußere Erscheinungsbild bezüglich der Größe und des Gewichts der Tiere als auch die Morphologie der inneren Organe waren mit den Eigenschaften der Wildtypmäuse vergleichbar. Auch im Verhalten zeigten die Tiere keine Besonderheiten. Da die von Zhang und Mitarbeitern generierte *Trpm5-knock out*-Maus eine ideale Positivkontrolle für den geschmacksdefizienten Phänotyp darstellte und auch für weitere Fragestellungen, insbesondere in Bezug auf die *Trpm5*-Funktion in anderen Organen interessant war, wurde sie von ihren Herstellern (Prof. Zuker, University of California, USA) bezogen.

Um die Geschmackswahrnehmung der pTER-Mäuse zu untersuchen, wurde der sogenannte *Two-bottle test* durchgeführt. Dieser zeigt anhand des Trinkverhaltens an zwei angebotenen Flaschen, welche Geschmacksstoffe von den Mäusen bevorzugt, und welche gemieden werden. Neben den *Founder*-Tieren der pTER-Linien 3620, 3621 und 3623 wurde Maus 3619 in den Test mit einbezogen, obwohl diese nicht eindeutig als transgen identifiziert werden konnte. Die *Founder*-Maus der pTER-Linie 3608 wurde dagegen nicht untersucht, weil diese zum Zeitpunkt der Geschmackstests schwanger war und die Mauslinie ohnehin keinen *Knock down*-Effekt in RT-PCR-Analysen zeigte. Bei keiner der pTER-Mäuse konnte ein auffälliges Trinkverhalten beobachtet werden (siehe Abbildung 3.37). Alle Mäuse bevorzugten süß und *umami* ( $96 \pm 2$  % bzw.  $75 \pm 13$  % der getrunkenen Gesamtmenge; Wildtypmäuse:  $97 \pm 1$  % bzw.  $86 \pm 8$  %) und zeigten eine deutliche Abneigung gegen den Bitterstoff ( $8 \pm 2$  % der getrunkenen Gesamtmenge; Wildtypmäuse:  $7 \pm 1$  %). Die homozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse konnten die Geschmacksstoffe jedoch nicht von reinem Wasser unterscheiden (süß:  $50 \pm 5$  %, bitter:  $42 \pm 7$  % der getrunkenen Gesamtmenge; siehe Abbildung 3.36).

Die Ergebnisse sind insbesondere auf die pTER-Linien 3620 und 3623 bezogen überraschend, da diese beiden Linien in RT-PCR-Analysen eine deutliche Herunterregulation von *Trpm5* in dem für den Geschmackssinn relevanten Zungengewebe zeigten (vgl. Abbildung 3.34). Es stellt sich die Frage, ob die *Trpm5*-Herunterregulation in den pTER-Mäusen nicht ausreicht, um den vollständigen *Trpm5-knock out*-Phänotyp zu reproduzieren. Da Zhang und Mitarbeiter in ihrer Publikation lediglich von homozygoten, aber nicht von heterozygoten *Knock out*-Mäusen berichten, welche – da *Trpm5* in der Maus biallelisch exprimiert wird (Enklaar *et al.*, 2000) – die Hälfte der wildtypischen *Trpm5*-Menge besitzen, kann über die

Geschmackswahrnehmung *Trpm5*-reduzierter Mäuse lediglich spekuliert werden. Es ist durchaus möglich, dass eine geringe Menge des *Trpm5*-Proteins in der Zunge für eine normale oder nur wenig beeinträchtigte Geschmackswahrnehmung ausreicht. Da es sich bei den *Knock down*-Mäusen um eine Reduktion und nicht um einen vollständigen Verlust des *Trpm5*-Proteins handelt, könnte in den Mäusen genügend *Trpm5*-Protein für eine intakte Geschmackstransduktion vorhanden sein.

2006 wurde eine zweite *Trpm5-knock out*-Maus publiziert (Damak *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu der zuvor veröffentlichten *Knock out*-Maus (im Folgenden „Zhang-Maus“ genannt) konnte in jener („Damak-Maus“) jedoch kein vollständiger Verlust der süß-, bitter- und *umami*-Wahrnehmung beobachtet werden. Dies führte zu der Annahme, dass neben *Trpm5*-abhängigen Signaltransduktionskaskaden auch *Trpm5*-unabhängige Signalwege in der süß-, bitter- und *umami*-Wahrnehmung existieren (Damak *et al.*, 2006; Rong *et al.*, 2005). Außerdem war bei der Damak-Maus auch das Schmecken salziger Substanzen beeinträchtigt. Der geringfügig unterschiedliche Phänotyp der von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellten *Trpm5-knock out*-Mäuse wurde durch die unterschiedliche *Knock out*-Strategie und durch stammesspezifische Unterschiede erklärt (Damak *et al.*, 2006): Während Damak und Mitarbeiter mittels homologer Rekombination die komplette Promotorregion des *Trpm5*-Gens samt der Exons 1-4 durch das *Knock-out*-Konstrukt ersetzen, wurden in der Zhang-Maus lediglich die Exons 15-19 durch das *Knock-out*-Konstrukt ausgetauscht. Demzufolge ist in der Zhang-Maus die Transkriptionsstartstelle noch vorhanden, so dass höchstwahrscheinlich ein Protein gebildet wird, welches zumindest aus N-terminalen Proteinbereichen des *Trpm5*-Proteins besteht. Nimmt man an, dass dieses verkürzte Protein andere in Geschmackssinneszellen vorhandene Proteine, die normalerweise mit *Trpm5* interagieren, bindet, und ihre normale Funktion verhindert, würde der *Knock-out*-Maus nicht nur der *Trpm5*-Kanal fehlen, sondern auch andere, mit *Trpm5* interagierende Proteine wären in ihrer Funktion beeinträchtigt. Dies würde den vollständig süß-, bitter- und *umami*-geschmacksdefizienten Phänotyp der Zhang-Maus einerseits und die lediglich wenig beeinträchtigte Geschmackswahrnehmung der Damak-Maus andererseits erklären. Die zweite, eher unwahrscheinliche Erklärung bezieht sich auf die stammesspezifischen Differenzen der Mäuse: Während die Damak-Maus einen reinen C57BL/6-Hintergrund besitzt, wurde der genetische Hintergrund der für die Zhang-Maus verwendeten ES-Zellen nicht explizit spezifiziert. Es könnte sich hier also um eine Mischung eines unbekanntes Stammes und C57BL/6 handeln (Damak *et al.*, 2006).



Erfreulicherweise haben Damak und Mitarbeiter auch heterozygote *Trpm5-knock out*-Mäuse phänotypisch charakterisiert. Diese zeigten in allen durchgeführten Geschmackstests einen Wildtyp-identischen Phänotyp, was die Vermutung bekräftigt, dass eine Reduktion des Trpm5-Proteins im Zungengewebe – wie sie auch bei den pTER-Mauslinien 3620 und 3623 zu erwarten ist, da hier eine Transkriptreduktion nachgewiesen wurde – sich nicht notwendigerweise auf die Geschmackswahrnehmung auswirkt. Höchstwahrscheinlich reicht die reduzierte Trpm5-Menge auch in anderen Organen der pTER-Mäuse für eine intakte Signalweiterleitung aus. Aus diesem Grunde wurden die Versuche mit *Trpm5-knock down*-Mäusen an dieser Stelle eingestellt. Die pTER-Linien 3620, 3621 und 3623 wurden kryokonserviert.

#### **4.7 Funktion von TRPM5 in pankreatischen Betazellen**

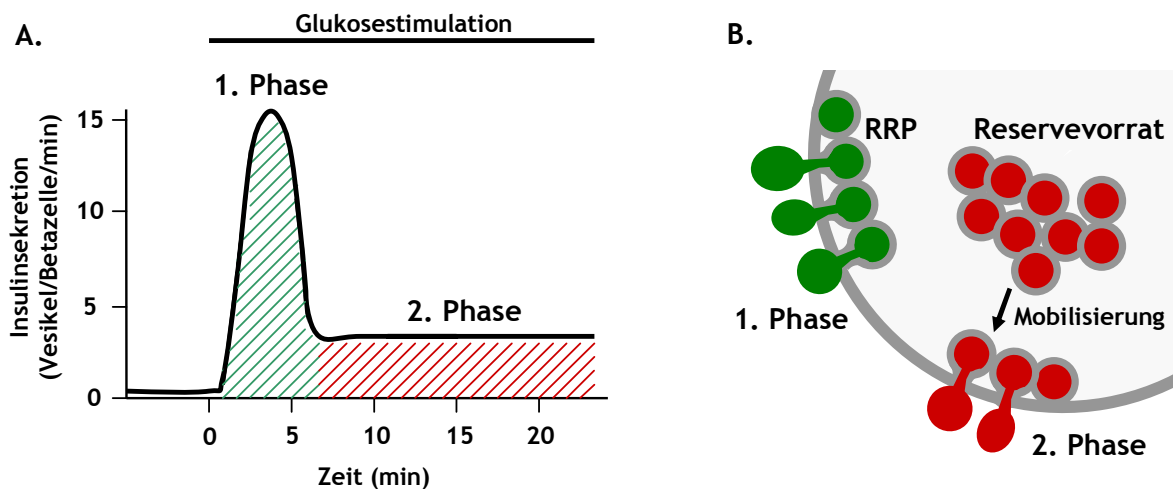
Welche Aufgaben hat der TRPM5-Kanal in anderen Zellen und Geweben? Die Tatsache, dass sich die Expression von *TRPM5* nicht ausschließlich auf Geschmackssinneszellen beschränkt, deutete auf eine allgemeinere Funktion des TRPM5-Kanals in der zellulären Signaltransduktion hin. Auf die Idee, TRPM5 speziell in pankreatischen Betazellen zu untersuchen, brachte uns zum einen die eigene Beobachtung, dass *TRPM5* im Pankreas, dort speziell in den Langerhans'schen Inseln (siehe Abbildung 3.38), sowie in allen untersuchten Betazelllinien (siehe Kapitel 4.1) exprimiert wird, und zum anderen die Identifizierung des *Trpm5*-Gens der Ratte als potenziellen Kandidaten für die Kontrolle der Insulinsekretion (Irminger *et al.*, 2002; siehe hierzu auch Kapitel 3.9).

##### **4.7.1 Insulinsekretion in TRPM5-short-exprimierenden INS-1-Zellen**

Um die Funktion des TRPM5-Kanals zunächst auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Insulinsekretionsanalysen mit pankreatischen Betazellkulturen durchgeführt. Dazu wurde die INS-1-Zelllinie der Ratte gewählt, weil sich diese sowohl für Insulinsekretionsversuche als auch für elektrophysiologische Experimente gut eignet. Durch die Stimulation mit hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen konnten in INS-1-Zellen Ströme erzeugt werden, die aufgrund ihres Strom-Spannungsverhältnisses und ihrer Dosis-Wirkungskurve eindeutig Trpm5 zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 3.39). Um die Funktion des Trpm5-Kanals in INS-1-Zellen zu untersuchen, wurde mit Hilfe der kurzen Spleißvariante des Proteins versucht, die Kanalaktivität zu blockieren (vgl. Kapitel 4.4). Da in Ratten- oder murinen Zellen bisher keine solchen kurzen inhibitorischen Spleißvarianten beschrieben wurden, die Homologie zwischen dem humanen TRPM5 und dem Rattenprotein jedoch relativ hoch ist (83,1 %), wurde hierzu das humane TRPM5-short verwendet.

Die Insulinsekretion wurde drei Tage nach Transfektion der Zellen mit pcDNA3-TRPM5-short untersucht. Sowohl in TRPM5-short-exprimierenden Zellen als auch in Kontrollzellen konnte durch Inkubation der Zellen in 15 mM Glukose sowie Zugabe von 30 mM Kalium eine kräftige Insulinausschüttung induziert werden. Die Menge des sezernierten Insulins wurde jedoch nicht durch die Anwesenheit des TRPM5-short-Proteins beeinflusst (siehe Abbildung 3.40). Dies kann an der Tatsache liegen, dass es sich bei TRPM5-short um ein für die Rattenzellen artfremdes Protein handelt, welches möglicherweise nicht in der Lage ist, den Trpm5-Kanal der Ratte zu blockieren. Zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte elektrophysiologische Analysen einer TRPM5-short-überexprimierenden INS-1-Zelllinie unterstützen diese Vermutung, da in diesen Zellen Trpm5-spezifische Ströme nachgewiesen wurden (Prof. A. Fleig, persönliche Mitteilung). Aber auch andere Ursachen kommen infrage: Zum einen ist nicht auszuschließen, dass die Transfektionseffizienz, die zwar mindestens 75 % betrug, zu niedrig war, um genügend Trpm5-Kanäle zu blockieren. Zum anderen kann die gewählte Versuchszeit zu lang gewesen sein, um einen Unterschied beobachten zu können – mit den gewählten Versuchsbedingungen konnten lediglich die sezernierten Insulinmengen nach zwei Stunden verglichen werden; Veränderungen in der Sekretionskinetik konnten jedoch nicht untersucht werden. Speziell durch die Stimulation mit hoch konzentrierter Glukose wird in den Zellen nämlich eine zweiphasige Insulinsekretion angeregt, die in den ersten Minuten nach dem Stimulationsbeginn beobachtet werden kann: Die erste Phase setzt rasch nach dem Stimulus ein und ist durch eine schnelle und starke Sekretion charakterisiert; hierbei werden ein bis fünf Prozent der in der Betazelle vorhandenen Insulinvesikel ausgeschüttet. Die zweite Phase setzt zeitverzögert ein, hält jedoch länger an (Abbildung 4.2 A). Hier werden – vorausgesetzt, die Glukosekonzentration ist hoch genug und der Stimulus ausreichend lang – die restlichen Vesikel entleert (Nesher *et al.*, 2002). Die zwei Phasen kommen dadurch zustande, dass die Insulinvesikel in der Betazelle mindestens zwei verschiedene Zustände annehmen können: Die Vesikel der ersten Phase gehören zu einer für die Freisetzung bereiten Population (RRP, *readily releasable pool*); sie lagern dicht an der Zellmembran und können rasch entleert werden. Die Vesikel der zweiten Phase bilden einen Reservevorrat und müssen zunächst unter Energieaufwand zur Membran transportiert und für die Sekretion vorbereitet werden (Abbildung 4.2 B). Diese zwei Phasen der Insulinsekretion können bei einer Kaliumstimulation nicht beobachtet werden, und unter physiologischen Bedingungen ist die Glukosekonzentration zu niedrig, um zwei getrennte Phasen zu induzieren (Caumo und Luzi, 2004; Nesher *et al.*, 2002; Rorsman und Renström, 2003). Beeinflusst die Inhibition des Trpm5-Kanals nun lediglich die Kinetik der Insulinsekretion, ist

es fraglich, ob sich dieser Effekt auch auf die Gesamtmenge des sezernierten Insulins auswirkt.



**Abbildung 4.2: Die zwei Phasen der glukoseinduzierten Insulinsekretion.**

**A.** Durch die Stimulation mit Glukose wird in den Betazellen zunächst die erste, schnelle Phase der Insulinsekretion ausgelöst, die 3-5 Minuten nach Stimulationsbeginn ihren Höhepunkt erreicht. 5-10 Minuten nach Stimulationsbeginn setzt eine langsamere, zweite Phase der Sekretion ein, deren Ausmaß von der Dauer und Stärke des Stimulus abhängig ist. **B.** Während die Insulinvesikel der ersten Sekretionsphase (RRP, *readily releasable pool*) dicht an der Zellmembran liegen und so eine schnelle Insulinausschüttung ermöglichen, stellen die Vesikel der zweiten Phase einen Reservevorrat dar. Die Reservevesikel müssen vor der Ausschüttung mobilisiert werden. Verändert nach Rorsman und Renström, 2003.

#### 4.7.2 Blutglukose- und Insulinhaushalt der *Trpm5-knock out*-Maus

Um die bei INS-1-Zellen aufgetretenen Fragen bezüglich der Blockierbarkeit des Trpm5-Kanals der Ratte durch das humane TRPM5-short zu umgehen, wurden die weiteren Versuche mit der *Trpm5-knock out*-Maus durchgeführt. Die aus der *Knock out*-Maus isolierten Langerhans'schen Inseln stellen ein geeignetes Trpm5-defizientes System dar, um die Insulinsekretionskinetik genauer zu analysieren. Während die Wildtypinseln auf eine Stimulation mit hoch konzentrierter (16,8 mM) Glukose mit einer sofortigen erhöhten Insulinausschüttung reagierten, war die Menge des sezernierten Insulins in *Trpm5-knock out*-Inseln, die 1, 2, 5, 10 und 30 Minuten nach Stimulationsbeginn gemessen wurde, zu keinem Zeitpunkt höher als im uninduzierten Zustand, also in 2,8 mM Glukose (siehe Abbildung 3.43). Aufgrund der bei der Inselisolation aufgetretenen Schwierigkeiten, die vor allem auf den Collagenaseverdau zurückzuführen waren (siehe hierzu Kapitel 3.9.3.1), konnten nur fünf Mäuse pro Genotyp untersucht werden, so dass dieses Ergebnis lediglich als Hinweis auf eine gestörte Insulinsekretionskinetik in der *Trpm5-knock out*-Maus bewertet werden kann und in weiteren Versuchen verifiziert werden muss. Immortalisierte *Trpm5-knock out*-Betazelllinien,

welche eine weitere Möglichkeit für Insulinsekretionstests darstellen, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich hergestellt werden.

Abschließend wurde die Funktion von Trpm5 bei der Insulinsekretion in der Maus als Gesamtorganismus untersucht. Mit Hilfe eines Glukosetoleranztests wurden die kurzzeitigen Effekte einer intraperitonealen Glukosegabe auf den Blutglukosespiegel beobachtet; die auf diese Weise induzierte rasche Erhöhung des Blutzuckers verursacht in einem gesunden Organismus eine Insulinausschüttung, die zur Glukoseaufnahme und -verwertung in verschiedenen Organen führt und die Speicherung der Glukose als Glykogen in Leber, Muskeln und anderen Geweben fördert. Der Glukosetoleranztest wurde mit sechs bis zehn Wochen alten homozygoten (*Trpm5*  $-/-$ ) und heterozygoten (*Trpm5*  $+/-$ ) *Trpm5-knock out*-Mäusen sowie gleichaltrigen und -geschlechtlichen Wildtypmäusen (*Trpm5*  $+/+$ ) durchgeführt. Während die heterozygoten *Knock out*-Mäuse keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den Wildtypmäusen zeigten, waren bei den homozygoten *Knock out*-Mäusen diejenigen Blutglukosewerte, die 20 und 60 Minuten nach Glukoseinjektion gemessen wurden, deutlich erhöht (siehe Abbildung 3.45). Zum späteren Zeitpunkt (120 Minuten nach Glukoseinjektion) waren sie jedoch wieder mit den Blutglukosewerten der Kontrollmäuse vergleichbar. Da auch vor der Glukosegabe die Nüchternblutglukosewerte der *Trpm5-knock out*-Mäuse nicht auffällig waren, ist der Blutzuckerspiegel bei den homozygoten *Knock out*-Mäusen nicht dauerhaft erhöht. Die beobachtete transiente Erhöhung deutet auf eine gestörte Glukosetoleranz (IGT, *impaired glucose tolerance*) hin, die sich jedoch nicht auf den Langzeitblutzuckerwert auswirkt, wie die Bestimmung der Fructosaminwerte ergab (homozygote *Trpm5-knock out*-Mäuse:  $289 \pm 28 \mu\text{M/l}$ ; Wildtypmäuse:  $294 \pm 29 \mu\text{M/l}$ ; siehe Tabelle 3.2). Dass die Glukosetoleranz der homozygoten und heterozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse so unterschiedlich ausfällt und die heterozygoten Mäuse eher den Wildtypmäusen ähneln, bekräftigt die in Kapitel 4.6.3.2 aufgeführte Vermutung, dass eine reduzierte Menge des Trpm5-Proteins für dessen normale Funktion ausreicht. In einem Alter von 44 Wochen wurden drei der zehn zuvor getesteten homozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse und drei Wildtypmäuse erneut auf ihre Glukosetoleranz untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Tiere eine zunehmende Glukoseintoleranz, die durch eine sehr langsame Regulation des Blutzuckerspiegels gekennzeichnet war (siehe Abbildung 3.46). Zwischen den *Knock out*- und Kontrollmäusen waren keine Unterschiede mehr zu erkennen. Die hier beobachtete Glukoseintoleranz, die höchstwahrscheinlich altersbedingt ist, wurde vermutlich durch die standardmäßige Fütterung der Mäuse mit dem an Kohlenhydraten und anderen Nährstoffen reichen Trockenfutter begünstigt.

Mit Hilfe eines Insulintoleranztests konnte gezeigt werden, dass die bei jungen homozygoten *Trpm5-knock out*-Mäusen beobachtete gestörte Glukosetoleranz nicht durch eine beeinträchtigte Reaktion auf Insulin, beispielsweise in Form einer Insulinresistenz hervorgerufen wird, da die *Trpm5-knock out*-Mäuse auf die Insulinverabreichung mit einer normalen Verringerung des Blutzuckers reagierten (siehe Abbildung 3.47). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung in den isolierten *Trpm5-knock out*-Inseln: Eine verzögerte oder beeinträchtigte Insulinausschüttung würde zu einer entsprechend verlangsamten Glukoseaufnahme aus dem Blut führen.

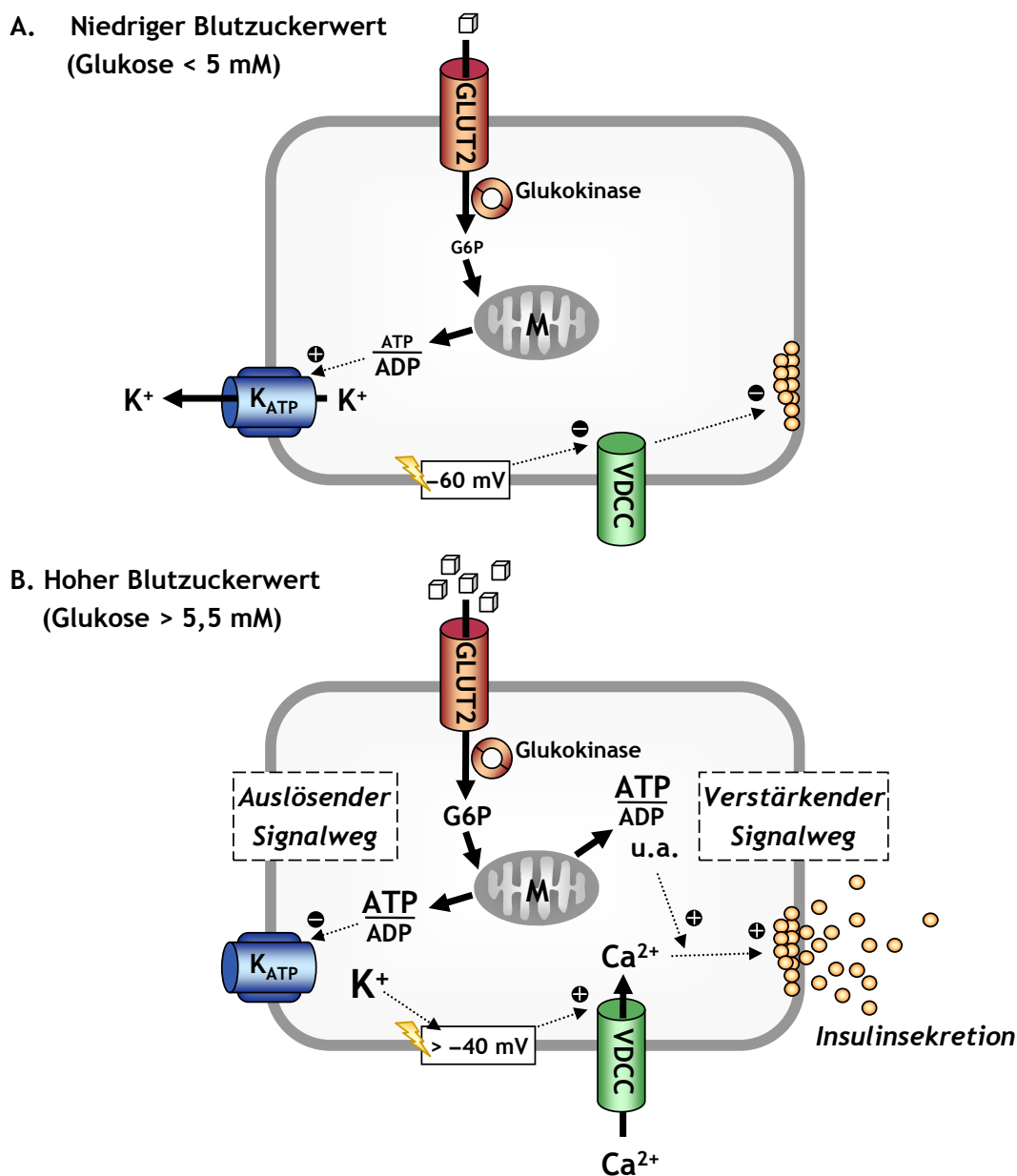
### 4.7.3 Regulation der glukoseinduzierten Insulinsekretion

Zur Verdeutlichung und zum besseren Verständnis der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der TRPM5-Funktion und deren Einordnung in den aktuellen Wissensstand werden im Folgenden die grundlegenden molekularen Vorgänge bei der Regulation der glukoseinduzierten Insulinsekretion näher erläutert (Abbildung 4.3).

In der pankreatischen Betazelle wird Glukose über die GLUT2-Transporter (Glukosetransporter 2) aufgenommen. Diese kommen in der Betazellmembran in hoher Konzentration vor, besitzen jedoch eine relativ niedrige Affinität für Glukose. Die über GLUT2 eingeschleuste Glukose wird mit Hilfe einer Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses Enzym weist im Gegensatz zum Glukosetransporter eine hohe Affinität für Glukose auf – so wird sichergestellt, dass der Glukosetransport nicht den limitierenden Faktor für den Glukosemetabolismus darstellt, sondern die Rate der Glukosephosphorylierung der Blutglukosekonzentration entspricht (Matschinsky, 1996). Glukose-6-Phosphat wird in die Mitochondrien transportiert und im weiteren Verlauf von Glykolyse, Zitratzyklus und Atmungskette unter Bildung von Reduktionsäquivalenten und ATP metabolisiert.

In der Membran der Betazelle befindet sich ein ATP-sensitiver Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ), der im Ruhezustand offen ist. Durch ihn strömen stetig  $K^+$ -Ionen aus der Zelle hinaus, dadurch ist das Membranpotential zu negativen Werten ( $-60$  mV) verschoben. Da die ATP-Produktion mit der Glukosekonzentration im Blut korreliert, führt eine niedrige Blutglukosekonzentration zu einem niedrigen ATP/ADP-Verhältnis, so dass der  $K_{ATP}$ -Kanal offen bleibt. Bei erhöhter Blutglukosekonzentration steigt das ATP/ADP-Verhältnis an, wodurch der  $K_{ATP}$ -Kanal geschlossen wird. Die  $K^+$ -Ionen verbleiben nun in der Zelle und führen zur Depolarisation der Zellmembran, wodurch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC, *voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>*

*channels*) geöffnet werden.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen strömen in die Zelle und leiten die Exozytose von Insulin ein.



**Abbildung 4.3: Kontrolle der glukoseinduzierten Insulinsekretion in der pankreatischen Betazelle.**

**A.** In der Betazelle wird die über den Glukosetransporter GLUT2 eingeschleuste Glukose von der Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert, welches in den Mitochondrien (M) für die aerobe Glykolyse benötigt wird. Bei niedrigen Blutglukosekonzentrationen wird wenig ATP gebildet, was zu einem niedrigen ATP/ADP-Verhältnis führt. Der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal bleibt in diesem Fall offen und leitet  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle hinaus, wodurch das Membranpotential negativ bleibt ( $-60 \text{ mV}$ ). **B.** Bei erhöhter Blutglukosekonzentration wird mehr Glukose in die Zelle transportiert, wodurch mehr ATP gebildet wird. Das hohe ATP/ADP-Verhältnis blockiert den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal und die  $\text{K}^+$ -Ionen verbleiben in der Zelle. Dadurch steigt das Membranpotential an, bis die Depolarisation der Zellmembran spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VDCC, *voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels*) öffnet. Die eingeströmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen leiten letztlich die Exozytose von Insulin ein. Wie in B angedeutet, werden durch den Glukosestimulus zwei Signalwege (auslösender und verstärkender Signalweg) eingeleitet, die im Text ausführlicher beschrieben werden. Neben  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kommen in der Betazelle weitere Kaliumkanäle vor, die in der Abbildung nicht dargestellt sind. Verändert nach <http://www.medbio.info> (auslösender Signalweg) sowie Henquin, 2000 (verstärkender Signalweg).

Neben  $K_{ATP}$  kommen in der Betazelle weitere Kaliumkanäle vor, die unter anderem über die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder über die Membranspannung reguliert werden. Durch das Wechselspiel der Ionenkanalaktivitäten oszilliert das Membranpotential, wodurch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle abwechselnd geöffnet und geschlossen werden. Dadurch kommt es zu intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und Insulin wird – ähnlich wie andere Hormone – in pulsativer Weise ausgeschüttet (Gilon *et al.*, 2002). Insgesamt gesehen ist die Insulinsekretion ein kontinuierlicher Prozess, denn es findet eine ständige, basale Insulinsekretion unabhängig von der Nahrungsaufnahme statt.

An der Kontrolle der glukoseinduzierten Insulinsekretion sind im Wesentlichen zwei Signalwege der pankreatischen Betazelle beteiligt, die als auslösender Signalweg (engl. *triggering pathway*) und verstärkender Signalweg (engl. *amplifying pathway*) bezeichnet werden (Henquin, 2000). Während der auslösende Signalweg mit der oben beschriebenen Schließung des  $K_{ATP}$ -Kanals beginnt und über die Aktivierung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen, vor allem des L-Typs (*L-type  $Ca^{2+}$  channels*) zur Exozytose der Insulinvesikel führt, wird durch die Glukosemetabolisierung noch ein weiterer,  $K_{ATP}$ -unabhängiger Weg gestartet, der über mehrere Schritte, die Proteinkinase A, Proteinkinase C oder GEF (*guanine nucleotide exchange factor*)-abhängige Mechanismen umfassen, zur Insulinfreisetzung führt (Henquin, 2004). Dieser Weg erhöht zwar nicht die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration, er ist aber in der Lage, die exozytotische Wirkung der bereits erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu steigern. Die Mediatoren dieses verstärkenden Signalwegs wurden bisher nicht eindeutig definiert, als wahrscheinliches Signal wird auch in diesem Falle der Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses angesehen (Henquin *et al.*, 2003). Neben Glukose wird der verstärkende Signalweg durch Hormone und Neurotransmitter wie GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) und Acetylcholin gesteuert.

#### 4.7.4 TRP-Kanäle in der Insulinsekretion

TRPM5 ist nicht der einzige Vertreter der TRP-Familie, der in pankreatischen Betazellen exprimiert wird. Bisher konnte bereits für mehrere TRPs, vor allem Mitglieder der TRPC-Subfamilie, die für nicht-selektive Kationenkanäle kodieren, eine Expression in Betazellen nachgewiesen werden (Qian *et al.*, 2002). Kürzlich wurde sogar für zwei nahe Verwandte des TRPM5-Kanals, TRPM2 und TRPM4, eine Involvierung in der Insulinsekretion gezeigt (Cheng *et al.*, 2007; Togashi *et al.*, 2006). TRPM2, welches einen zellulären Sensor für oxidativen und nitrosativen Stress darstellt, wird neben Substanzen, die bei Stressbedingungen gebildet werden, durch ADP-Ribose und verwandte Verbindungen wie

cADPR (zyklische ADP-Ribose) und NAD<sup>+</sup> (Nikotinamid-Adenindinukleotid) aktiviert (Hara *et al.*, 2002; Kolisek *et al.*, 2005; Perraud *et al.*, 2001; Perraud *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 2001; Wehage *et al.*, 2002). Während ADP-Ribose beispielsweise bei Reparaturvorgängen entsteht, die nach DNA-Schädigung eingeleitet werden, wird cADPR unter anderem im Zuge des Glukosemetabolismus gebildet. Ähnlich wie IP<sub>3</sub> funktioniert auch cADPR als zellulärer *Second messenger*, der zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt (Takasawa *et al.*, 1998). TRPM2 ist als nicht-selektiver Kationenkanal selbst in der Lage, Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu leiten, er kann aber auch – über einen Kationeneinstrom – eine Membrandepolarisation hervorrufen, die dann weitere, spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktiviert. Schon seit längerer Zeit wurde vermutet, dass TRPM2 in der Betazelle außer dem stressinduzierten Zelltod auch andere Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalkaskaden, beispielsweise die Insulinsekretion, steuert (Inamura *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2002). Der Beweis dafür wurde 2006 erbracht, als mit Hilfe TRPM2-spezifischer siRNA gezeigt werden konnte, dass TRPM2 in der K<sub>ATP</sub>-unabhängigen, cAMP-vermittelten Signalkaskade der Insulinsekretion involviert ist (Togashi *et al.*, 2006). Wenig später wurde auch für TRPM4 eine Funktion in der Insulinsekretion nachgewiesen (Cheng *et al.*, 2007). Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.1.4.7) erwähnt, reguliert TRPM4 in T-Zellen die Membranpotentialoszillation, welche wiederum die Oszillation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kontrolliert (Launay *et al.*, 2004). In pankreatischen Betazellen der INS-1-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des TRPM4-Kanals durch eine dominant negative TRPM4-Mutante zum einen die pulsatile Form der Insulinfreisetzung beeinträchtigt und zum anderen die Menge des sezernierten Insulins verringert (Cheng *et al.*, 2007). Interessanterweise konnte bei *Trpm4-knock out*-Mäusen jedoch weder eine veränderte Insulinsekretion – diese wurde allerdings erst eine Stunde nach Stimulationsbeginn bestimmt – noch eine beeinträchtigte Glukosetoleranz beobachtet werden (Vennekens *et al.*, 2007).

#### 4.7.4.1 Modell für die Funktion des TRPM5-Kanals in der pankreatischen Betazelle

In dem auslösenden Signalweg der Insulinsekretion startet die Aufnahme und Verwertung der Glukose eine Signalkaskade, die zur Schließung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle und zur Depolarisation der Zellmembran führt. Die Schließung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle reicht jedoch nicht allein für den depolarisierenden Effekt aus, der für die Insulinsekretion benötigt wird (Cheng *et al.*, 2007). Höchstwahrscheinlich werden im Zuge der Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kationenkanäle aktiviert, welche zur weiteren Depolarisation der Zellmembran beitragen. Neben TRPM4 stellt auch TRPM5 einen möglichen Kandidaten für die initiale Depolarisation dar (Cheng *et al.*, 2007). Aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften von TRPM4



und TRPM5 lässt sich das folgende Modell für die Funktion dieser Kanäle bei der Insulinsekretion aufstellen: Anders als der TRPM2-Kanal, welcher durch cADPR und ähnliche Moleküle aktiviert wird, werden TRPM4 und TRPM5 durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert, wobei TRPM5, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, eher die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung wahrnimmt, während TRPM4 auf die absolute  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reagiert. Auf die Glukosemetabolisierung folgt eine Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt dadurch schnell an. Dieser schnelle  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert TRPM5; die TRPM5-Aktivität ist rasch und transient, und verursacht eine schnelle Depolarisation der Membran. Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt weiter an. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reicht nun aus, um TRPM4 zu aktivieren; die TRPM4-Aktivität führt zur weiteren Depolarisation der Membran. Daraufhin werden weitere spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet; es erfolgt ein massiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der letztendlich zur Freisetzung von Insulin führt. Auf die Depolarisation folgt eine Phase der Hyperpolarisation, die durch starke Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle, durch Aktivierung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals oder durch Inaktivierung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zustande kommen kann (Cheng *et al.*, 2007). In jedem Fall nehmen sowohl die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch die Insulinsekretion wieder ab, bis eine erneute Depolarisation stattfindet und der Zyklus von vorn beginnt.

#### 4.7.4.2 Mögliche Folgen einer TRPM5-Fehlregulation in der pankreatischen Betazelle

Da jede ausreichend starke Depolarisation der Zellmembran einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bedeutet, beeinflussen Membranpotentialveränderungen während einer Glukosestimulation wesentlich die Form und Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation. Weil die pankreatischen Betazellen untereinander über *Gap Junctions* kommunizieren, verläuft die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation in allen Betazellen innerhalb einer Langerhans'schen Insel synchron (Gilon und Henquin, 1991; Santos *et al.*, 1992). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation, die in Langerhans'schen Inseln beobachtet wird, setzt sich aus drei Einzelkomponenten zusammen: einer regelmäßigen und schnellen Oszillation, mit einer Frequenz von zwei- bis dreimal pro Minute, einer regelmäßigen und langsamen Oszillation (ca. 0,2-mal pro Minute) sowie einer gemischten Oszillation, die sehr rasch verläuft und die langsamen Oszillationen überlagert (Gilon *et al.*, 2002). Da die Exozytose der Insulinvesikel direkt über intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kontrolliert wird, hat eine Fehlsteuerung einer dieser Komponenten eine abnorme Insulinsekretion zur Folge. So konnte beispielsweise die reduzierte Insulinsekretion, die nach

Blockierung des TRPM4-Kanals in pankreatischen Betazellen zu beobachten war, auf eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation zurückgeführt werden (Marigo *et al.*, 2009).

### ***Verminderte Expression oder Aktivität des TRPM5-Kanals***

Eine verminderte *TRPM5*-Expression scheint sich auf den Phänotyp eines sonst gesunden Organismus nicht nennenswert auszuwirken; hierfür sprechen die Geschmackstests, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit *Trpm5-knock down*-Mäusen und von Damak und Mitarbeitern mit heterozygoten *Trpm5-knock out*-Mäusen (Damak *et al.*, 2006) durchgeführt wurden. Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Glukosetoleranztests bekräftigen die Vermutung, dass sich die heterozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse – im Gegensatz zu homozygoten *Knock out*-Mäusen – phänotypisch nicht von den Wildtyptieren unterscheiden.

Ein vollständiger Verlust des *Trpm5*-Kanals zieht jedoch phänotypische Veränderungen nach sich, die zwar auf dem ersten Blick nicht einfach zu erkennen sind, weil sie das Verhalten der *Trpm5-knock out*-Tiere oder ihre äußere Erscheinung nicht gravierend ändern. Bei einer näheren Betrachtung – und unter geeigneten Bedingungen – zeigen die homozygoten *Trpm5-knock out*-Mäuse jedoch Auffälligkeiten bei der Nahrungsaufnahme, da sie im Gegensatz zu Wildtyptieren die Geschmacksrichtungen süß, bitter und *umami* nicht wahrnehmen können (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Die Geschmacksdefizienz führt dazu, dass süß- und *umami*-schmeckende Nahrung nicht bevorzugt wird und bitterschmeckende Nahrung nicht vermieden wird. Dieser Phänotyp stellt einen klaren Nachteil für die Tiere dar, weil so wesentliche Informationen über die Qualität der Nahrung bezüglich des Nährstoffgehaltes und der Genießbarkeit verloren gehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der vollständige Verlust des *Trpm5*-Kanals auch in anderen Organen als der Zunge phänotypische Veränderungen nach sich zieht, da die *Trpm5-knock out*-Mäuse durch eine gestörte Glukosetoleranz gekennzeichnet sind, welche höchstwahrscheinlich auf eine veränderte Insulinsekretionskinetik in den pankreatischen Betazellen zurückzuführen ist.

Dass die Herunterregulation des *Trpm5*-Kanals oder dessen vollständiger Verlust keine dramatischeren Folgen für den Insulin- bzw. Glukosehaushalt der Versuchstiere hat, kann dadurch erklärt werden, dass *Trpm5*-verwandte Kanäle – in den pankreatischen Betazellen etwa *Trpm4* – diesen Verlust möglicherweise zum Teil kompensieren können. Auch der umgekehrte Fall, dass *Trpm5* den Verlust des *Trpm4*-Kanals puffert, ist denkbar, und würde erklären, warum die *Trpm4-knock out*-Mäuse keine veränderte Glukosetoleranz aufweisen (Marigo *et al.*, 2009; Vennekens *et al.*, 2007). Die in Kapitel 4.7.4.1 für TRPM5 und TRPM4 beschriebenen Aufgaben in der Betazelle sind untereinander so ähnlich, dass sicherlich auch

ohne TRPM5 Membrandepolarisationen stattfinden können, die vielleicht nur etwas zeitverzögert verlaufen. Außerdem verfügen die pankreatischen Betazellen vermutlich ohnehin über sehr dynamische Regulationsmechanismen, wie auch das folgende Beispiel verdeutlicht: Kir6.2 (*inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel*) und SUR1 (*sulphonylurea receptor type I*) sind Untereinheiten des K<sub>ATP</sub>-Kanals; während Kir6.2-Proteine die Kanalpore bilden, üben SUR1-Proteine regulatorische Funktionen aus (Inagaki *et al.*, 1995; Sakura *et al.*, 1995). Neugeborene *Kir6.2-knock out*-Mäuse leiden erwartungsgemäß unter Hyperinsulinämie und Hypoglykämie, also an zu niedrigen Blutglukosewerten aufgrund eines zu hohen Plasmainsulinspiegels, wohingegen adulte Tiere eine nur wenig beeinträchtigte Glukosehomöostase aufweisen, obwohl die glukosestimulierte Insulinsekretion vermindert ist (Miki *et al.*, 1998). Auch *SUR1-knock out*-Mäuse sind nur für eine sehr kurze Zeit nach der Geburt hyperinsulinämisch und hypoglykämisch, obwohl ihre Betazellen aufgrund des K<sub>ATP</sub>-Verlustes permanent depolarisiert sind (Düfer *et al.*, 2004; Seghers *et al.*, 2000; Shiota *et al.*, 2002). Diese scheinbar paradoxen Beobachtungen können nur zum Teil durch die insulinotrope, also Insulinsekretion anregende Wirkung der Inkretinhormone und des parasympathischen Systems in Betazellen (Miki *et al.*, 2005) sowie die gesteigerte Insulinaktivität in Muskeln (Miki *et al.*, 1998) erklärt werden. Weitere Experimente, die mit isolierten Inseln der *Kir6.2-knock out*-Maus durchgeführt wurden, zeigten außerdem, dass die basale Insulinsekretion in frisch isolierten *Kir6.2-knock out*-Inseln zwar doppelt so hoch ist wie in Wildtypinseln, nach einer Glukosestimulation die Insulinsekretion jedoch neunfach geringer ist als in Wildtypinseln (Ravier *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass frisch präparierte Inseln, welche die physiologische Situation eines Gesamtorganismus am ehesten widerspiegeln, über einen protektiven Mechanismus verfügen müssen, der auch bei Verlust der K<sub>ATP</sub>-Aktivität eine unkontrollierbar hohe Insulinsekretion – und damit einen lebensbedrohlichen Zustand der Hypoglykämie – verhindert. Interessanterweise ist nach einer Übernachtkultivierung der *Kir6.2-knock out*-Inseln wieder eine Insulinantwort auf einen Glukosestimulus zu beobachten, welche durch ein Ca<sup>2+</sup>-Signal des auslösenden Signalwegs der Insulinsekretion vermittelt wird (Ravier *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen zeigen, dass das heutige Modell der Insulinsekretionsregulation noch nicht vollständig ist, und dass es weitere, bisher unbekannte und möglicherweise auch dynamische Regulationsmechanismen geben muss. Diese würden auch erklären, warum der alleinige Wegfall der *Trpm5*-Aktivität keine schwerwiegenderen Folgen auf den Glukose- bzw. Insulinhaushalt der *Trpm5-knock out*-Maus hat.

Auch wenn sich der alleinige Wegfall der *Trpm5*-Aktivität nicht sofort auf die Gesundheit eines Organismus auswirkt, könnte er dennoch weitreichende Folgen haben und einen möglichen Schritt in der Entwicklung einer auf der Fehlfunktion der Betazelle beruhenden Erkrankung, wie beispielsweise Diabetes, darstellen. Wie in Kapitel 3.9. beschrieben, wurde in der Goto-Kakizaki-Ratte, einem Tiermodell für den humanen Diabetes Typ II (Goto *et al.*, 1975) neben anderen Expressionsveränderungen auch eine neunfache Herunterregulation der *Trpm5*-Expression nachgewiesen (Irminger *et al.*, 2002).

**Diabetes mellitus** wird definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels (Kerner *et al.*, 2004) und kommt durch eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Insulinwirkung, oder durch eine Kombination beider Störungen zustande. Nach dem „Deutschen Gesundheitsbericht Diabetes 2009“ (Deutsche Diabetes Union, 2008) wurden in Deutschland im Jahr 2006 mehr als sieben Millionen Menschen wegen Diabetes behandelt, was einer Behandlungsprävalenz von 8,6 % entspricht – im Jahr 1998 betrug die Behandlungsprävalenz noch 5,9 %. Der kontinuierliche Anstieg wird vor allem auf die Zunahme der Diabetes Typ II-Fälle zurückgeführt, die über 90 % aller Diabeteserkrankungen ausmachen. Während der Pathomechanismus des Diabetes Typ II auf einer gestörten Insulinsekretion und/oder auf einer Insulinresistenz, der Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber Insulin, beruht, ist Diabetes Typ I durch eine fortschreitende Zerstörung der Betazellen und einem daraus resultierenden Mangel an körpereigenem Insulin gekennzeichnet.

Diabetes Typ I, der etwa 5 % aller Diabeteserkrankungen ausmacht, tritt bevorzugt in früheren Lebensjahren auf, er kann sich jedoch auch erst im höheren Alter manifestieren. Er führt zu einem Insulinmangelsyndrom, das meist durch recht milde Symptome wie eine gestörte Glukosetoleranz oder erhöhte Nüchternblutglukosewerte gekennzeichnet ist. Er kann aber auch eine plötzliche, absolute Insulinbedürftigkeit auslösen, welche lebensbedrohliche Ausmaße einer Stoffwechselentgleisung, der diabetischen Ketoazidose, annehmen kann.

Diabetes Typ II wird oft auch Altersdiabetes genannt, obwohl zunehmend jüngere Menschen an dieser Form erkranken. Eine häufige Ursache für diesen Typ ist eine angeborene oder erworbene Insulinresistenz; die Ausprägung der Erkrankung wird durch eine ungesunde Lebensweise, die zu Übergewicht, Bluthochdruck und zu Störungen des Fettstoffwechsels führt, stark begünstigt. Eine falsche Ernährungsweise führt zu dauerhaft erhöhten Blutzuckerwerten, und um diese auszugleichen, steigern die Betazellen ihre Insulinproduktion. Zum einen führt die andauernde Stimulation der Insulinsekretion zur

Ermüdung der Betazellen und zum anderen vermindern die dauerhaft erhöhten Insulinspiegel sowohl die Anzahl als auch die Sensitivität der Insulinrezeptoren. Schließlich reicht das sezernierte Insulin nicht mehr aus, um die erhöhten Glukosewerte im Blut zu regulieren, ein Zustand, der als relativer Insulinmangel bezeichnet wird. Bei Diabetes Typ II kommt es zwar selten zu schweren Stoffwechsellentgleisungen, aber wie bei Typ I sind Gefäßerkrankungen (Mikro- und Makroangiopathien) häufig, die zu Schädigungen des Nervensystems (Neuropathien), der Netzhaut (Retinopathien) oder der Niere (Nephropathien) führen können. Im Gegensatz zu Diabetes Typ I benötigen Typ II-Patienten meist keine Insulintherapie, sondern die Behandlung umfasst häufig eine Ernährungsumstellung, vermehrte körperliche Aktivität und orale Antidiabetika.

Neben Typ I und Typ II kommen weitere, seltenere Diabetesformen vor, die durch spezielle genetische Mutationen, durch Erkrankungen des Pankreas oder durch Infektionen hervorgerufen werden. Darüber hinaus kommt Diabetes gelegentlich während der Schwangerschaft (Gestationsdiabetes) oder mit genetischen Syndromen assoziiert vor. Genauso vielfältig wie die Erkrankung selbst, sind auch seine genetischen Ursachen; Umweltfaktoren spielen eine zusätzliche auslösende oder modifizierende Rolle beim Ausbruch der Krankheit. Nur wenige Formen von Diabetes, wie MODY (*maturity onset diabetes of the young*) haben monogenetische Ursachen (Johansen *et al.*, 2005), denn in der Regel ist Diabetes die Folge einer Vielzahl genetischer Veränderungen, deren Wirkung sich im Laufe der Zeit summiert. Für Diabetes Typ I prädisponieren Mutationen in den HLA (*human leucocyte antigen*)-Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC; *major histocompatibility complex*; Nejentsev *et al.*, 2007) und anderen Genen, die bei Autoimmunreaktionen eine Rolle spielen (Grant *et al.*, 2009), während für die Entwicklung eines Diabetes Typ II-Phänotyps vor kurzem eine Reihe prädisponierender Polymorphismen sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Genombereichen identifiziert wurden (Grant *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2007; Sladek *et al.*, 2007; Zeggini *et al.*, 2008); viele dieser Polymorphismen wirken sich auf die Insulinsekretion aus (Perry und Frayling, 2008). Mutationen oder Polymorphismen, welche die *TRPM5*-Expression herunterregulieren, würden sich genauso gut in das Bild des multifaktoriell bedingten Diabetes einfügen wie Mutationen, welche die Aktivität des TRPM5-Kanals reduzieren oder zum Funktionsverlust (engl. *loss-of-function mutation*) führen.

### ***Erhöhte Expression oder Aktivität des TRPM5-Kanals***

Eine übermäßige TRPM5-Aktivität aufgrund einer Fehlregulation des Kanals oder einer Funktionsgewinnmutation (engl. *gain-of-function mutation*) im *TRPM5*-Gen, könnte im Vergleich zu den relativ geringen phänotypischen Auswirkungen einer alleinigen Reduktion der TRPM5-Aktivität nachhaltigere Folgen haben, da die zellulären Signalkaskaden, in denen TRPM5 involviert ist, auch in Abwesenheit eines stimulierenden Reizes angeschaltet wären. Für die Geschmackssinneszellen würde das bedeuten, dass die Signalwege der süß-, bitter- und *umami*-Reize kontinuierliche Signale erzeugen würden – vermutlich würden diese zur Adaptation des Geschmackssinnes führen. Aufgrund des Adaptationsvorganges könnte auch die Wahrnehmung der übrigen Geschmacksrichtungen (sauer und salzig) beeinträchtigt werden; möglicherweise würden sich dadurch die Geschmacksempfindungen generell verändern, falls die Geschmackssinneszellen nicht über Mechanismen verfügen, die eine chronische Geschmacksadaptation aufgrund einer TRPM5-Fehlfunktion verhindern, wie für andere Komponenten der Geschmackstransduktion beschrieben wurde (Chaudhari und Kinnamon, 2008).

Wie im Falle der oben beschriebenen inaktivierenden Mutationen in den  $K_{ATP}$ -Untereinheiten Kir6.2 und SUR1, die zum Verlust der  $K_{ATP}$ -Aktivität führen, könnte auch eine Überaktivität des TRPM5-Kanals unregulierte bzw. kontinuierliche Membrandepolarisationen in pankreatischen Betazellen auslösen, die eine erhöhte Insulinsekretion zur Folge hätten – ein Zustand, der als Hyperinsulinämie oder Hyperinsulinismus bezeichnet wird. Hierzu passt die Beobachtung, dass die Betazellen von Patienten, die an kongenitalem Hyperinsulinismus leiden, ein verändertes Ruhepotential aufweisen und zu spontanen Depolarisationen neigen, die unabhängig von Glukose die Exozytose von Insulin auslösen (Kane *et al.*, 1996).

Der **kongenitale Hyperinsulinismus** (CHI, *congenital hyperinsulinism*) ist die häufigste Ursache von persistierenden und rezidivierenden Hypoglykämien im Säuglingsalter. Die neonatale Form der Erkrankung – in der Regel als PHHI (*persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy*) bezeichnet – hat eine geschätzte Inzidenz von 1:50 000 (Pescovitz und Eugster, 2004). Dem heterogenen Krankheitsbild des CHI liegen unterschiedliche molekulare Defekte zugrunde. Nur bei der Hälfte aller Patienten, die an einem angeborenen Hyperinsulinismus leiden, konnten bisher die genetischen Ursachen identifiziert werden (Glaser *et al.*, 2000). Die schwere, neonatale Form des Hyperinsulinismus wird in den meisten Fällen durch rezessive Mutationen in *Kir6.2* oder *SUR1* verursacht, die zur Inaktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals führen (Thomas *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996; Nestorowicz *et al.*, 1998). Ein

milderer klinischer Verlauf ist meist mit einer dominant vererbten Mutation im Glukokinasegen (*GCK*; Glaser *et al.*, 1998) oder im Glutamatdehydrogenasegen (*GLUD-1*; Weinzimer *et al.*, 1997; Zammarchi *et al.*, 1996) assoziiert. CHI wird histologisch in zwei Haupttypen, die diffuse und fokale Form, eingeteilt, denen trotz des ähnlichen klinischen Erscheinungsbildes unterschiedliche molekulare Pathomechanismen zugrunde liegen (Rahier *et al.*, 2000). Bei der diffusen Form sind hypertrophe Betazellen mit großen Zellkernen und reichlich Zytoplasma über das gesamte Pankreas verteilt, wohingegen sich die fokale Form auf einen bis mehrere adenomartige Bereiche des Pankreas beschränkt – aus diesem Grund ist die fokale Form oft durch eine partielle Pankreatektomie behandelbar. Während Mutationen in *Kir6.2* oder *SURI* die diffuse Form verursachen, entsteht die fokale Form durch das gleichzeitige Auftreten einer paternalen *SURI*-Mutation und – in den fokalen Läsionen – einer somatischen Deletion in der maternalen Chromosomenregion 11p15, die zum Verlust des maternalen *SURI*-Allels führt (Verkarre *et al.*, 1998).

In der Chromosomenregion 11p15 liegen zusätzlich zu *SURI* (*ABCC8*), *Kir6.2* (*KCNJ11*) und *TRPM5* weitere Gene des Insulinhaushaltes, wie *INS* (*Insulin*), wachstumsfördernde Gene wie *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) und Tumorsuppressorgene wie *H19* und *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*). Da viele Gene dieser Chromosomenregion genomisch geprägt sind und sehr komplexe Regulationsmechanismen aufweisen (Enklaar *et al.*, 2006), ist es schwer vorauszusagen, welchen Anteil jedes einzelne Gen bei einer Erkrankung wie dem fokalen CHI ausmacht, in der größere Bereiche der Chromosomenregion 11p15 von Aberrationen betroffen sind. Bisherige Untersuchungen bezüglich des Expressionsstatus des humanen *TRPM5*-Gens, die mit somatischen Zellhybriden durchgeführt wurden, deuten auf eine monoallelische (paternale) Expression des Gens hin (Prawitt *et al.*, 2000). Falls *TRPM5* beim Menschen also tatsächlich dem genomischen Imprinting unterliegt und nur paternal exprimiert wird, so würde sich der Wegfall der maternalen Genkopie im Rahmen einer CHI-Erkrankung nur dann auf *TRPM5*-Transkription auswirken, wenn *TRPM5*-regulierende Elemente betroffen wären. Die möglichen Folgen einer reduzierten *TRPM5*-Expression wurden bereits im oberen Abschnitt diskutiert; eine erhöhte *TRPM5*-Expression könnte die Interaktion von *TRPM5* mit anderen Proteinen beeinflussen – ob sie mit der nativen Funktion des *TRPM5*-Kanals oder mit der Funktion anderer Proteine interferieren würde, ist schwer vorauszusagen.

Hyperinsulinismus, verbunden mit einer Hypoglykämie, kommt bei Neugeborenen auch mit anderen Syndromen assoziiert vor – zum Beispiel mit dem **Beckwith-Wiedemann-Syndrom**

(BWS; siehe hierzu auch Kapitel 1.2.1), welches mit einer Inzidenz von 1:13 000 auftritt (Enklaar *et al.*, 2006). Ungefähr 50 % der BWS-Patienten sind durch abnorme Blutzuckerwerte gekennzeichnet (Munns und Batch, 2001). Als Ursache hierfür wurde eine Dysregulation der Betazellen beschrieben, die mit einer Vergrößerung der Betazellen und der Langerhans'schen Inseln (Hypertrophie bzw. Hyperplasie) einhergeht (Combs *et al.*, 1966; Lee *et al.*, 1995; Lteif und Schwenk, 1999; Roe *et al.*, 1973). Die Ausprägung der Hypoglykämie ist bei BWS-Patienten – ähnlich wie die übrigen BWS-Merkmale – sehr variabel, und kann in mildereren Fällen durch Dextrose behandelt werden (Elliott *et al.*, 1994; Stanley 1997), wohingegen in schweren Fällen eine partielle Pankreatektomie durchgeführt werden muss (Aynsley-Green *et al.*, 2000; Roe *et al.*, 1973).

Auch an dem BWS-Phänotyp sind mehrere Gene der Chromosomenregion 11p15.5 beteiligt, in BWS-Patienten wurden neben Mutationen in dem Zellzyklusgen *CDKN1C* (Hatada *et al.*, 1996) epigenetische Veränderungen wie Hypomethylierung und Hypermethylierung von Genen (*KCNQ1OT1* und *H19*; Blik *et al.*, 2001; DeBaun *et al.*, 2002) sowie Verlust der genomischen Prägung (im *IGF2*-Gen; Sullivan *et al.*, 1999) nachgewiesen. Darüber hinaus kommt bei einigen BWS-Patienten uniparentale Disomie (UPD) der 11p15.5-Chromosomenregion vor (Henry *et al.*, 1991; Rainier *et al.*, 1993). Interessanterweise wurden auch „gemischte“ Phänotypen mit teilweise diabetischen und teilweise BWS-typischen Merkmalen beschrieben, so wurde bei einem dieser Patienten, der durch die BWS-Eigenschaften hohes Geburtsgewicht und Hemihypertrophie gekennzeichnet war, statt einem Hyperinsulinismus (und Hypoglykämie) Neugeborenenenddiabetes diagnostiziert. Diese war auf eine rezessive, aktivierende *SURI*-Mutation zurückzuführen, die aufgrund einer mosaikalen paternalen UPD in 11pter-11p14 demaskiert wurde. Die BWS-Merkmale konnten durch die Fehlregulation der in 11p15.5 liegenden Gene erklärt werden (Shield *et al.*, 2008).

Da Diabetes und CHI gewissermaßen durch gegensätzliche Phänotypen gekennzeichnet sind – Diabetes durch Hypoinsulinismus mit Hyperglykämie; CHI durch Hyperinsulinismus mit Hypoglykämie – werden sie in manchen Fällen sogar durch exakt gegenteilige Mutationen hervorgerufen. Zum Beispiel führen aktivierende Mutationen in den Untereinheiten des  $K_{ATP}$ -Kanals zur permanenten oder transienten neonatalen Diabetes (Babenko *et al.*, 2006; Flanagan *et al.*, 2007; Gloyn *et al.*, 2004; Gloyn *et al.*, 2005; Masia *et al.*, 2007; Proks *et al.*, 2006), während inaktivierende Mutationen derselben Gene CHI zur Folge haben (Thomas *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996). Im Glukokinasegen führen Funktionsverlustmutationen zu MODY 2 (Froguel *et al.*, 1993), wohingegen Funktionsgewinnmutationen Hyperinsulinismus



verursachen (Glaser *et al.*, 1998). Aufgrund der hier postulierten Folgen einer verminderten oder erhöhten Aktivität des TRPM5-Kanals können Mutationen, welche das *TRPM5*-Gen direkt oder indirekt betreffen, gut mit den bisherigen Kenntnissen über die genetischen und molekularen Ursachen des Diabetes und des kongenitalen Hyperinsulinismus verknüpft werden.

#### 4.8 Ausblick

Diabetes und kongenitaler Hyperinsulinismus (CHI) sind Erkrankungen des Insulin- bzw. Glukosehaushaltes, die beide eine enorme klinische Variabilität aufweisen. Ziel einer Diabetes- oder CHI-Therapie ist die Einstellung des Blutzuckers auf Werte, die akute Beschwerden und Spätkomplikationen verhindern. Schon heute kann die Therapie auf den einzelnen Diabetes- oder CHI-Patienten zugeschnitten werden, sofern die genetischen bzw. molekularen Ursachen der Erkrankung bekannt sind. So können beispielsweise Patienten, die an der dominant vererbten Form von CHI leiden, mit Diazoxid, einem  $K_{ATP}$ -Kanalöffner, behandelt werden, während Patienten mit der rezessiven Form von CHI, welche auf der Inaktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals beruht, resistent gegenüber Diazoxid sind. Zu den üblichen Antidiabetika gehören neben  $K_{ATP}$ -Blockern (Sulfonylharnstoffe und Glinide) Medikamente, welche die Glukoseaufnahme im Darm verzögern und/oder die Glukoneogenese in der Leber hemmen ( $\alpha$ -Glukosidasehemmer und Biguanide) sowie Insulin-Sensitizer, welche die Empfindlichkeit der Zellen für Insulin erhöhen und die Glukoneogenese hemmen. Inkretinmimetika und Amylinanaloga regulieren die Blutglukosekonzentration wie die entsprechenden körpereigenen Hormone, die aus endokrinen Darmzellen bzw. pankreatischen Betazellen freigesetzt werden.

Die genetischen Ursachen des Diabetes und des CHI sind sehr heterogen und bisher nicht vollständig entschlüsselt. Demzufolge besteht die zukünftige Arbeit dieses Forschungszweiges hauptsächlich darin, weitere Regulationsmechanismen der Insulinsekretion zu identifizieren und zusätzliche krankheitsverursachende Faktoren aufzudecken, um neue therapeutische Ansätze für die Behandlung dieser Erkrankungen zu entwickeln. Zwar konnten in der letzten Zeit beispielsweise für Diabetes Typ II mehrere prädisponierende Polymorphismen identifiziert werden, doch können diese die enorme genetische Varianz der Erkrankung nicht vollständig erklären (Stolerman und Florez, 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen dem TRPM5-Kanal in pankreatischen Betazellen wichtige Aufgaben bei der Kontrolle der Insulinsekretion zu. Zukünftige Mutations- und Expressionsanalysen des *TRPM5*-Gens bei Diabetes- und CHI-Patienten

können helfen, den Zusammenhang zwischen TRPM5 und den im Rahmen dieser Erkrankungen auftretenden Insulinsekretionsdefekten weiter zu entschlüsseln. Sollten sich Korrelationen zwischen dem genetischen Profil oder Expressionsprofil von *TRPM5* und den Krankheitsbildern ergeben, so könnte *TRPM5* in Zukunft als diagnostischer Marker genutzt werden, um entsprechende Therapien zu optimieren. Darüber hinaus würde in diesem Fall der TRPM5-Kanal selbst ein mögliches molekulares Ziel einer solchen Therapie darstellen.

Um das Wissen über die Funktion des TRPM5-Kanals zu vervollständigen, können die Auswirkungen einer TRPM5-Deletion auf die Kinetik der Insulinsekretion genauer untersucht werden, hierzu bieten sich weitere Insulinsekretionsanalysen mit isolierten Langerhans'schen Inseln der *Trpm5-knock out*-Maus an. Idealerweise sollten diese mit Hilfe eines Perfusionssystems durchgeführt werden; alternativ können, wie in dieser Arbeit beschrieben, immortalisierte Betazelllinien hergestellt und untersucht werden. Interessant wären auch weiterführende Insulinsekretionsanalysen mit *Trpm5-Trpm4-Doppel-knock out*-Mäusen, um die gemeinsame Signalkaskade dieser Kanäle aufzuklären.

Die Auswirkungen einer TRPM5-Überexpression auf die Insulinsekretion können zunächst in einer Betazellkultur untersucht werden – falls sich das im vorigen Kapitel postulierte Bild bewahrheitet, können parallel TRPM5-inhibierende Substanzen entwickelt und getestet werden, um eine übermäßige Insulinsekretion, wie sie beim kongenitalen Hyperinsulinismus vorkommt, zu hemmen. Möglicherweise könnte sogar TRPM5-short als therapeutisches Werkzeug genutzt werden, um TRPM5-Kanäle zu blockieren. Im Gegensatz hierzu können in einem geeigneten Zellsystem TRPM5-aktivierende Substanzen entwickelt werden, um die Insulinsekretion im umgekehrten Fall, beispielsweise bei Diabetespatienten, zu steigern.

Da TRPM5 nicht nur bei der Insulinsekretion, sondern auch bei der Geschmackswahrnehmung von süß-, bitter- und *umami*-Reizen eine Rolle spielt, kann untersucht werden, ob Diabetes- und CHI-Patienten eine veränderte Geschmackswahrnehmung aufweisen. Gerade bei Diabetespatienten müsste die Geschmackswahrnehmung beeinträchtigt sein, wenn sie – wie in Kapitel 4.7.4.2 angenommen – einen Verlust der TRPM5-Aktivität aufweisen. In diesem Falle würden mit Diabetespatienten durchgeführte Geschmackstests zusätzliche diagnostisch relevante Informationen über die molekularen Pathomechanismen liefern. Auch für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie stellt TRPM5 aufgrund der Funktion in der Geschmackswahrnehmung ein attraktives Ziel dar (Talavera *et al.*, 2008), denn TRPM5-modulierende Substanzen könnten dazu genutzt werden, gewünschte Geschmacksempfindungen zu erzeugen, während

TRPM5-Hemmer dazu verwendet werden könnten, den bitteren Geschmack von Medikamenten zu unterdrücken (Liman, 2007) – hierbei sollte jedoch darauf geachtet werden, dass diese Stoffe nicht in anderen Organen, wie etwa dem Pankreas, mit der TRPM5-Funktion interferieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Dissertation wurde der zur TRP (*transient receptor potential*)-Familie gehörende TRPM5-Kanal funktionell charakterisiert. Obwohl die meisten Mitglieder dieser Ionenkanalfamilie erst in den letzten zehn Jahren identifiziert wurden, kann schon heute davon ausgegangen werden, dass nahezu jeder Zelltyp mit einer ganzen Reihe verschiedener TRP-Kanäle ausgestattet ist, die bei der Aufnahme und Weiterleitung von vielfältigen chemischen und physikalischen Signalen eine wesentliche Rolle spielen.

Zu Beginn dieser Arbeit stellte das *TRPM5*-Gen in erster Linie ein Kandidatengen für 11p15.5-gekoppelte Erkrankungen wie das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) dar, die mit einem erhöhten Tumorrisiko einhergehen. Da die genetischen Ursachen der Tumorentstehung noch nicht vollständig entschlüsselt sind, wurde mit Hilfe einer *TRPM5*-überexprimierenden HEK 293-Zelllinie zunächst das tumorigene Potential von *TRPM5* untersucht, doch es konnte kein Zusammenhang zwischen einer *TRPM5*-Überexpression und der Tumorentstehung nachgewiesen werden. Elektrophysiologische Analysen dieser Zelllinie zeigten, dass TRPM5 einen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren, nicht-selektiven Kationenkanal (CAN, *Ca<sup>2+</sup>-activated non-selective*) darstellt, der monovalente Ionen leitet. Für die Aktivierung des TRPM5-Kanals ist nicht die absolute intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), sondern vielmehr die Geschwindigkeit des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs von Bedeutung – so konnte gezeigt werden, dass TRPM5 eine Komponente der zellulären Signaltransduktionskaskaden darstellt: Nach Rezeptoraktivierung induziert TRPM5 einen raschen, transienten Kationeneinstrom, der zur Depolarisation der Zellmembran führt, diese kann daraufhin weitere zelluläre Signalwege initiieren, indem sie beispielsweise spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert.

Dass die TRPM5-Proteine hauptsächlich in der Zellmembran lokalisiert sind, wurde durch Expression der beiden humanen TRPM5-Spleißformen als TRPM5/EGFP-Fusionsproteine in HEK 293-Zellen nachgewiesen. In elektrophysiologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die kurze Spleißform TRPM5-short als TRPM5-Kanalblocker funktioniert.

Da das *TRPM5*-Expressionsmuster kontrovers diskutiert wird, wurden Expressionsanalysen mit verschiedenen Zelllinien und murinen Geweben durchgeführt. Dabei konnte die *TRPM5*-Expression lediglich auf RNA-Ebene untersucht werden, da sich keiner der sechs getesteten Antikörper als TRPM5-spezifisch erwies. Transkripte des *TRPM5*-Gens wurden in den meisten untersuchten Zelllinien und Geweben gefunden – oft zusammen mit *TRPM4*, dem

nächsten Verwandten von *TRPM5*. In Coimmunpräzipitationsversuchen konnte jedoch keine direkte Interaktion von TRPM5 und TRPM4 nachgewiesen werden.

Für die funktionelle Charakterisierung des TRPM5-Kanals *in vivo* wurde ein auf RNAi (*RNA interference*) basierendes, transgenes *Trpm5-knock down*-Mausmodell hergestellt, welches eine *Trpm5*-spezifische siRNA konstitutiv exprimiert. In drei der vier etablierten *Knock down*-Mauslinien konnte eine Herunterregulation des *Trpm5*-Transkriptes in der Leber und/oder in der Zunge nachgewiesen werden; Geschmackstests deuteten jedoch darauf hin, dass die beobachtete Herunterregulation die normale Funktion des Kanals nicht beeinträchtigt, so dass die *Trpm5-knock down*-Maus phänotypisch nicht mit der *Trpm5-knock out*-Maus, die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit publiziert wurde, vergleichbar ist. Aus diesem Grunde wurden für die weiteren funktionellen Analysen *Trpm5-knock out*-Mäuse verwendet, für die bisher lediglich eine beeinträchtigte Wahrnehmung der Geschmacksrichtungen süß, bitter und *umami* publiziert wurde (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die *Trpm5-knock out*-Maus eine gestörte Glukosetoleranz aufweist, die sich jedoch nicht auf den Langzeitblutzuckerwert auswirkt. In Insulinsekretionsanalysen mit isolierten Langerhans'schen Inseln konnte gezeigt werden, dass die beeinträchtigte Glukosetoleranz der *Trpm5-knock out*-Mäuse höchstwahrscheinlich auf eine gestörte Insulinsekretionskinetik in den pankreatischen Betazellen zurückzuführen ist. Aufgrund der hier beschriebenen Funktion als Regulator des Membranpotentials in pankreatischen Betazellen stellt TRPM5 einen neuen Kandidaten für Erkrankungen wie Diabetes und kongenitalem Hyperinsulinismus dar, die durch eine Fehlregulation der Insulinsekretion gekennzeichnet sind.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M (2003)** A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115: 863-877.

**Ahern GP (2003)** Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278: 30429-30434.

**Arkhammar POG, Terry BR, Kofod H, Thastrup O (1998)** Pancreatic islets cultured on extracellular matrix: An excellent preparation for microfluorometry. *Methods Cell Sci* 19: 255-268.

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

**Aynsley-Green A, Hussain K, Hall J, Saudubray JM, Nihoul-Fékété C, De Lonlay-Debeney P, Brunelle F, Otonkoski T, Thornton P, Lindley KJ (2000)** Practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82: F98-F107.

**Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P (2006)** Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med* 355: 456-466.

**Bach G (2005)** Mucolipin 1: endocytosis and cation channel - a review. *Pflugers Arch* 451: 313-317.

**Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004)** Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857.

**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. *Nat Genet* 26: 118-123.

**Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, 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. *Am J Hum Genet* 67: 1110-1120.

**Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000)** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21.

**Bezzerrides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004)** Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6: 709-720.

**Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ (2002)** Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 5: 856-860.

- Bliek J, Maas S, Ruijter J, Hennekam R, Alders M, Westerveld A, Mannens M (2001)** Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* 10: 467-476.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983)** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002)** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2006)** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2334-2339.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001)** Specific inhibition of gene expression by small doublestranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9742-9747.
- Caplen NJ (2004)** Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: The impact of RNA interference. *Gene Ther* 11: 1241-1248.
- Carmell MA, Zhang L, Conklin DS, Hannon GJ, Rosenquist TA (2003)** Germline transmission of RNAi in mice. *Nature Struct Biol* 10: 91-92.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000)** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997)** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
- Caumo A, Luzi L (2004)** First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E371-E385.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006)** The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288-294.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ (2000)** T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100: 703-711.
- Chaudhari N, Kinnamon SC (2008)** cAMP: A Role in Sweet Taste Adaptation. *ACS Symposium Series* 979: 220-229. American Chemical Society, Washington, DC (Hrsg.).
- Cheng H, Beck A, Launay P, Gross SA, Stokes AJ, Kinet JP, Fleig A, Penner R (2007)** TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 41: 51-61.
- Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, 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 DE (2003)** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005)** International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* 57: 427-450.
- Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, Kinnamon SC (2006)** Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol* 4: 7.
- Colquhoun D, Neher E, Reuter H, Stevens CF (1981)** Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 294: 752-754.
- Combs J, Grunt J, Brandt I (1966)** New syndrome of neonatal hypoglycaemia association with visceromegaly, macroglossia, microcephaly and abnormal umbilicus. *N Engl J Med* 275: 236-243.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS (2004)** TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432: 723-730.
- Corteling RL, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall IP (2004)** Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 145-154.
- Cosens DJ, Manning A (1969)** Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature* 224: 285-287.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Pérez CA, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B Jr., Glendinning JI, Ninomiya Y, Margolskee RF (2006)** Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31: 253-264.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000)** Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-187.
- DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP (2002)** Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 70: 604-611.
- Deutsche Diabetes Union (DDU, Hrsg.) 2008** Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2009. Kirchheim + Co. GmbH.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T (2005)** Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 257-265.



- Di Palma F, Belyantseva I, Kim H, Vogt T, Kachar B, Noben-Trauth K (2002)** Mutations in *Mcoln3* associated with deafness and pigmentation defects in varifaint-waddler (Va) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14994-14999.
- Dorovkov MW, Ryazanov AG (2004)** Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem* 279: 50643-50646.
- Dorsett Y, Tuschl T (2004)** siRNAs: Applications in functional genomics and potential therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3: 318-329.
- Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2004)** Oscillations of membrane potential and cytosolic Ca(2+) concentration in SUR1(-/-) beta cells. *Diabetologia* 47: 488-498.
- Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998)** Down-regulation of the novel gene *melastatin* correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58: 1515-1520.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989)** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
- Earley S, Waldron BJ, Brayden JE (2004)** Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res* 95: 922-929.
- Elbashir SM, Harboth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001)** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER (1994)** Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 46: 168-174.
- 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* 67: 179-187.
- Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D (2006)** Beckwith-Wiedemann syndrome: multiple molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Med* 8: 1-19.
- 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.
- Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS (2005)** A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202: 651-662.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

**Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003)** Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22: 7858-7861.

**Flanagan SE, Patch AM, Mackay DJ, Edghill EL, Gloyn AL, Robinson D, Shield JP, Temple K, Ellard S, Hattersley AT (2007)** Mutations in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes* 56: 1930-1937.

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

**Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S (2006)** Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 159-178.

**Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost CP, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001)** Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in Trp4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol* 3: 121-127.

**Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P (1993)** Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328: 697-702.

**Geppetti P, Trevisani M (2004)** Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol* 141: 1313-1320.

**Gilon P, Henquin JC (1992)** Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 267: 20713-20720.

**Gilon P, Ravier MA, Jonas JC, Henquin JC (2002)** Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 (Suppl 1): S144-S151.

**Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC (1998)** Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338: 226-230.

**Glaser B, Thornton P, Otonkoski T, Junien, C (2000)** Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82: F79-F86.

**Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT (2004)** Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 350: 1838-1849.

**Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple IK, Mackay DJ, Shield JP, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Ashcroft FM, Gribble FM, Hattersley AT (2005)** Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet* 14: 925-934.

**Goto Y, Kakizaki M, Masaki N (1975)** Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad* 51: 80-85.

**Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977)** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-72.

**Grant SF, Qu HQ, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Taback SP, Frackelton EC, Eckert AW, Annaiah K, Lawson ML, Otieno FG, Santa E, Shaner JL, Smith RM, Skraban R, Imielinski M, Chiavacci RM, Grundmeier RW, Stanley CA, Kirsch SE, Waggott D, Paterson AD, Monos DS, DCCT/EDIC Research Group, Polychronakos C, Hakonarson H (2009)** Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes* 58: 290-295.

**Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K (2006)** Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38: 320-323.

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

**Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C (2003)** Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278: 21493-21501.

**Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006)** Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537-541.

**Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991)** The E7 gene of human papilloma virus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 65: 473-478.

**Hanahan D (1985)** Techniques for transformation in *Escherichia coli*. *DNA Cloning: a practical approach, Vol I*: 109-135. IRL Press, Oxford; Glover DM (Hrsg.).

**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 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell* 9: 163-173.

**Hardie RC, Minke B (1992)** The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8: 643-651.

- Harteneck C (2003)** Proteins modulating TRP channel function. *Cell Calcium* 33: 303-310.
- Harteneck C (2005)** Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 307-314.
- Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M (2002)** Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532: 227-230.
- Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y, Kaneko Y, Inoue M, Komoto Y, Okada A, Ohishi S, Nabetani A, Morisaki H, Nakayama M, Niikawa N, Mukai T (1996)** An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Nat Genet* 14: 171-173.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989)** HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8: 3905-3910.
- Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ, Lowe SW (2003)** An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nature Genet* 33: 396-400.
- Henquin JC (2000)** Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
- Henquin JC (2004)** Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* 53 (Suppl 3): S48-S58.
- Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P (2003)** Hierarchy of the betacell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 33: 742-750.
- Henry I, Bonaiti-Pellié C, Chehense V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C (1991)** Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 351: 665-667.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C (2001)** The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE* 111: re19.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2005)** Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85: 373-422.
- Hoenderop JG, Van Leeuwen JP, Van der Eerden BC, Kersten FF, Van der Kemp AW, Merillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ (2003a)** Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 112: 1906-1914.
- Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ (2003b)** Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup>-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13: 1153-1158.

- Hoth M, Penner R (1992)** Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: 353-356.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995)** Reconstitution of I-KATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170.
- Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K (2003)** Response to ADP-Ribose by Activation of TRPM2 in the CRI-G1 Insulinoma Cell Line. *J Membr Biol.* 191: 201-207.
- Irminger J, Serradas P, Rickenbach K, Lyle R, Gangreau MN, Portha B, Halban PA (2002)** Identification of differentially expressed genes in islets of diabetic GK rats, using subtractive hybridization. Abstract No. 444, 38<sup>th</sup> annual meeting of the EASD.
- Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, Kiuchi Y (2006)** Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> influx and cell death in rat  $\beta$ -cell line RIN-5F. *Cell Calcium* 39: 487-494.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H (2006)** Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12569-12574.
- Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T (2005)** Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4607-4614.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004)** Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM (2001)** Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3: 499-502.
- Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PR, James RF, Milla PJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ, Dunne MJ (1996)** Loss of functional KATP channels in pancreatic beta-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nat Med* 2: 1344-1347.
- Kaur P, McDougall JK, Cone R (1989)** immortalization of primary human epithelial cells by cloned cervical carcinoma DNA containing human papillomavirus type 16 E6/E7 open reading frames. *J Gen Virol* 70: 1261-1266.
- Kerner W, Brückel J, Böhm BO (2004)** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG „www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de“/Evidenzbasierte Leitlinien/Definition. Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.).
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003)** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216.

- Kraft R, Harteneck C (2005)** The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 451: 204-211.
- Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PF, Nakamura Y, Feinberg AP (1993)** Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 260: 361-364.
- Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R (2005)** Cyclic ADPribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18: 61-69.
- Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J (2003)** Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotech* 21: 559-561.
- Kunert-Keil C, Bisping F, Kruger J, Brinkmeier H (2006)** Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7: 159.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 22: 680-682.
- Launay P, Cheng H, Srivatsan S, Penner R, Fleig A, Kinet JP (2004)** TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* 306: 1374-1377.
- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP (2002)** TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109: 397-407.
- Lazzeri M, Vannucchi MG, Spinelli M, Bizzoco E, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS (2005)** Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma in human bladder. *Eur Urol* 48: 691-698.
- Lee G, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, Fuller CW, Halloran ND, Wilson RK (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.
- Lee PJ, Leonard JV (1995)** Hypoglycaemia. In: Brook CGD (ed.): *Clinical paediatric endocrinology*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science: 677-693.
- Lewis RS (2001)** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19: 497-521.
- Liedtke W, Friedman JM (2003)** Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13698-13703.
- Liman ER (2007)** TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol* 179: 287-298.
- Liman ER, Corey DP, Dulac C (1999)** TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5791-5796.

- Lin W, Margolskee R, Donnert G, Hell SW, Restrepo D (2007)** Olfactory neurons expressing TRPM5 project to the ventral olfactory bulb and are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2471-2476.
- Lindemann B (2001)** Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219-225.
- Liu D, Liman ER (2003)** Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15160-15165.
- Lo MV, Pak WL (1981)** Light-induced pigment granule migration in the reticular cells of *Drosophila melanogaster*. Comparison of wild type with ERG-defective mutants. *J General Physiol* 77: 155-175.
- Lteif AN, Schwenk WF (1999)** Hypoglycemia in infants and children. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 619-646.
- Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan TH, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW, DeSimone JA (2004)** The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J Physiol* 558: 147-159.
- Macpherson L, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Patapoutian A (2005)** The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15: 929-934.
- Matschinsky FM (1996)** Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-241.
- Margolskee RF (2002)** Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem* 277: 1-4.
- Marigo V, Courville K, Hsu WH, Feng JM, Cheng H (2009)** TRPM4 impacts on Ca<sup>2+</sup> signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol Cell Endocrinol* 299: 194-203.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005)** TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185.
- Masia R, De Leon DD, MacMullen C, McKnight H, Stanley CA, Nichols CG (2007)** A mutation in the TMD0-L0 region of sulfonylurea receptor-1 (L225P) causes permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM). *Diabetes* 56: 1357-1362.
- Mason PJ, Enver T, Wilkinson D, Williams GJ (1993)** Assay of gene transcription in vivo. In: Hames BD, Higgins SJ (eds.) *Gene Transcription: A practical approach*. Oxford University Press: 5-63.
- Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, Tomizawa K, Matsui H, Chait BT, Cahalan MD, Nairn AC (2005)** Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem* 280: 20793-20803.

- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002)** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58.
- McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA (2002)** Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 8: 842-850.
- Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S (2005)** Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes* 54: 1056-1063.
- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S (1998)** Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10402-10406.
- Miyagishi M, Taira K (2002)** U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnol* 20: 497-500.
- Mohr FC, Fewtrell C (1987)** Depolarization of rat basophilic leukemia cells inhibits calcium uptake and exocytosis. *J Cell Biol* 104: 783-792.
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003)** TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121: 49-60.
- Montell C (2001)** Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci STKE* 90: re1.
- Montell C (2005)** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 272: re3.
- Montell C, Rubin GM (1989)** Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323.
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A (2005)** Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307: 1468-1472.
- Morgan AJ, Jacob R (1994)** Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 300: 665-672.
- Munns CFJ, Batch JA (2001)** Hyperinsulinism and Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 84: F67-F69.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003)** TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93: 829-838.
- Myslinski E, Ame JC, Krol A, Carbon P (2001)** An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* 29: 2502-2509.



- Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989)** The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001)** LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411: 590-595.
- Nathan JD, Patel AA, McVey DC, Thomas JE, Prpic V, Vigna SR, Liddle RA (2001)** Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. *Am J Physiol* 281: G1322-G1328.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003)** Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33: 129-137.
- Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T (1994)** New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372: 103-107.
- Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszko J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA, Wellcome Trust Case Control Consortium (2007)** Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 450: 887-892.
- Nesher R, Anteby E, Yedovitzky M, Warwar N, Kaiser N, Cerasi E (2002)**  $\beta$ -cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* 51 (Suppl 1): S68-S73.
- Nestorowicz A, Glaser B, Wilson BA, Shyng SL, Nichols CG, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA (1998)** Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism. *Hum Mol Genet* 7: 1119-1128.
- Nilius B (2004)** Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry channels: still elusive! *Sci STKE* 243: pe36.
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003)** Voltage dependence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278: 30813-30820.
- Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Zhu MX (2005a)** Regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280: 6423-6433.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005b)** Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567: 35-44.
- Nilius B, Voets T (2005)** TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* 451: 1-10.

**Nomura H, Turco AE, Pei Y, Kalaydjieva L, Schiavello T, Weremowicz S, Ji W, Morton CC, Meisler M, Reeders ST, Zhou J (1998)** Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J Biol Chem* 273: 25967-25973.

**Oberdoerffer P, Kanellopoulou C, Heissmeyer V, Paeper C, Aifantis I, Rao A, Rajewsky K (2005)** Efficiency of RNA interference in the mouse hematopoietic system varies between cell types and developmental stages. *Mol Cell Biol* 25: 3896-3905.

**Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE (2005)** Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280: 22540-22548.

**Okuhara DY, Hsia AY, Xie M (2007)** Transient receptor potential channels as drug targets. *Expert Opin Ther Targets* 11: 391-401.

**Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ (1989)** A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 92: 513-518.

**Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B (2006a)** Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156: 61-90.

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

**Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002)** Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16: 948-958.

**Panten U, Ishida H, Schauder P, Frerichs H, Hasselblatt A (1977)** A versatile microperfusion system. *Analyt Biochem* 82: 317-326.

**Pardo LA, Stühmer W (2008)** Eag1: an emerging oncological target. *Cancer Res* 68: 1611-1613.

**Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR (2002)** Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnol* 20: 505-508.

**Petersen OH (2002)** Cation channels: homing in on the elusive CAN channels. *Curr Biol* 12: R520-R522.

**Phillips AM, Bull A, Kelly LE (1992)** Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* 8: 631-642.

**Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kühne F, Descombes P, Zdobnov EM, McManus MT, Guillou F, Harfe BD, Yan W, Jégou B, Nef S (2009)** Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 326: 250-259.

**Parekh AB, Putney JW Jr. (2005)** Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85: 757-810.

- Parekh AB, Penner R (1997)** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993)** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-8396.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002)** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715.
- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR (2001)** CaT1 expression correlates with tumour grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 729-734.
- Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF (2002)** A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5: 1169-1176.
- Pérez CA, Margolskee RF, Kinnamon SC, Ogura T (2003)** Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium* 33: 541-549.
- Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001)** ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411: 595-599.
- Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM (2005)** Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 280: 6138-6148.
- Perry JR, Frayling TM (2008)** New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 371-377.
- Pescovitz OH, Eugster EA (2004)** *Pediatric Endocrinology: Mechanisms, Manifestations and Management*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Prakriya M, Lewis RS (2003)** CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33: 311-321.
- Prawitt D, Brixel L, Spangenberg C, Eshkind L, Heck R, Oesch F, Zabel B, Bockamp E (2004)** RNAi knock-down mice: an emerging technology for post-genomic functional genetics. *Cytogenet Genome Res* 105: 412-421.
- 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 MK, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R (2003)** TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15166-15171.
- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007)** TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1772: 937-946.
- Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Ashcroft FM, Ellard S (2006)** A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 15: 1793-1800.
- Putney JW Jr. (1977)** Muscarinic, alphaadrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J Physiol* 268: 139-149.
- Putney JW Jr. (1990)** Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.
- Qian F, Huang P, Ma L, Kuznetsov A, Tamarina N, Philipson LH (2002)** TRP genes: candidates for nonselective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. *Diabetes* 51 (Suppl 1): S183-S189.
- Rahier J, Guiot Y, Sempoux C (2000)** Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: a heterogeneous syndrome unrelated to nesidioblastosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82: F108-F112.
- Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S, Henquin JC (2009)** Glucose controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> and insulin secretion in mouse islets lacking adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels owing to a knockout of the pore-forming subunit Kir6.2. *Endocrinology* 150: 33-45.
- Raychowdhury MK, Gonzalez-Perrett S, Montalbetti N, Timpanaro GA, Chasan B, Goldmann WH, Stahl S, Cooney A, Goldin E, Cantiello HF (2004)** Molecular pathophysiology of mucopolidosis type IV: pH dysregulation of the mucolipin-1 cation channel. *Hum Mol Genet* 13: 617-627.
- Ramsey S, Delling M, Clapham DE (2006)** An Introduction to TRP Channels. *Annu Rev Physiol* 68: 619-647.
- Reid LH, West A, Gioeli DG, Phillips KK, Kelleher KF, Araujo D, Stanbridge EJ, Dowdy SF, Gerhard DS, Weissman BE (1996)** Localization of a tumor suppressor gene in 11p15.5 using the G401 Wilms' tumor assay. *Hum Mol Genet* 5: 239-247.
- Roe TF, Kershner AK, Weitzman JJ, Madrigal LS (1973)** Beckwith's syndrome with extreme organ hyperplasia. *Pediatrics* 52: 372-381.
- Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005)** PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8: 626-634.
- Rohacs T (2007)** Regulation of TRP channels by PIP<sub>2</sub>. *Pflugers Arch* 453: 753-762.

- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP (1993)** Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362: 747-749.
- Rong M, He W, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Pérez CA, Mosinger B, Ninomiya Y, Margolskee RF, Damak S (2005)** Signal transduction of umami taste: Insights from knockout mice. *Chem Senses* 30: i33-i34.
- Rorsman P, Renström E (2003)** Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1029-1045.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2001)** TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291: 1043-1047.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2002)** The TRPM7 channel is inactivated by PIP2 hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4: 329-336.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saimi Y, Kung C (2002)** Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol* 64: 289-311.
- Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM (1995)** Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 377: 338-344.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tirupathi C (2001)** Ca(2+) signalling and PKC $\alpha$  activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* 533: 433-445.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K (2001)** Immunocyte Ca<sup>2+</sup> Influx System Mediated by LTRPC2. *Science* 293: 1327-1330.
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M (1991)** Widespread synchronous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418: 417-422.

- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S (2007)** Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316: 1331-1336.
- Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, Senechal S, Janin A, Tscopoulos A, Plenat F, Bechard D, Tonnel AB, Lassalle P (2003)** Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res* 63: 6084-6089.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003)** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
- Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L, Bryan J (2000)** Sur1 knockout mice. A model for KATP channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 9270-9277.
- Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A (1989)** Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264: 17816-17823.
- Shankar P, Manjunath N, Lieberman J (2005)** The Prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA* 293: 1367-1373.
- Shewade YM, Umrani M, Bhonde RR (1999)** Large-scale isolation of islets by tissue culture of adult mouse pancreas. *Transplant Proc* 31: 1721-1723.
- Shield JP, Flanagan SE, Mackay DJ, Harries LW, Proks P, Girard C, Ashcroft FM, Temple IK, Ellard S (2008)** Mosaic paternal uniparental isodisomy and an ABCC8 gene mutation in a patient with permanent neonatal diabetes and hemihypertrophy. *Diabetes* 57: 255-258.
- Shiota C, Larsson O, Shelton KD, Shiota M, Efanov AM, Hoy M, Lindner J, Kooptiwut S, Juntti-Berggren L, Gromada J, Berggren PO, Magnuson MA (2002)** Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose. *J Biol Chem* 277: 37176-37183.
- Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T (2003)** NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 301: 96-99.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007)** A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881-885.

- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J (2003)** RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351.
- Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M (2003)** Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Molec Biol* 327: 761-766.
- Sotomayor M, Corey DP, Schulten K (2005)** In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* 13: 669-682.
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Srivastava S, Goren HJ (2003)** Insulin constitutively secreted by Beta cells is necessary for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 52: 2049-2056.
- Stanley CA (1997)** Hyperinsulinism in infants and children. *Pediatr Clin North Am* 44: 363-374.
- Stolerman ES, Florez JC (2009)** Genomics of type 2 diabetes mellitus: implications for the clinician. *Nat Rev Endocrinol* 5: 429-436.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003)** ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-829.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G (2002)** Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295: 1493-1500.
- Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y (2002)** A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5515-5520.
- Sullivan MJ, Taniguchi T, Jhee A, Kerr N, Reeve AE (1999)** Relaxation of IGF2 imprinting in Wilms tumours associated with specific changes in IGF2 methylation. *Oncogene* 18: 7527-7534.
- Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno JS Jr., Bove C, Kaneski CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt SA (2000)** Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* 9: 2471-2478.
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M (2003)** Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278: 22664-22668.
- Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A (2005)** Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett* 382: 304-308.

- Takasawa S, Akiyama T, Nata K, Kuroki M, Tohgo A, Noguchi N, Kobayashi S, Kato I, Katada T, Okamoto H (1998)** Cyclic ADPribose and inositol 1,4,5-trisphosphate as alternate second messengers for intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in normal and diabetic beta-cells. *J Biol Chem* 273: 2497-2500.
- Talavera K, Yasumatsu K, Voet T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B (2005)** Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438: 1022-1025.
- Talavera K, Yasumatsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Voets T, Ninomiya Y, Nilius B (2008)** The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interactions. *FASEB J* 22: 1343-1355.
- Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX (2001)** Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 276: 21303-21310.
- Tang Y, Tang J, Chen Z, Trost C, Flockerzi V, Li M, Ramesh V, Zhu MX (2000)** Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* 275: 37559-37564.
- Teilmann SC, Byskov AG, Pedersen PA, Wheatley DN, Pazour GJ, Christensen ST (2005)** Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Mol Reprod Dev* 71: 444-452.
- Thomas PM, Cote GJ, Wohilk N, Haddad B, Mathew PM, Rabel W, Aquilar-Bryan L, Gagel RF, Byran J (1995)** Mutations in the sulphonylurea receptor and familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268: 426-429.
- Thomas PM, Yuyang Y, Lightner E (1996)** Mutation of the pancreatic islet inward rectifier, Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet* 5: 1809-1812.
- Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB (2002)** Impairment of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in TRPC4<sup>-/-</sup> mice interferes with increases in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91: 70-76.
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM (2003)** A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1844-1848.
- Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M (2004)** Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* 279: 35133-35138.
- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M (2006)** TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25: 1804-1815.
- Tordoff MG, Bachmanov AA (2002)** Influence of test duration on the sensitivity of the two-bottle choice test. *Chem Senses* 27: 521-529.



- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R (2001)** Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61: 3760-3769.
- Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL, Schilling WP (1994)** Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 266: C1501–C1505.
- Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS (2005)** Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-1. *Mol Pain* 1: 17.
- Van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Tjon Pon Fong M, Brantjes H, Van Leenen D, Holstege FCP, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H (2003)** Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *Embo Rep* 4: 609-615.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999)** Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2060-2064.
- Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998)** The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273: 8675-8679.
- Van Rossum DB, Patterson RL, Sharma S, Barrow RK, Kornberg M, Gill DL, Snyder SH (2005)** Phospholipase C $\gamma$ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* 434: 99-104.
- Venkatachalam K, Hofmann T, Montell C (2006)** Lysosomal localization of TRPML3 depends on TRPML2 and the mucopolidosis-associated protein TRPML1. *J Biol Chem* 281: 17517-17527.
- Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M (2007)** Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol* 8: 312-320.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004)** The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-754.
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, Van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004)** TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption. *J Biol Chem* 279: 19-25.
- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B (2004)** Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* 449: 213-226.
- Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2004)** Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 396-401.

- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS (2000)** A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Science* 287: 2229-2234.
- Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A (2002)** Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADPribose. *J Biol Chem* 277: 23150-23156.
- Weinzimer SA, Stanley CA, Berry GT, Yudkoff M, Tuchman M, Thornton PS (1997)** A syndrome of congenital hyperinsulinism and hyperammonemia. *J Pediatr* 130: 661-664.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990)** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995)** TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9652-9656.
- Wille L, Kemp ML, Sandy P, Lewis CL, Lauffenburger DA (2007)** Epi-allelic Erk1 and Erk2 knockdown series for quantitative analysis of T cell Erk regulation and IL-2 production. *Mol Immunol* 44: 3085-3091.
- Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ (1990)** Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 6: 679-714.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V (2001)** Expression of CaTlike, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 276: 19461-19468.
- Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H Jr., Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (1998)** Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93: 177-188.
- Wu G, Somlo S (2000)** Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab* 69: 1-15.
- Verkarre V, Fournet JC, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saundubray JM, Junie C (1998)** Paternal mutation of the sulfonyleurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest* 102: 1286-1291.
- Xia XG, Zhou H, Samper E, Melov S, Xu Z (2006)** Pol II-expressed shRNA knocks down Sod2 gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *PLoS Genet* 2: e10.
- Xu XZ, Chien F, Butler A, Salkoff L, Montell C (2000)** TRPgamma, a Drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* 26: 647-657.

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

**Yao F, Svensjo T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E (1998)** Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* 9: 1939-1950.

**Yu FH, Catterall WA (2004)** The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 253: re15.

**Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF (2003)** Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* 114: 777-789.

**Zammarchi E, Filippi L, Novembre E, Donati MA (1996)** Biochemical evaluation of a patient with a familial form of leucine-sensitive hypoglycemia and concomitant hyperammonemia. *Metabolism* 45: 957-960.

**Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, Ardlie K, Boström KB, Bergman RN, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Burtt NP, Chen H, Chines PS, Daly MJ, Deodhar P, Ding CJ, Doney AS, Duren WL, Elliott KS, Erdos MR, Frayling TM, Freathy RM, Gianniny L, Grallert H, Grarup N, Groves CJ, Guiducci C, Hansen T, Herder C, Hitman GA, Hughes TE, Isomaa B, Jackson AU, Jørgensen T, Kong A, Kubalanza K, Kuruvilla FG, Kuusisto J, Langenberg C, Lango H, Lauritzen T, Li Y, Lindgren CM, Lyssenko V, Marvelle AF, Meisinger C, Midtjell K, Mohlke KL, Morcken MA, Morris AD, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Palmer CN, Payne F, Perry JR, Pettersen E, Platou C, Prokopenko I, Qi L, Qin L, Rayner NW, Rees M, Roix JJ, Sandbaek A, Shields B, Sjögren M, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Swift AJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Timpson NJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Walker M, Watanabe RM, Weedon MN, Willer CJ; Wellcome Trust Case Control Consortium, Illig T, Hveem K, Hu FB, Laakso M, Stefansson K, Pedersen O, Wareham NJ, Barroso I, Hattersley AT, Collins FS, Groop L, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler D (2008)** Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 40: 638-645.

**Zhang L, Barritt GJ (2004)** Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 64: 8365-8373.

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

**Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun SC, Penn L, Barber DL, Stahl R, Carey DJ, Cheung JY, Miller BA (2006)** TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1146-C1159.

**Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003)** Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112: 293-301.

**Zhang Z, Okawa H, Wang Y, Liman ER (2005)** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J Biol Chem* 280: 39185-39192.

**Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS (2003)** The receptors for Mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266.

**Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL (2003)** Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of corti. *J Neurophysiol* 90: 444-455.

**Zhu MX (2005)** Multiple roles of calmodulin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the functional regulation of TRPchannels. *Pflugers Arch* 451: 105-115.

**Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR (2002)** Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82: 1755-1764.

## 7 ANHANG

### 7.1 Lebenslauf

### 7.2 Publikationen und Kongressbeiträge

#### *Publikationen*

Trost TM, Lausch EU, Fees SA, Schmitt S, Enklaar T, Reutzel D, **Brixel LR**, Schmidtke P, Maringer M, Schiffer IB, Heimerdinger CK, Hengstler JG, Fritz G, Bockamp EO, Prawitt D, Zabel BU, Spangenberg C (2005) Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 65: 840-849.

Prawitt D, **Brixel L**, Spangenberg C, Eshkind L, Heck R, Oesch F, Zabel B, Bockamp E (2004) RNAi knock-down mice: an emerging technology for post-genomic functional genetics. *Cytogenet Genome Res* 105: 412-421.

Prawitt D, Monteilh-Zoller MK, **Brixel L**, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R (2003) TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15166-15171.

**Kongressbeiträge**

**Prawitt, D, Enklaar T, Gärtner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Reutzel D, Fees S, Brixel L, Lausch E, Korzon M, Brozek I, Limon J, Pelletier J, Zabel B:** A two step imprinting defect involving CTCF binding sites results in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms'tumor. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2005 (Halle).*

**Prawitt D, Gärtner-Rupprecht B, Enklaar T, Brixel L, Reutzel D, Lausch E, Spangenberg C, Pander HJ, Zabel BU:** Description of a CDKN1C mutation in familial BWS with variable penetrance. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik / European Human Genetics Conference 2004 (München).*

**Griffin L, Eshkind L, Brixel L, Prawitt D, Van de Wetering M, Zabel B, Bockamp E:** Reversible shRNA knock-down mice. *Keystone Symposia: Diverse Roles of RNA in Gene Regulation 2004 (Breckenridge, USA).*

**Prawitt D, Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Spangenberg C, Fleig A, Zabel B, Penner R:** TRPM5 is a transient calcium-activated cation channel. *Conference of the American Society of Human Genetics 2003 (Los Angeles, USA).*

**Prawitt D, Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Spangenberg C, Fleig A, Penner R, Zabel BU:** Functional characterization of TRPM5, a transient calcium-activated cation channel. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2003 (Marburg).*

**Prawitt D, Bauer K, Philippi H, Busch J, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B:** Genomic characterization of candidate genes from a chromosomal region associated with infantile benign myoclonal epilepsy. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2002 (Leipzig).*

**Prawitt D, Enklaar T, Keller B, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B:** Chromosomal evolution of human chromosomal region 11p14-15.5 and chromosome 12. *Conference of the American Society of Human Genetics 2002 (Baltimore, USA).*

**Prawitt D, Bahn A, Enklaar T, Fees S, Hauser H, Brixel L, Spangenberg C, Quondamatteo F, Hillemann A, Herken R, Burckhardt G, Zabel B:** hOAT1, a novel organic anion transporter in kidney. *Conference of the American Society of Human Genetics 2001 (San Diego, USA).*

**Brixel LR, Enklaar T, Thesker M, Spangenberg C, Fees S, Higgins M, Zabel BU, Prawitt D:** Characterization of a novel *trp*-gene from the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik / International Congress of Human Genetics 2001 (Wien).*

**Prawitt D, Enklaar T, Brixel L, Thesker M, Langer A, Spangenberg C, Fees S, Higgins M, Weissmann B, Zabel B:** Further characterization of MTR1, a novel gene from the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and its murine homolog. *Conference of the American Society of Human Genetics 2000 (Philadelphia, USA).*

### **7.3 Danksagung**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Lili Brixel