

# **Funktionelle Charakterisierung der Kationenkanäle TRPM3 und Melastatin (TRPM1)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Chihab Klose**

Diplom-Biochemiker aus Berlin

März 2012

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Juni 2007 bis Dezember 2008 am Institut für Molekulare Pharmakologie und Zellbiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin und nach Umzug der Arbeitsgruppe von Januar 2009 bis März 2012 am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie, Universitätsklinikum Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Harteneck angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Harteneck, Universitätsklinikum Tübingen
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke, Freie Universität Berlin

Disputation am 10.09.2012

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Harteneck für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, in der ich unter ausgezeichneten Bedingungen arbeiten konnte. Ich danke ihm für die Bereitstellung meines Themas, seine gute Betreuung und die ständige Bereitschaft zu konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und wertvollen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Tübingen unter hervorragenden Bedingungen anzufertigen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Volker Haucke, dass er sich als Zweitgutachter für meine Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt hat.

Besonders danke ich Veronika Leiss für ihre Unterstützung und die Bereitschaft ihr umfassendes Wissen und viele wertvolle Tipps weitergegeben zu haben. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Isabelle Straub für die elektrophysiologische Ergänzung meiner Arbeit.

Speziell möchte ich mich bei Prajwal, Martina Lösle und Marc Riehle bedanken, die immer etwas Zeit für experimentelle Fragen und fachfremde Gespräche übrig hatten.

Großer Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei auftretenden Problemen oder Fragen.

Besonderer Dank gilt meiner Verlobten Franziska Schiele für ihre Liebe, moralische Unterstützung, Geduld und Verständnis während meiner Doktorarbeit.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht immer gefördert und unterstützt haben.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Calcium-Eintritt-Mechanismen .....	1
1.2	TRP-Kanalfamilie .....	2
1.3	TRPC-Kanal-Unterfamilie .....	5
1.4	TRPV-Kanal-Unterfamilie .....	6
1.5	TRPM-Familie.....	8
1.6	TRP-Kanal modulierende Substanzen.....	12
1.7	Funktionelle Rolle von Melanozyten .....	13
1.8	Insulinsekretion und TRP-Kanäle .....	15
1.9	Zielsetzung .....	17
<b>2</b>	<b>Materialien und Geräte.....</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien für die Zellkultur .....	18
2.1.1	Eukaryontische Zelllinien.....	18
2.1.2	Bakterienstämme .....	18
2.1.3	Medien und Medienzusätze.....	19
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.3	Enzyme .....	20
2.4	Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA .....	20
2.5	Antikörper .....	21
2.5.1	Primärantikörper.....	21
2.5.2	Sekundärantikörper .....	21
2.5.3	cDNAs und Oligonukleotide .....	22
2.6	Chemikalien.....	23
2.6.1	Allgemein .....	23
2.6.2	Reaktionskits .....	24
2.7	Geräte .....	24
2.7.1	Bakterien und Zellkultur .....	24
2.7.2	Calcium-Imaging und FRET-Analyse.....	25
2.7.3	Zentrifugen .....	25
2.7.4	Elektrophorese und Western Blot.....	25
2.7.5	Sonstige Geräte.....	25
2.7.6	Zur Datenanalyse und Dokumentation verwendete Software .....	26

<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	27
3.1.1	Zellkultur.....	27
3.1.2	Kultivierung von Zelllinien und Primärzellen.....	27
3.1.3	Passagieren von HEK293 Zellen für Transfektionen.....	28
3.1.4	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen.....	29
3.1.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	29
3.1.6	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten aus Kulturzellen.....	30
3.1.7	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten aus pankreatischen $\beta$ -Zellen.....	30
3.1.8	Präparation von Membranproteinen aus Kulturzellen.....	31
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.2.1	Verfahren zur gerichteten Mutagenese.....	31
3.2.2	RNA-Isolierung und RT-PCR.....	32
3.2.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.....	34
3.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.2.5	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	35
3.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	35
3.2.7	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und Total-RNA.....	36
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.3.1	Kolorimetrischer Nachweis von Proteinen: Bicinchoninsäure (BCA) -Assay ..	37
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	37
3.3.3	Tank-Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.....	38
3.3.4	Färbung von Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S.....	38
3.3.5	Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	39
3.4	Imaging-Techniken.....	40
3.4.1	Fluoreszenz Imaging Plate Reader (FLIPR) Assay.....	40
3.4.2	Fluorometrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	42
3.4.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	44
3.4.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	46
3.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten.....	47
3.5	Tierexperimentelles Arbeiten.....	48
3.5.1	Tierhaltung.....	48
3.5.2	Tierzucht.....	48
3.5.3	Genotypisierung der TRPM3- und TRPM1- <i>Knockout</i> -Mäuse.....	49

3.5.4	Isolation von pankreatischen $\beta$ -Zellen aus Maus .....	49
3.5.5	Extraktion von Proteinen aus Organen.....	50
3.5.6	Herstellung von Paraffinschnitten fixierter Gewebe für die Licht- und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	50
3.5.7	Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung von Pankreasgewebe .....	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.1	Charakterisierung von TRPM1 in Melanozyten .....	53
4.1.1	Nachweis der Proteinexpression von TRPM1 in Melanozyten.....	53
4.1.2	Einfluss einer Melaninüberexpression auf die Kanalproteine TRPM1 und TRPM2 in Melanozyten-Zelllinien .....	54
4.1.3	Wirkung von LPS auf TRPM1 und TRPM2 in Melanozyten .....	58
4.2	Charakterisierung von TRPM1- <i>Knockout</i> - und TRPM3- <i>Knockout</i> -Mauslinien	61
4.2.1	Genotypisierung mittels PCR-Reaktion .....	61
4.2.2	Analyse einer TRPM1- <i>Knockout</i> - sowie einer TRPM3- <i>Knockout</i> -Mauslinie mittels Western Blot.....	63
4.2.3	Analyse der TRPM1- sowie TRPM3-Expression in Langerhans-Inseln mittels Western Blot.....	65
4.2.4	Nachweis von TRPM3 in Insulin-sezernierenden $\beta$ -Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz .....	67
4.2.5	Charakterisierung einer TRPM3- <i>Knockout</i> -Mauslinie mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	70
4.2.6	Sequenzanalyse der durch RT-PCR erhaltenen Amplifikate von TRPM3 .....	71
4.3	Generierung und Charakterisierung der TRPM3-Deletionsmutante im heterologen Expressionssystem .....	72
4.3.1	Subzelluläre Lokalisation und Verteilung von TRPM3-Wildtyp und TRPM3-Deletionsmutante.....	73
4.3.2	Bildung von Heteromeren zwischen TRPM3-Wildtyp und -Deletionsmutante	74
4.3.3	Funktionelle Analyse der TRPM3-Deletionsmutante .....	76
4.4	Identifizierung eines selektiven TRPM3-Kanalblockers .....	77
4.4.1	Biochemische und funktionelle Charakterisierung von stabil-TRP-Kanal-exprimierenden Zelllinien zur Identifikation eines selektiven Blockers.....	78
4.4.2	Effekte von Fenamaten auf TRPM3 und andere Mitglieder der TRP-Kanalfamilie .....	80

4.4.3	Charakterisierung von Mefenaminsäure als selektiver TRPM3-Kanalblocker mit Hilfe der fluorometrischen Einzelzell-Calcium-Messung.....	85
4.4.4	Charakterisierung von Mefenaminsäure als selektiven TRPM3-Kanalblocker mit Hilfe von Ganz-Zell-Aufnahmen.....	86
4.4.5	pH-Abhängigkeit der Inhibition von Mefenaminsäure .....	88
4.4.6	Effekte von Mefenaminsäure als selektiver TRPM3-Blocker auf Insulin-sezernierende Zellen.....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>129</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
A/T	Ammoniumchlorid/Tyrosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cDNA	zur mRNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>copy DNA</i> )
CFP	cyanfluoreszierendes Protein ( <i>cyan fluorescent protein</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
FBS	fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FLIPR	Fluoreszent-Imaging-Plate-Reader
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glukose
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie ( <i>Human Embryonic Kidney 293</i> )
HEPES	Hydroxyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HMBA	Hexamethylenbisacetamid
HRPO	Merrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )

IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration (Konzentration eines Inhibitors, die zu einer halbmaximalen Inhibition führt)
Ig	Immunglobulin
INS-1E	Ratten-Insulinoma-Zelllinie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB	Bakterienmedium nach Luria-Bertani
M	Mol pro Liter
Mef	Mefenaminsäure
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
nA	Nanoampere
Nif	Nifedipin
nm	Nanometer
NSAIDs	nicht-steroidale, anti-inflammatorische Wirkstoffe
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
pKa	Säurekonstante
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PregS	Pregnenolonsulfat
RL	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin-Kinase
RT-PC	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfat</i> )
SEM	Fehler des Mittelwerts ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
Sph	D-Erythro-Sphingosin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tolbut	Tolbutamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
TRP	Transient Receptor Potential
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheiten ( <i>units</i> )
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )

## 1 Einleitung

### 1.1 Calcium-Eintritt-Mechanismen

Als ubiquitär vorkommendes Signalmolekül vermittelt Calcium physiologische Stimuli durch direkte Bindung von Calcium an Zielproteine oder an Effektoren. Neben extrazellulären Funktionen wie z.B. bei der Blutgerinnung reguliert Calcium als intrazelluläres Signalmolekül zahlreiche physiologische Prozesse. Von der Befruchtung, über verschiedene Embryonalstadien bis hin zur Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose ist Calcium als Signalmolekül beteiligt (Berridge *et al.*, 2000; Berridge *et al.*, 2003). Ebenso spielt intrazelluläres Calcium  $[Ca^{2+}]_i$  eine wichtige Rolle bei der Transmitterfreisetzung (Spafford & Zamponi, 2003), der Muskelkontraktion (Ebashi, 1972) und der Gentranskription (Berridge *et al.*, 2000). Für eine Signalgebung kann Calcium sowohl aus der extrazellulären Flüssigkeit in die Zelle gelangen als auch aus internen Calciumspeichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) im Muskel freigesetzt werden. Dabei ist die Triebkraft der elektrochemische  $Ca^{2+}$ -Gradient. So beträgt die freie zytosolische Calciumkonzentration im Ruhezustand ca. 10 - 100 nM, während in der extrazellulären Flüssigkeit, dem ER und dem SR eine 10.000-fach höhere Konzentration von ca. 1 - 2,5 mM vorliegt. Die Erhaltung der niedrigen zytosolischen  $[Ca^{2+}]_i$  und das Aufrechterhalten der internen Speicher besitzen eine wichtige homeostatische Funktion. Dieses Gleichgewicht wird durch die Aktivität von Energie-abhängigen Pumpen, Austauschern und Puffern ( $Ca^{2+}$ -bindende Proteine) in der Plasmamembran bzw. Membran der Organellen reguliert (Berridge *et al.*, 2003). Vier unterschiedliche Mechanismen sind für diesen Prozess verantwortlich: die Plasmamembran- $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA), der  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX), SERCA und der mitochondriale Uniporter (Volpe *et al.*, 1990; Blaustein & Lederer, 1999; Hussain & Inesi, 1999). Diese Mechanismen haben unterschiedliche Schwellenwerte für ihre Aktivitäten. Diesen Prozessen, die zu einer verminderten  $[Ca^{2+}]_i$  führen, wirken unterschiedliche Prozesse, Calciumeinstrom über die Plasmamembran und Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern entgegen.

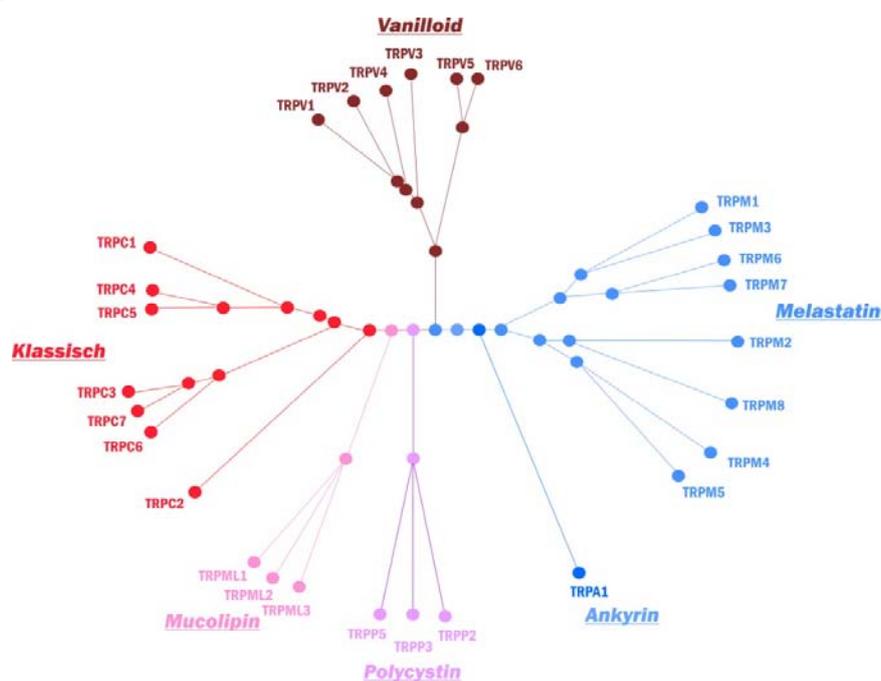
Die Regulation der Calciumfreisetzung erfolgt über die Liganden-abhängigen Ionenkanäle der beiden Organellen, Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) -Rezeptoren bzw. Ryanodin (RY) -Rezeptoren. Beide Kanäle sind Calcium-sensitiv und tragen zu einem schnellen Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration während ihrer Aktivierung bei. Die Bindung von  $Ca^{2+}$ -Ionen an den

IP<sub>3</sub>-Kanal erhöht die Sensitivität des Rezeptors für IP<sub>3</sub>, der biphasisch reagiert. Hierbei wirken geringe Calciumkonzentrationen aktivierend. Höhere Calciumkonzentrationen, wie sie unmittelbar nach der Freisetzung in der Zelle vorliegen, wirken dagegen, durch Herabsetzen der Affinität von IP<sub>3</sub> zu seinem Rezeptor, hemmend. Verschiedene Calcium-permeable Kanäle können den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum über die Plasmamembran vermitteln. Die bekanntesten Ionenkanäle sind die spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (*voltage-operated channels*, VOCs) von denen P/Q- und N-, R-, T-, L-Typen existieren und in erregbaren Zellen exprimiert werden (Catterall *et al.*, 2005). Ein Spannungssensor, der eine Veränderung des elektrischen Membranpotentials wahrnimmt, reagiert mit einer Konformationsänderung und führt zur Öffnung des Kanals. Weitere Ca<sup>2+</sup>-permeable Kanäle sind ligandengesteuerte Kanäle wie die rezeptorgesteuerten Kanäle (*receptor-operated channels*, ROCs), die sich als Antwort auf verschiedene externe Liganden durch Bindung an eine spezifische Ligandenbindungsstelle öffnen. Dabei wird zwischen metabotropen Rezeptoren, die eine Signaltransduktion über einen G-Protein-gekoppelten *Second-Messenger*-Weg vermitteln und ionotropen Rezeptoren, die durch direkte Änderung des Membranpotentials ein rasches Signal weiterleiten, unterschieden. Ein Beispiel für einen ionotropen Rezeptor ist der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptor (NMDAR), der wie die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR1-mGluR8) auf den Agonisten Glutamat reagiert. Zudem gehören *Second Messenger Operated Channels* (SMOCs), die durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert werden, zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Hierzu zählen u.a. die durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kanälen, die in sensorischen Systemen zu finden sind (Craven & Zagotta, 2006). Zusätzlich zu den deutlich definierten Kanalöffnungsmechanismen gibt es weitere Kanaltypen, die sensitiv auf eine Reihe verschiedener Stimuli wie Temperatur, pH-Änderung, Osmolarität und mechanische Reize reagieren. Viele dieser Kanäle gehören zu der großen Familie der Transient Receptor Potential (TRP) Protein Ionenkanalfamilie, die an der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt sind (Harteneck *et al.*, 2000; Nilius & Voets, 2004; Vennekens *et al.*, 2008; Gees *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

## 1.2 TRP-Kanalfamilie

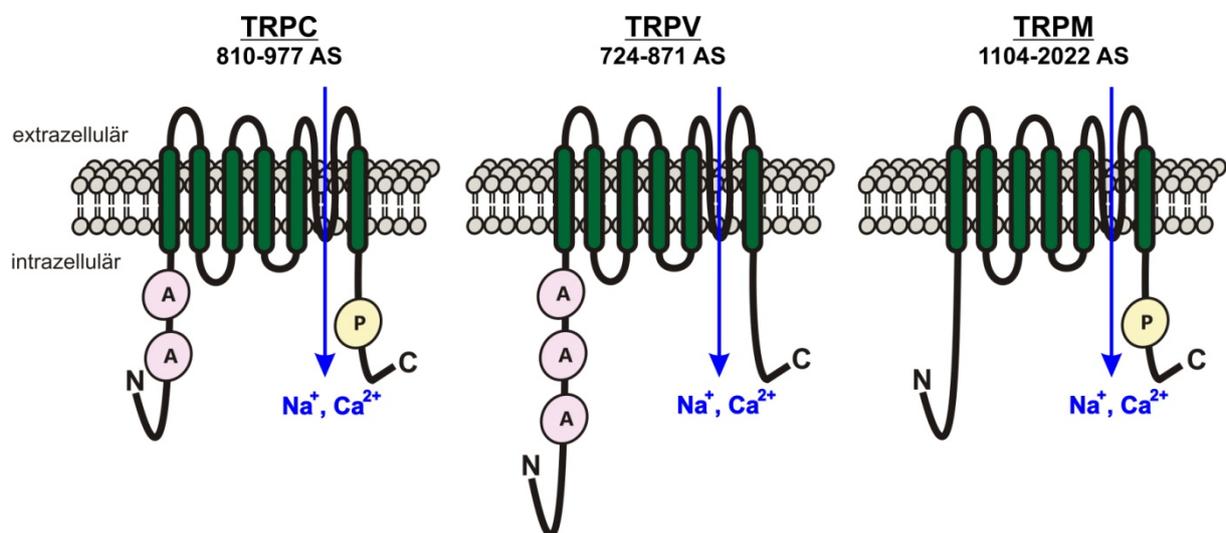
Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle bilden eine heterogene Superfamilie von Ionenkanälen. Sie besitzen eine große Diversität in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften sowie ihren spezifischen Aktivierungsmechanismen. Die

Identifizierung und Klonierung des ersten TRP-Proteins im Jahr 1989 geht auf Rubin und Montell zurück (Montell & Rubin, 1989). Der dort beschriebene Kanal ist ein Kationenkanal, der an der Phototransduktion in *Drosophila melanogaster* beteiligt ist, in dem er einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in *Drosophila* Photorezeptoren als Antwort auf eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Aktivierung vermittelt (Montell, 1989). Seit der Identifizierung von *Drosophila*-TRP wurde eine große Anzahl homologer Proteine kloniert, die eine Superfamilie von nicht-selektiven Kationenkanälen bildet. Die Mitglieder der TRP-Kanal-Superfamilie besitzen sechs putative Transmembrandomänen, mit einer Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment und weisen intrazelluläre C- sowie N-Termini auf. Die einzelnen Klassen unterscheiden sich anhand ihrer Sequenzhomologien und Permeabilitäten für Kationen (Clapham *et al.*, 2005). Basierend auf Sequenzhomologien und Genomanalysen wurden drei Gruppen von TRP-Kanälen identifiziert TRPC (C für *classic*/klassisch oder kanonisch), TRPV (V für *Vanilloid receptor-like*), TRPM (M für *Melastatin receptor-like*) (Harteneck *et al.*, 2000; Montell, 2005). Zusätzlich wurden weitere verwandte Kanalproteinfamilien aufgrund funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten als TRP-Kanäle klassifiziert (siehe Abb. 1-1.), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polycystin) sowie TRPML (Mucolipin) (Montell, 2005). Die bislang identifizierten 28 Mitglieder der humanen TRP-Kanalfamilie sind Kationenkanäle, die größtenteils permeabel für monovalente und divalente Kationen sind und in einer großen Anzahl von unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert werden.



**Abb. 1-1. Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Ionenkanal-Superfamilie (angelehnt an Gees *et al.*, 2003).** Untereinander weisen die einzelnen Familien klare Sequenzcharakteristika auf, die zwischen den Familien deutlich geringer sind.

Als charakteristisches Strukturelement weisen TRPC- und TRPM-Proteine C-terminal eine Prolin-reiche Sequenz auf (siehe Abb. 1-2.). Dieses Prolin-reiche Motive dient möglicherweise als Interaktionsdomäne für PDZ-Proteine wie z.B. Homer-Proteine, die eine Funktion bei der Regulation von membranären und intrazellulären Kanälen sowie Rezeptoren besitzen (Brakeman *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 2001; Fagni *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2003). Des Weiteren verfügen einige TRP-Familien (TRPC, TRPV und TRPA1) in der N-terminal liegenden zytoplasmatischen Region über sogenannte Ankyrin-Repeat-Domänen. Diese aus 33 Aminosäuren bestehenden Domänen mit charakteristischen Sequenzmotiven, spielen eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen. Für TRPV1 wurden die Ankyrin-Repeat-Domänen als Multiligandenbindungsstelle für CaM und ATP (Lishko *et al.*, 2007) beschrieben, die die Kanalsensitivität regulieren (Clapham, 2003; Ramsey *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). Zudem besitzen die TRP-Kanäle TRPM2, TRPM6 und TRPM7 enzymatische Domänen (Cahalan, 2001; Perraud *et al.*, 2001; Drennan & Ryazanov, 2004; Chubakov *et al.*, 2005). Für TRP-Kanäle wurde beschrieben, dass sie Tetramere bilden (Hoenderop *et al.*, 2003; Erler *et al.*, 2004), dabei sind sowohl Homomerisierung als auch Heteromultimerisierung von TRP-Kanälen möglich (Hofmann *et al.*, 2002; Garcia-Sanz *et al.*, 2004; Hellwig *et al.*, 2005; Schaefer, 2005).



**Abb. 1-2. Schematische Darstellung der Mitglieder der TRP-Kanal-Superfamilie.** Gezeigt sind die Strukturcharakteristika der klassischen, Vanilloid- und Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle mit ihren sechs putativen Transmembrandomänen und ihrer Pore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Zudem sind die Positionen der TRP-typischen Ankyrin-Repeats (A), der Prolin-reichen Region (P) und der TRP-Boxen dargestellt. Die angegebenen Zahlenwerte spiegeln die minimale sowie maximale Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Unterfamilien wieder.

TRP-Kanäle spielen übergreifend eine wichtige Rolle in der sensorischen Physiologie und sind beteiligt am Sehen, Schmecken, Riechen, Tasten sowie der Thermo- und Osmosensation. Aufgrund der Beteiligung der TRP-Kanäle an diesen vielseitigen Prozessen sind Mutationen in TRP-Proteinen mit der Pathophysiologie und spezifischen Krankheiten assoziiert (Nilius, 2007).

### 1.3 TRPC-Kanal-Unterfamilie

In Säugern wurden sieben Homologe von *Drosophila* TRP identifiziert (TRPC1-TRPC7). Die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie können auf Basis von funktionellen Ähnlichkeiten und Sequenzvergleichen in vier Subfamilien klassifiziert werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7, und TRPC4/5. TRPC-Kanäle sind nicht-selektive Calcium-permeable Kationenkanäle, wobei ihre Calciumselektivität untereinander stark differiert. Mit kleinen Ausnahmen ist die Expression der TRPC-Isoformen ubiquitär (Montell *et al.*, 2002; Montell, 2005). Es wurde gezeigt, dass TRPC1 mit TRPC4 und TRPC5 (Strübing *et al.*, 2001) Heterotetramere bilden kann, die signifikant unterschiedliche Strom-Spannungskennlinien im Vergleich zu den Homotetrameren aufweisen. Zudem bilden die TRPC-Subfamilien TRPC4/5 und TRPC3/6/7 untereinander Heteromere (Goel *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Schilling & Goel, 2004). Die Aktivierung von TRPC-Kanälen erfolgt über eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-(GPCR) oder eine Rezeptor Tyrosin Kinase- (RTK) vermittelte Aktivierung von verschiedenen PLC-Isoformen. Die PLC-Aktivierung resultiert in der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) unter Bildung der *Second-Messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). **TRPC3/6/7** werden durch Diacylglycerol über einen PKC-unabhängigen Weg direkt aktiviert (Hofmann *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 1999). Für **TRPC4 und TRPC5** gibt es Hinweise, dass ihre G<sub>q/11</sub>-Protein-gekoppelte PLC-Aktivierung unabhängig von DAG initiiert, über einen anderen PLC nachgeschalteten Mediator vermittelt wird (Plant & Schaefer, 2003). **TRPC1** wurde als erstes Säugerhomolog zu *Drosophila* TRP entdeckt (Wes *et al.*, 1995) und hat eine Funktion bei der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Homeostase. TRPC1 wird als mechanosensitiver Kationenkanal beschrieben, der durch Membrandehnung aktiviert wird (Maroto *et al.*, 2005; Gottlieb *et al.*, 2008). **TRPC2** ist im Menschen ein Pseudogen, das in Mäusen eine wichtige Rolle in der Pheromondetektion in sensorischen Neuronen des Jacobson-Organs übernimmt (Yildirim & Birnbaumer, 2007). Die **TRPC3**-Kanalaktivierung ist an der Verengung der

zerebralen Arterien (Wedel *et al.*, 2003; Xi *et al.*, 2008) und der Blutgefäße in glatten Muskelzellen beteiligt (Ahmmed & Malik, 2005; Kwan *et al.*, 2007). Der **TRPC6**-Kanal ist eine wichtige Komponente der vaskulären  $\alpha_1$ -aktivierten Calcium-permeablen Kationenkanäle in glatten Muskelzellen (Inoue *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002) und essentiell für die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion und den alveolaren Gasaustausch (Weissmann *et al.*, 2006). TRPC6 wurde als essentielle Komponente der glomerulären Schlitzmembran an der Niere identifiziert, da verschiedene Mutationen im TRPC6-kodierenden Gen mit einer Ausbildung der familiären fokal-sklerosierenden Glomerulosklerose (FSGS) assoziiert sind. Diese Krankheit einer glomerulären Dysfunktion geht mit Proteinurie, Hypertension und Niereninsuffizienz einher (Reiser *et al.*, 2005; Winn *et al.*, 2006; Daskalakis & Winn, 2006; Graham *et al.*, 2007). TRPC6 ist durch das Antidepressivum Hyperforin, einem sekundären Pflanzenstoff aus Johanniskraut aktivierbar (Leuner *et al.*, 2007). Ferner vermittelt eine Thrombin-induzierte Aktivierung von TRPC6 einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Thrombozyten (Haddock *et al.*, 2002).

#### 1.4 TRPV-Kanal-Unterfamilie

Die TRPV-Unterfamilie wurde nach dem Vanilloid-Rezeptor 1 (Caterina *et al.*, 1997) benannt und besteht aus sechs Mitgliedern, die auf Basis ihrer Sequenzhomologie, Funktion und  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität in zwei Gruppen gegliedert wurden: TRPV1-4 und TRPV5/6 (Wu *et al.*, 2010). Die Strukturen der Kanäle der TRPV-Familie enthalten intrazelluläre N-terminale Ankyrinrepeats, gängige Protein-Interaktionsmotive, die eine Kanaltetramerbildung fördern (Erler *et al.*, 2004; Gaudet, 2008a; Gaudet, 2008b; Gaudet, 2009) und die Kanalaktivität regulieren. TRPV1-4 sind nicht-selektive Kationenkanäle, die durch verschiedene intrazelluläre Signale wie  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM und Phosphoinositiden moduliert werden (Zhu, 2005; Rohacs & Nilius, 2007). Sie werden u.a. in den schmerzempfindlichen Neuronen des Hinterwurzelganglions (*dorsal root ganglion*, DRG) von Säugern exprimiert und gehören zu den thermosensitiven TRP-Kanälen, da sie neben unterschiedlichen chemischen Stimuli auch in verschiedenen Temperaturbereichen aktivierbar sind (Nilius *et al.*, 2003b; Nilius *et al.*, 2004; Vennekens *et al.*, 2008; Vriens *et al.*, 2009). Ihre Expression konnte auch in mehreren nicht neuronalen Zelltypen nachgewiesen werden (Hayes *et al.*, 2000; Vennekens *et al.*, 2008). Die Aktivierung von TRPV1 ist spannungsabhängig und kann durch das Vanilloid Capsaicin, dem Inhaltsstoff der Chillischote sowie Resiniferatoxin (RTX), Temperaturen

>42 °C und pH-Änderungen (pH 5 - 6) induziert werden (Caterina *et al.*, 1997). Im Pankreas wurde gezeigt, dass TRPV1 an der Sekretion des Neurokinins Substanz P beteiligt ist, das die Erweiterung der Blutgefäße und eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand bewirkt (Nathan *et al.*, 2001). Auch TRPV2 ist ein Hitze-aktivierbarer Kanal, der jedoch bei höheren noxischen Temperaturen >52 °C (Caterina *et al.*, 1999) aktiviert wird. TRPV2 wurde zudem als Mechanosensor in vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben, der durch Dehnung aktivierbar ist (Muraki *et al.*, 2003; Beech *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TRPV2 von großer Wichtigkeit in der angeborenen Immunantwort ist (Link *et al.*, 2010). TRPV3 wird bei Temperaturen zwischen (30 – 33 °C), von Campher, Thymol, Carvacrol und Eugenol aktiviert (Peier *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Moqrich *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006a). Auch TRPV4 zeigt eine Aktivierbarkeit durch Temperaturen >24 °C und ist deshalb bei Körpertemperatur konstitutiv aktiv. Weitere aktivierende Stimuli von TRPV4 sind Scher-Stress, Zunahme des Zellvolumens (Strotmann *et al.*, 2000), Anandamide, Arachidonsäure und 4 $\alpha$ -PDD (Watanabe *et al.*, 2002a; Watanabe *et al.*, 2002b; Watanabe *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2003b; Nilius *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass TRPV4 eine Rolle bei der Thermoregulation über epidermale Keratinozyten spielt (Chung *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004). Als mechanisch und osmotisch induzierbarer Nozizeptor spielt TRPV4 eine wichtige Rolle in DRGs und TGs (Alessandri-Haber *et al.*, 2003; Liedtke *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003). Zudem ist der Hypotonizität-aktivierbare Kanal an der Regulation der epithelialen Permeabilität über transzelluläre und parazelluläre Signalwege beteiligt (Reiter *et al.*, 2006). **TRPV5** und **TRPV6** sind die einzigen Mitglieder der TRPV-Familie mit einer hohen Selektivität für Ca<sup>2+</sup>-Ionen. TRPV5 und TRPV6 können sowohl Homomere als auch Heteromere bilden (Hoenderop *et al.*, 2003). Beide Kanäle sind konstitutiv aktiv und essentiell für die Calciumreabsorption in der Niere (TRPV5) sowie die Calciumabsorption im Darm (TRPV6). Die Expression beider Kanäle wird auf transkriptionaler Ebene durch 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reguliert (den Dekker *et al.*, 2003; Nijenhuis *et al.*, 2003a; Nijenhuis *et al.*, 2003b; Hoenderop *et al.*, 2005).

## 1.5 TRPM-Familie

Die TRPM-Unterfamilie in Säugern umfasst acht Mitglieder und wird basierend auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz in vier Hauptgruppen unterteilt TRPM1/3, TRPM4/5 und TRPM6/7 sowie TRPM2/8, die nur geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Harteneck, 2005). Die TRPM-Unterfamilie wurde nach dem ersten identifizierten Mitglied Melastatin benannt, das bei einem vergleichenden Screen zwischen benignen und malignen transformierten Melanozyten identifiziert wurde (Duncan *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1998; Deeds *et al.*, 2000). Die Calciumpermeabilität in der TRPM-Familie reicht von impermeabel für Calcium (TRPM4/5) zu hoch Calcium-permeabel (TRPM3/6/7). TRPM-Proteine besitzen C-terminal eine TRP-Domäne, aber im Gegensatz zu TRPCs und TRPVs keine Ankyrin-Repeats am N-Terminus. Der N-Terminus ist aber gegenüber den anderen Familien verlängert und weist eine lange TRPM-homologe Region mit ungefähr 700 Aminosäuren auf, deren biologische Funktion unbekannt ist. Der C-Terminus kann in zwei Regionen unterteilt werden, in eine *coiled-coil*-Domäne und eine variable Region. Darüber hinaus sind die Ionenkanalstrukturen von TRPM2, TRPM6 und TRPM7 C-terminal mit einer enzymatisch aktiven Proteindomäne verbunden (Wu *et al.*, 2010).

Geringere Expressionslevel von **TRPM1** (Melastatin) in malignen weisen im Gegensatz zu benignen Melanoma-Zelllinien auf eine Tumorsuppressor-Funktion dieses Kanalproteins hin. Metastasierenden Melanoma-Zellen fehlt das Vollängentranskript, während weiterhin verschiedene kürzere TRPM1-Transkripte detektierbar sind (Duncan *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass TRPM1 einen konstitutiv aktiven nicht-selektiven Kationenkanal bildet (Duncan *et al.*, 1998). Über funktionelle Eigenschaften und zelluläre Funktionen von TRPM1 ist bislang wenig bekannt. TRPM1 ist das Produkt eines komplexen Gens, welches mindestens 31 Exons mit jeweils 58 kb umfasst (Oancea *et al.*, 2009). Für TRPM1 existieren verschiedene Isoformen, die durch mRNA-Spleißen entstehen (Hunter *et al.*, 1998; Fang & Setaluri, 2000). Analysen von mRNA zeigten mindestens fünf Ionenkanal-bildende Isoformen von TRPM1 in humanen Melanozyten, Melanoma-Zellen, Gehirn und der Retina (Oancea *et al.*, 2009). Die Transkription der individuellen mRNA-Spezies hängt dabei von der jeweiligen Melanoma-Zelllinie und dem Stand der Differenzierung ab. In Melanozyten ist TRPM1 vorwiegend in intrazellulären, vesikulären Strukturen lokalisiert und vermutlich an der Bildung bzw. dem Transport von Melanin beteiligt, da ein *Knockdown* von TRPM1 die Menge der Melaninpigmente reduzierte (Oancea *et al.*, 2009; Devi *et al.*, 2009). Auch das Fehlen von TRPM1 in der Haut von

Pferden mit Appaloosa Flecken spricht für eine Rolle von TRPM1 in der Melanogenese (Bellone *et al.*, 2008). TRPM1 scheint auch eine Funktion im Sehprozess einzunehmen, da durch molekulare, immunhistochemische und elektrophysiologische Methoden von Maus- und Makaken-Retinas gezeigt werden konnte, dass TRPM1 in der inneren, retinalen Kernschicht angereichert ist (Morgans *et al.*, 2009) und als ein mit dem metabotropen Glutamat-Rezeptor 6 (Nakajima *et al.*, 2009) gekoppelter Kationenkanal in ON-Bipolarzellen der Stäbchen vorliegt (Koike *et al.*, 2010). TRPM1 ist essentiell für die normale Antwort in ON-Bipolarzellen und damit verantwortlich für die Signalübertragung vom Photorezeptor zu den ON-Bipolarzellen. Der ON-Signalweg des visuellen Systems detektiert eine Erhöhung der Lichtintensität. ERGs von TRPM1-defizienten Mäusen zeigten eine normale a-Welle aber keine b-Welle, was auf einen Verlust der durch ON-Bipolarzellen vermittelten Transmission innerhalb der Retina hinweist (Morgans *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009). Auch in von Appaloosa-Pferden aufgenommene ERGs war ein Fehlen der b-Welle nachweisbar. Patch-Clamp-Untersuchungen von Bipolarzellen von TRPM1-defizienten Mausretinas zeigten eine Aufhebung chemisch stimulierter Lichtantworten der ON-Bipolarzellen von Stäbchen und dramatische Veränderungen der Antworten der ON-Bipolarzellen von Zapfen. Zudem sind Mutationen in humanem TRPM1 mit der kongenitalen, stationären Nachtblindheit (CSNB) verbunden (Audo *et al.*, 2009; van Genderen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010).

Das **TRPM2**-Protein bildet einen nicht-selektiven Kationenkanal, welches C-terminal eine enzymatisch aktive ADP-Ribose Pyrophosphatase-Domäne aufweist (Cahalan, 2001; Perraud *et al.*, 2001; Perraud *et al.*, 2003). Eine hohe TRPM2-Expression liegt in den Immunzellen des Gehirns, den Mikroglia vor, ist aber auch in unterschiedlichen peripheren Zelltypen nachzuweisen (Kraft *et al.*, 2004). TRPM2 wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert und fungiert als Sensor für den zellulären Redoxstatus. Eine Aktivierung kann zu Apoptose und Zelltod führen, während eine Inhibition des Kanals eine neuroprotektive Wirkung besitzt (Kuhn *et al.*, 2005; McNulty & Fonfria, 2005; Zhang *et al.*, 2006). TRPM2 wurde als lysosomaler, intrazellulärer Kationenkanal und als Temperatur-regulierter Redox-Sensor beschrieben (Togashi *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2009; Bari *et al.*, 2009), der vermutlich an der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose beteiligt ist (Hara *et al.*, 2002; Wehage *et al.*, 2002). In humanen Monozyten konnte für TRPM2 eine Lipopolysaccharid-induzierte Hochregulation der TRPM2-Expression gezeigt werden, die mit einer Zeit-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration einherging. Die Autoren

beschrieben zudem eine Beteiligung des TRPM2-Kanals an der Lipopolysaccharid-induzierten Zytokinproduktion (Wehrhahn *et al.*, 2010).

**TRPM3** besitzt den größten Verwandtschaftsgrad zu TRPM1 und bildet einen konstitutiv aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen nicht-selektiven Kationenkanal mit einer nahlinearen Stromspannungskurve im heterolog exprimierenden System (Grimm *et al.*, 2003). TRPM3 wird in verschiedenen Geweben und dabei vorwiegend im Plexus des Gehirns, der Hypophyse, der Niere, dem Auge und dem Pankreas exprimiert (Grimm *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003a; Oberwinkler *et al.*, 2005; Fonfria *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde eine TRPM3-Expression in kontraktile und proliferierenden vaskulären, glatten Muskelzellen beschrieben (Naylor *et al.*, 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass TRPM3 durch das Sphingolipid *D-Erythro*-Sphingosin (SPH), den beiden Sphingosin-Analoga Dihydro-*D-Erythro*-Sphingosin (DHS) und *N,N*-Dimethyl-*D-Erythro*-Sphingosin (DMS), sowie einer verminderten extrazellulären Osmolarität durch das Anschwellen der Zellen aktiviert wird (Grimm *et al.*, 2003; Grimm *et al.*, 2005).

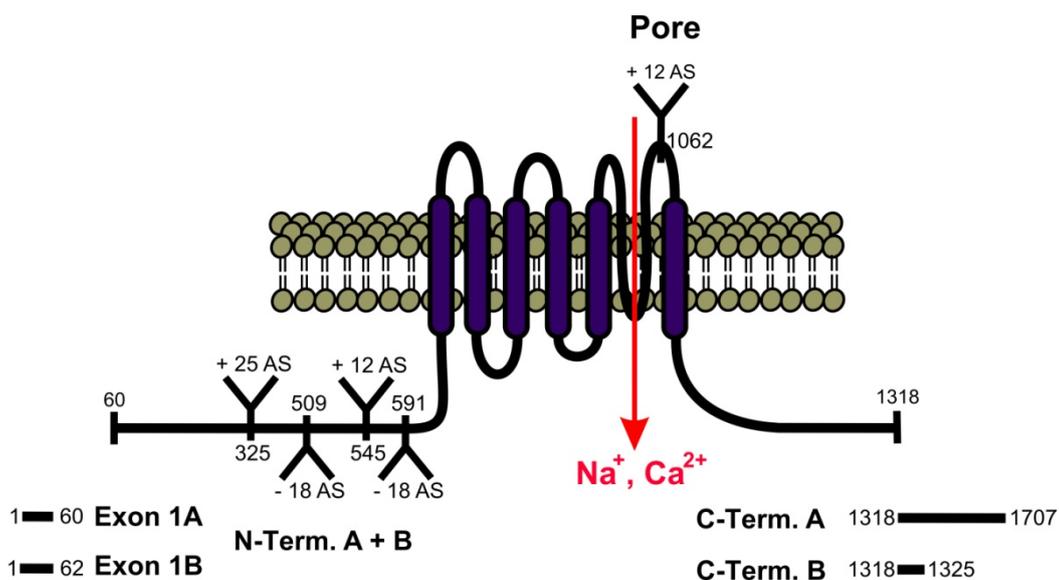


Abb. 1-3. Darstellung der durch Spleißen möglichen TRPM3-Varianten.

Als weitere Aktivatoren des TRPM3-Proteins wurden Nifedipin und das in Säugern endogen gebildete Neurosteroid Pregnenolonsulfat beschrieben (Wagner *et al.*, 2008). Die Funktion von TRPM3 in der Niere ist kaum charakterisiert, jedoch spricht die Aktivierung durch Hypotonizität für eine Rolle von TRPM3 in der renalen Osmo-Homeostase (Grimm *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003a; Grimm *et al.*, 2005). Eine Aktivierung von in pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiertes TRPM3 durch Pregnenolonsulfat steigert die Glukose-induzierte Insulinsekretion (Wagner *et al.*, 2008). Außerdem zeigten High Resolution Gen-Arrays, dass das TRPM3-Gen als Kandidat für das Kabuki-Syndrom, eines kongenitalen, mentalen

Retardations-Syndroms in Frage kommt (Kuniba *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Die Transkription von TRPM3 führt durch alternatives Spleißen ähnlich wie bei TRPM1 zu einer Vielzahl von unterschiedlichen mRNA-Spezies (siehe Abb. 1-3.), die sich deutlich in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden (Grimm *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003a; Oberwinkler *et al.*, 2005). Die Spleißvariante von TRPM3, die sich nur durch 12 AS in ihrer Porenregion unterscheidet, zeigte signifikante Unterschiede in ihren Kanaleigenschaften verglichen mit der üblicherweise vorkommenden TRPM3-Variante (Oberwinkler *et al.*, 2005). Dabei ist die Variante mit dem Poreneinschub kaum permeabel für divalente Kationen, während TRPM3 durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ist, jedoch durch extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Ionen inhibiert wird. Beide Varianten zeigen einen konstitutiv aktiven, gleichgerichteten Auswärtsstrom, der ähnlich wie die Kanäle TRPM6 und TRPM7 durch intrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen geblockt werden kann. Eine weitere Variante mit einem kürzeren Carboxyterminus TRPM3<sub>1325</sub> vermittelt einen spontanen nicht-selektiven Kationenstrom und zeigt  $\text{Mg}^{2+}$ -Permeabilität. In Anwesenheit von extrazellulären Gadolinium-Ionen ( $\text{Gd}^{3+}$ ) oder Lanthanum-Ionen ( $\text{La}^{3+}$ ) kann die Kanalaktivität blockiert werden.

**TRPM4-** und **TRPM5-**Kanäle stellen Calcium-aktivierte Natriumkanäle (monovalent-selektiv) dar, die impermeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  sind und eine Depolarisation der Plasmamembran vermitteln (Launay *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2003; Prawitt *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2003a). TRPM4 ist möglicherweise an der Regulation der zerebralen Durchblutung beteiligt (Reading & Brayden, 2007), während für TRPM5 eine Beteiligung an der Geschmackstransduktion (bitter, süß, sauer) vermutet wird, da er in den Geschmacksknospen der Zunge nachgewiesen wurde (Launay *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003).

**TRPM6** ist permeabel für Magnesium-Ionen und wichtig für die  $\text{Mg}^{2+}$ -Homeostase und Reabsorption in Niere und Darm (Schlingmann *et al.*, 2002; Voets *et al.*, 2004b; Schlingmann & Gudermann, 2005).

**TRPM7** ist für verschiedene divalente Kationen permeabel und verantwortlich für die Aufnahme dieser Spurenelemente (Monteilh-Zoller *et al.*, 2003).

**TRPM8** zeigt eine hohe Expression in Schmerz- und Temperatur-sensitiven Neuronen (Tsavalier *et al.*, 2001; McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002) und fungiert als Thermosensor für Kälte in sensorischen Neuronen. TRPM8 wird durch kalte Temperaturen (8 – 28 °C) und durch Substanzen wie Icilin und Menthol aktiviert, die ein Kältegefühl vermitteln (Voets *et al.*, 2004a; Dhaka *et al.*, 2006).

## 1.6 TRP-Kanal modulierende Substanzen

Sowohl die physiologische als auch die pathophysiologische Funktion und pharmakologische Regulation vieler TRP-Kanäle ist bislang unklar. Der Einsatz kleiner Moleküle als Wirkstoffe für eine pharmakologische Modulation zur Charakterisierung von TRP-Kanalfunktionen bildet daher ein interessantes Feld für die Therapie und Grundlagenforschung. Gegenwärtig sind jedoch nur wenige potente und selektive pharmakologische Wirkstoffe bekannt, die die TRP-Kanalaktivität modulieren. Bei der Erforschung von Ionenkanälen wie den TRP-Kanälen werden Kanal-permeierende divalente und Kanal-blockierende trivalente Kationen zur Charakterisierung der Ionenselektivität sowie den Permeationseigenschaften verwendet. Der Einsatz von Lanthanum- ( $\text{La}^{3+}$ ) und Gadolinium-Ionen ( $\text{Gd}^{3+}$ ) als Ionenkanalblocker erlaubt sowohl die Charakterisierung von endogenen Calciumeintrittsmechanismen in nativen Zellen als auch von rekombinanten TRP-Kanalproteinen im heterologen Zellsystem (Harteneck *et al.*, 2011). Es konnte u.a. gezeigt werden, dass die meisten Mitglieder der TRPC-Kanalfamilie in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  blockiert werden, während TRPC4 und TRPC5 (Jung *et al.*, 2003) stimuliert werden. Auch innerhalb der TRPV-Kanalfamilie werden die Aktivitäten durch  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  unterschiedlich moduliert. TRPV2, TRPV4, TRPV5 und TRPV6 zeigen einen inhibierenden und TRPV1 einen stimulierenden Effekt (Harteneck *et al.*, 2011). Zudem werden die Proteine TRPM3 und TRPM8 durch Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Gadoliniumchlorid blockiert (Harteneck *et al.*, 2011). Aufgrund ihrer variierender Modulation der TRP-Aktivitäten und ihrer nicht-selektiven TRP-Kanal-übergreifenden Wirkung, fanden zunächst chemische Verbindungen wie SK&F 96365, 2-Aminoethoxydiphenylborat (Bootman *et al.*, 2002), N-(p-Amylzinnamoyl)anthranilsäure (Harteneck *et al.*, 2007) und Clotrimazol als TRP-Kanalblocker Anwendung. Diesen Substanzen wurden bereits modulierende Wirkungen auf Calciumeinstrommechanismen nachgewiesen. So wurde SK&F 96365 als Inhibitor von Rezeptor-vermittelten und *Store-Operated* Calciumkanälen (SOCs) beschrieben (Merritt *et al.*, 1990) und gelegentlich für die Charakterisierung von TRP-Kanälen eingesetzt. 2-APB wurde als Blocker intrazellulärer Calciumfreisetzungsmechanismen beschrieben (Bootman *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005), während ACA und Clotrimazol als TRPM2-Kanalblocker charakterisiert wurden (Kraft *et al.*, 2006; Harteneck *et al.*, 2007). In der Arbeitsgruppe durchgeführte Analysen der Effekte dieser Substanzen in initialen Experimenten führten zu dem Ergebnis, dass Clotrimazol, SK&F 96365, ACA und 2-APB verschiedene TRP-Kanäle mit vergleichbarer Wirksamkeit blockieren und somit als übergreifende TRP-Kanalblocker klassifiziert werden konnten.

Darüber hinaus wurde aus der Substanzklasse der Fenamate bereits Flufenaminsäure als nicht-selektiver TRP-Kanalblocker klassifiziert (Tesfai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003b; Guinamard *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Guilbert *et al.*, 2009). Daneben wurde für Mefenaminsäure, Tolfenaminsäure, Flufenaminsäure, Nifluminsäure, Meclofenaminsäure und DCDPC (3'-5-dichlorodiphenylamin-2-carboxylat) gezeigt, dass sie in der Lage sind eine Vielzahl verschiedener Ionenkanäle und Enzyme zu modulieren (Gögelein *et al.*, 1990; Kankaanranta & Moilanen, 1995; Vietri *et al.*, 2000; Guinamard *et al.*, 2004; Dvorzhak, 2008; Habjan & Vandenberg, 2009). Fenamate sind am Stickstoff aromatisch substituierte Anthranilsäurederivate und eine wichtige Gruppe von klinisch eingesetzten, nicht-steroidalen, antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs). Wie für alle NSAIDs wird auch für Mefenaminsäure diskutiert, dass sie in die Biosynthese von Prostaglandinen, den wichtigen Mediatoren von Schmerz- und Entzündungsprozessen eingreift. Mefenaminsäure und Tolfenaminsäure werden in verschiedenen Ländern therapeutisch genutzt.

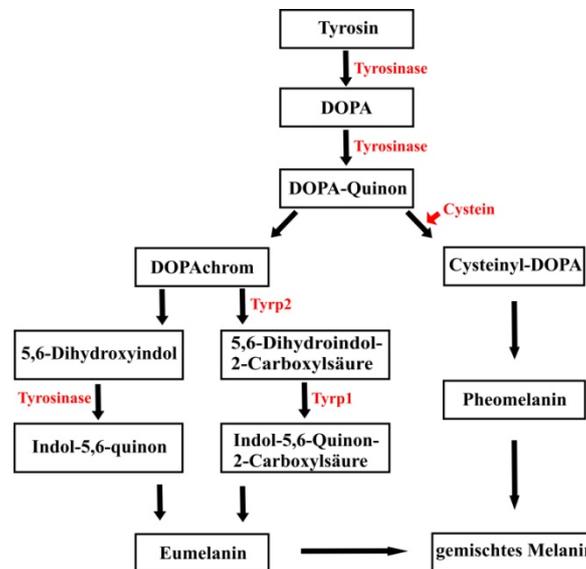
### 1.7 Funktionelle Rolle von Melanozyten

Melanozyten liegen im Stratum basale (Basalzellschicht) der Epidermis und bilden Melanin, das an die umgebenden Keratinozyten abgegeben wird. Das Vorkommen von Melanin ist im Unterhautgewebe und im Pigmentepithel der Netzhaut, im Innenohr sowie in den Haaren nachweisbar. Aufgrund der breiten Verteilung in der humanen Epidermis und der Tatsache, dass unter UV-Einwirkung eine Aktivierung der Melanozyten mit vermehrter Melanosomenbildung und -abgabe (Hautbräunung) kommt, wird eine Funktion der schwarzbraunen Pigmentierung im UV-Schutz gesehen. Melanin stellt dementsprechend eine Licht-absorbierende Substanz dar und agiert als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies wie  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die bei UV-Bestrahlung der Haut erzeugt werden. Durch seine Fähigkeit Calcium zu binden, schützt Melanin Melanozyten und Keratinozyten gegen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Strangbrüche (Hoogduijn *et al.*, 2004).

Die Melanogenese erfolgt aus der Aminosäure Tyrosin in Melanosomen (siehe Abb. 1-4.), die aus dem Golgi-Apparat abgeschnürten und reifenden Vesikeln entstehen. Das Melanin wird dabei durch das Enzym Tyrosinase nach UV-Aktivierung unter Mitwirkung der Tyrosinase-related Proteine 1 und 2 (Tyrp1 und Tyrp2) synthetisiert (Kobayashi *et al.*, 1994).

Zudem spielt die Haut eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen mikrobiologische Einwanderung. Es gibt Hinweise darauf, dass Melanozyten, Melanosomen und Melanin die

Proliferation von mikrobiellen Pathogenen in der Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) inhibieren. So wird vermutet, dass ROS und andere während der Melanogenese produzierte Substanzen eine starke antibakterielle Aktivität besitzen (Mackintosh, 2001).



**Abb. 1-4. Melanin-Syntheseweg.** Aus Tyrosin wird über verschiedene Intermediate Melanin gebildet. Hierzu sind die aktivierte Tyrosinase sowie die Tyrosinase-related-Proteine 1 und 2 (Tyrp1 und Tyrp2) erforderlich.

Melanosomen besitzen lysosomale Strukturen (Le Poole *et al.*, 1993a; Schraermeyer, 1995; Kim & Choi, 1998) und üben ähnliche Funktionen aus (Schraermeyer *et al.*, 1999). Bereits beschrieben wurde für Melanozyten, dass sie über die phagozytotische und enzymatische Maschinerie für die Antigenpräsentation verfügen (Le Poole *et al.*, 1993b) sowie immunologische Oberflächenmarker exprimieren (Lu *et al.*, 2002) und damit Teil des Immunabwehrsystems der Haut sind. Zusätzlich wurde der Nachweis geführt, dass der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4), der an der Abwehr mikrobieller Pathogene beteiligt ist, funktionell in humanen Melanozyten exprimiert wird (Ahn *et al.*, 2008). Dieser interagiert mit Lipopolysacchariden (LPS), Komponenten der Zellwand von gramnegativen Bakterien, in Monozyten und Makrophagen des Menschen und löst eine inflammatorische Antwort aus. Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist ein von Zellen häufig genutzter Mechanismus, die Erzeugung immunspezifischer Mediatoren zu initiieren.

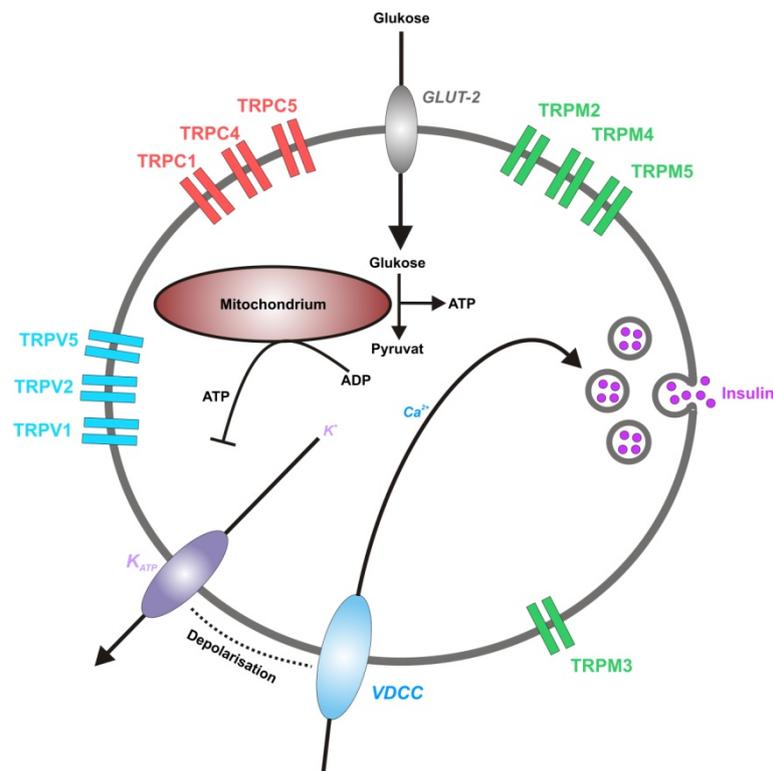
Der Einsatz unterschiedlicher Substanzen ermöglicht eine Beeinflussung der Melaninproduktion, indem sie an der Melanogenese beteiligte Gene regulieren. So kann die Melaninkonzentration in Melanozyten bei Inkubation mit Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ ) und L-Tyrosin signifikant gesteigert werden (Hoogduijn *et al.*, 2004). Auch eine Behandlung von humanen Melanomazellen mit Hexamethylenbisacetamid (HMBA) kann *in vitro* morphologische Polydendritenbildung und eine funktionelle Differenzierung induzieren.

Dabei werden die Enzyme Tyrosinase und Tyrosinase-related Protein-1 (Tyrp1) herunterreguliert, während das Tyrosinase-related Protein 2 (Tyrp2) hochreguliert wird (Fang *et al.*, 2001). Die durch verschiedene Substanzen vermittelte Beeinflussung der Regulation der Melaninproduktion eröffnet eine Möglichkeit zur Charakterisierung der funktionellen Rolle von TRP-Kanälen in Melanozyten.

## 1.8 Insulinsekretion und TRP-Kanäle

Die Glukose-stimulierte Insulinsekretion ist ein zentraler Prozess zur Aufrechterhaltung der Glukosehomeostase und wird von den in Langerhans-Inseln lokalisierten pankreatischen  $\beta$ -Zellen vermittelt. Die Insulinfreisetzung aus  $\beta$ -Zellen wird durch die Glukose-induzierte Oszillation im Membranpotential und der zytosolischen Calciumkonzentration genau reguliert. Bei der Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen handelt es sich um einen komplexen Prozess, dessen Triebkraft eine elektrische Aktivität und Oszillation der intrazellulären Calciumkonzentration ist, die durch ein Gleichgewicht von hyperpolarisierenden  $K^+$ - und depolarisierenden  $Ca^{2+}$ -Strömen bedingt ist. Glukose tritt über den GLUT-2-Transporter in die  $\beta$ -Zelle ein, der gleichzeitig als Glukose-Sensor fungiert. Der anschließende Metabolismus von Glukose führt zu einem erhöhten ATP/ADP-Quotienten, das zum Schließen ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanäle führt. In Konsequenz depolarisiert das Membranpotential. Dieser Mechanismus resultiert in der Aktivierung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen und einem darauffolgenden Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Zusammen mit der daraus resultierenden Calcium-induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung wird die Exozytose von Insulin-haltigen Vesikeln vermittelt (siehe Abb. 1-5.). Calcium stimuliert die Insulinsekretion durch Regulation des Ankoppelns und einer beginnenden Fusion von sekretorischen Granula mit der Plasmamembran, einem SNARE-Protein-vermittelten Prozess (Coolsoul *et al.*, 2012).

Eine Beeinträchtigung der Regulation des Insulinfreisetzungsmechanismus kann zu einer Hypoglykämie, die eine Glukose-Intoleranz und Diabetes verursacht oder zu einer Hyperglykämie führen (LeRoith, 2002).



**Abb. 1-5. TRP-Kanäle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und schematische Darstellung der Glukose-induzierten Insulinsekretion.** Angelehnt an Nilius & Voets (2008).

Neben den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und ATP-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanälen wurde bislang eine Vielzahl von TRP-Kanälen identifiziert, die in primären pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Insulin-sezernierenden Zelllinien exprimiert werden (siehe Abb. 1-5). Neben dem TRPM3-Kanal wurden TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPV1, TRPV2, TRPV5, TRPM2, TRPM4 und TRPM5 für Insulin-sezernierende Zellen beschrieben (Colsoul *et al.*, 2012). Ihre physiologische Rolle in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist Gegenstand aktueller Forschung, jedoch ist u.a. bereits bekannt, dass eine Aktivierung von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen zu einer erhöhten Insulinsekretion führt (Wagner *et al.*, 2008). Zudem wurde für TRPM5 eine Beteiligung an der Insulinsekretion nachgewiesen, indem er an der Aufrechterhaltung der Frequenz der Oszillation beteiligt ist (Liman, 2010). Für TRPM4 gibt es keinen Hinweis auf eine Beteiligung an der Insulinsekretion, da isolierte primäre  $\beta$ -Zellen von TRPM4<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Beeinträchtigung in der Insulinsekretion aufweisen und in TRPM4-defizienten Tieren kein Defekt in der Glukosetoleranz nachweisbar war (Vennekens & Nilius, 2007).

Eine funktionelle Charakterisierung von TRP-Proteinen ist für das Verständnis ihrer physiologischen Bedeutung in pankreatischen Inseln wichtig und ermöglicht eine pharmakologische Beeinflussung zur Therapie von metabolischen Stoffwechselstörungen.

## 1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung des molekularen Verständnisses der Mitglieder der TRPM-Kanal-Unterfamilie TRPM1 und TRPM3 sowie ihrer physiologischen Rollen in Melanozyten (TRPM1) und im murinen Pankreas (TRPM3). Zu diesem Zweck sollten folgende Teilprojekte bearbeitet werden.

- 1) Funktionelle Untersuchung von Melastatin (TRPM1) in unterschiedlichen Melanozyten-Zelllinien hinsichtlich einer Funktion bei der Immunabwehr und bei der Melaninsynthese
- 2) Charakterisierung einer TRPM1- und einer TRPM3-*Knockout*-Mauslinie für eine *in vivo* Charakterisierung beider Proteine, da bislang nur wenige funktionelle Daten von TRPM1- bzw. TRPM3-*Knockout*-Mäusen existieren
- 3) Untersuchung der Expression von TRPM1 und TRPM3 in verschiedenen Geweben
- 4) Identifikation eines selektiven TRPM3-Inhibitors, um über ein adäquates pharmakologisches Werkzeug zur Untersuchung von TRPM3 zu verfügen
- 5) Charakterisierung eines potentiellen TRPM3-selektiven Blockers im heterolog exprimierenden Expressionssystem und seine Funktion in *in vitro*-Versuchen an murinen Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen

## 2 Materialien und Geräte

### 2.1 Materialien für die Zellkultur

#### 2.1.1 Eukaryontische Zelllinien

- HEK293: humane, embryonale Nierenzellen (adhärent, epithelial)
- INS-1E: Ratte, Insulinoma Zellen
- SK-Mel19: humane, dermale Melanomzellen (adhärent, epithelial)
- SK-Mel23: humane, dermale Melanomzellen (adhärent, epithelial)
- SK-Mel28: humane, dermale Melanomzellen (adhärent, epithelial)
- A-375: humane, dermale Melanomzellen (adhärent, epithelial)
- M186: humane, dermale Melanomzellen (adhärent, epithelial)

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Tetrazyklin-induzierbaren, stabil transfizierten, TRP-Kanal-exprimierenden HEK293 Zelllinien wie T-REx<sup>®</sup>-293 (hsTRPV4, rrTRPC6) und Flp-In<sup>®</sup> T-REx<sup>®</sup>-293 (HA-hsTRPC6, hsTRPM2, hsTRPC4B-V5-HIS, TRPM3A, TRPM3B) gearbeitet, die im Rahmen früherer Projekte im Labor generiert wurden. Die INS-1E Zelllinie wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. Dr. Susanne Ullrich (Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die HEK293 Zellen und die dermalen Melanomzelllinien wurden von den Firmen ATCC (LGC-Standards, Teddington, UK) und ECACC (Health Protection Agency Culture Collection, Salisbury, UK) bezogen.

#### 2.1.2 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10/P3 (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
- *E. coli* NEB Turbo competent (New England Biolabs GmbH, Frankfurt)

### 2.1.3 Medien und Medienzusätze

- Blasticidin (InvivoGen, San Diego, USA)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Chemie GmbH, Taufkirchen)
- DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- DMEM Low Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Fetales Rinder Serum (FBS) Standard Qualität (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Fetales Rinder Serum (FBS) Tetracycline negativ (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- HEPES Buffer Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Hygromycin B (InvivoGen, San Diego, USA)
- L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- MEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Natrium-Pyruvat Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Opti-MEM<sup>®</sup> I (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
- PBS Dulbecco's mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- PBS (-/-) Dulbecco's ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Poly-L-Lysin (Biochrom AG, Berlin)
- RPMI 1640 Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Zeocin (InvivoGen, San Diego, USA)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser (Ø 24 mm, # 0) für die Mikroskopie (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
- Filterpapier Whatman<sup>®</sup> 3MM (Biometra GmbH, Göttingen)
- Röntgenfilm Fuji-Film Super RX (Fuji-Film Europe GmbH, Düsseldorf)
- Sterilfilter Whatman<sup>®</sup>, Porengröße 0,2 µm (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

- Whatman<sup>®</sup> Protran<sup>®</sup> BA 85 Nitrocellulose Transfer Membrane (Sigma-Chemie GmbH, Taufkirchen)

Sämtliche sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Kryoröhrchen, Schalen sowie Kulturflaschen für die Bakterien- und Zellkultur, wurden von den Firmen Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden) erworben.

### **2.3 Enzyme**

- Restriktionsenzyme (New England Biolabs GmbH, Frankfurt bzw. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Kollagenase FALGPA Hydrolysis activity 2,0 U/mg (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- TrypLE<sup>®</sup> Express (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
- Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Phusion<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)

### **2.4 Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA**

- 1 kb DNA Ladder (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- GeneRuler<sup>®</sup> 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- Precision Plus Protein<sup>®</sup> Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Qx Alignment Marker 5 bp - 2 kb (Qiagen GmbH, Hilden)
- Qx DNA Size Marker Fx174/Hae III (Qiagen GmbH, Hilden)

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Eine Übersicht der, in den Western Blots und Immunfluoreszenzen verwendeten, Primärantikörper ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2-1. Auflistung der verwendeten Primärantikörper**

Antikörper	Antigen	Typ	Hersteller-Firma
anti-TRPM1	TRPM1	Kaninchen polyklonal	C. Harteneck, Berlin
anti-TRPM2	TRPM2	Kaninchen polyklonal	C. Harteneck, Berlin
anti-TRPM3b	TRPM3B	Kaninchen polyklonal	C. Harteneck, Berlin
anti-TRPV4	TRPV4	Kaninchen polyklonal	C. Harteneck, Berlin
anti-TRPC6	TRPC6	Kaninchen Polyclonal	Millipore GmbH, Schwabach
anti-PARP	PARP-Volllänge (116 kDa) PARP-Fragment (89 kDa)	Maus monoklonal	Becton Dickenson GmbH, Heidelberg
anti-TLR-4	TLR-4	Kaninchen Polyclonal	Abcam pic, Cambridge, UK
anti-Insulin	Insulin	Meerschwein Polyklonal	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

### 2.5.2 Sekundärantikörper

Für die Immundetektion mittels Western Blot wurden Sekundärantikörper der Firma GE-Healthcare GmbH, München verwendet, die mit HRPO (horseradish peroxidase; Meerrettich Peroxidase) konjugiert waren. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5 % Milchpulver in TBS eingesetzt.

- Anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment
- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Fluorophor-konjugierte Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 (Dianova GmbH, Hamburg) eingesetzt.

- Cy3 Ziege anti-Meerschwein IgG (H+L)
- Cy2 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)

### 2.5.3 cDNAs und Oligonukleotide

Die cDNAs von TRPM3-YFP und TRPV1-YFP wurden im Rahmen früherer Projekte in der Arbeitsgruppe kloniert und standen daher zur Verfügung. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen.

**Tabelle 2-2. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide**

Primer Nr.	Sequenz	Beschreibung
NSKMM-517	5'-GACATTTCCCAGGAGCTGAATCACAATtccag cTTGGAGTTCAAGAACAAGACGACATGC-3'	HsM3-YFP mit Knockout-Deletion/Seq
NSKMM-518	5'-GCATGTCGTCTTTGTTCTTGAAGTCCAAGctg gaATTGTGATTCAGCTCCTGGGAAATGTC-3'	HsM3-YFP mit Knockout-Deletion/Seq
NSKOM-32	5'-GGCATGTGTAGCTACCACAG-3'	TIGM-TG0115-M1-Primer-32 PCR Genotyping
NSKOM-31	5'-GCATAGTCCATGGACCTAGC-3'	TIGM-TG0115-M1-Primer-31 PCR Genotyping
NSKOM-Neo3a	5'- GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3	TIGM-TG0115-M1-Primer-Neo3a PCR Genotyping
NSKOM-03	5'-CTGTGGCTGCCAAGCACCGTGAC-3'	TIGM-TG0116-M3-Primer-03 PCR Genotyping
NSKOM-06	5'-CCTCAAGACTCCCAATCCAAG-3'	TIGM-TG0116-M3-Primer-06 PCR Genotyping
NSKM3-P4	5'-GGAGAGGACGGAAGACAAC-3'	Primer über del Exon (1884-1902, D47MBL55)
NSKM3-P5	5'-GAACTCCAAGCTGAGAATTGAAG-3'	Primer über del Exon (2412-2434, D47MBL55)
NSKRT-1356	5'-GATGGTGTGGGCCGTCCTCA-3'	Primer über del Exon (1982-2001, D47MBL55)
NSKRT-1357	5'-GGCCAGCGCTCCATCTTACTAAC-3'	Primer über del Exon (2738-2761, D47MBL55)

## 2.6 Chemikalien

### 2.6.1 Allgemein

- 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didekensäureester (LC Laboratories, Woburn, MA, USA)
- DCDPC (Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt)
- Entwickler für Röntgenfilme Citroline 2000 (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach)
- Eosin Y 5 wt % Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Ethidiumbromidlösung 1 % (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
- Fixierer für Röntgenfilme Adefofix Part 1 (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach)
- Fixierer für Röntgenfilme Adefofix Part 2 (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach)
- Fluo-4/AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Fura-2-AM (MoBiTec GmbH, Göttingen)
- Hyperforin (Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe, Germany)
- Pluronic F-127 (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- ProTaq Mount Fluor (BIOCYC GmbH & Co.KG, Luckenwalde)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Protease Inhibitor Cocktail Complete<sup>®</sup>-EDTA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Roti-Mount Fluor Care DAPI (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
- Staurosporin (QBiogene-ALEXIS GmbH, Grünberg)

Weitere nicht aufgeführte Chemikalien zur Herstellung von Puffern sowie Aktivatoren und Inhibitoren wurden in der Reinheitsstufe pro Analyse von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), VWR International GmbH (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

## 2.6.2 Reaktionskits

- Amersham ECL Advance Detection Kit (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)
- Finnzymes Phusion<sup>®</sup> PCR-Kit (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)
- Omniscript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- PCR-Kit TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Plasmid DNA Purification Kit Nucleobond<sup>®</sup> AX (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren)
- Plasmid DNA Purification Kit NucleoSpin<sup>®</sup> Robot-8 Plasmid (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren)
- QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraktion Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- LigaFast<sup>®</sup> Rapid DNA Ligation System (Promega GmbH, Mannheim)

## 2.7 Geräte

### 2.7.1 Bakterien und Zellkultur

- Begasungs-Brutschrank InCu-Safe (Sanyo GmbH, München)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank Heraeus Function Line (Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte)
- Bühler Schüttelinkubator SM 30B / TH30 (MS Laborgeräte GmbH, Dielheim)
- Cryo-1 °C Freezing Containers (Nalgene<sup>®</sup>, Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte)
- Dampfsterilisator (TECNOMARA Deutschland GmbH, Fernwald)
- Gefrierschränke (-80 °C) VIP Series<sup>®</sup> Sanyo GmbH, München)
- Lichtmikroskop DIAPHOT TMD (Nikon Corporation, Düsseldorf)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte)
- Stickstofftank MVE XLC-511 zur dauerhaften Lagerung von Zellen (German Cryo GmbH, Jüchen)

### 2.7.2 Calcium-Imaging und FRET-Analyse

- CCD-Kamera Sensicam (TILL Photonics GmbH, München)
- Imaging Control Unit ICU (TILL Photonics GmbH, München)
- Mikroskop Axiovert S 100 (Carl-Zeiss AG, Oberkochen)
- Polychrome V (TILL Photonics GmbH, München)
- Filterrad Wechsler Lambda 10-2 (Sutter Instrument Company, Novato, USA)
- Plan-Apochromat 63 x/1,4 Öl-Immersion-Objektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen)

### 2.7.3 Zentrifugen

- Biofuge primo (Heraeus-Christ, Hanau)
- Kühlzentrifuge Beckmann Coulter Avanti J-26 XP (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld)
- Tisch-Kühlzentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5430 (Eppendorf AG, Hamburg)

### 2.7.4 Elektrophorese und Western Blot

- DNA-Agarose Gelkammer Sub-Cell<sup>®</sup>-GT (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Mini Protean Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell Tank-Blot (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Power Pac HC (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- QIAxcel System zur DNA-Fragment-Analyse (Qiagen GmbH, Hilden)

### 2.7.5 Sonstige Geräte

- Automatisierter Plate Washer (Denley Cellwash. Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Digitales Mikro-Osmometer (Hermann Roebling Meßtechnik, Berlin)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte GmbH, Dielheim)

- FLIPR<sup>Tetra</sup> (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA)
- Gefrierschränke (-20 °C) Premium No Frost (Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)
- Kühlschränke Bosch KSR38001E (Robert-Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe)
- Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- Luminescent Image Analyzer VersaDoc<sup>®</sup> MP-4000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Magnetrührer MR 3001 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)
- Mikroprozessor pH-Meter pH 537 (WTW GmbH, Weilheim)
- Mikroskop Axio Imager M1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- Multiplate Reader Sunrise (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Paraffin-Streckungsbad (Medax GmbH & Co.KG, Neumünster)
- Pipettier-Roboter Freedom evo (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Plattformschüttler Rotamax 120 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)
- Rollator Stuart<sup>®</sup> Roller Mixer SRT 9 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Schlitten-Mikrotom Modell Hn40 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Spectralphotometer NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Stahl-Messer für Mikrotom (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg)
- Thermocycler MJ Research PTC 200 (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg)
- Ultra-TURRAX<sup>®</sup> T8 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- Wasserbad medingen WB6 (Preiss-Daimler GmbH, Dresden)

#### **2.7.6 Zur Datenanalyse und Dokumentation verwendete Software**

- Quantity One zur Gel-Dokumentation (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- QIAxcel ScreenGel zur Agarosegel-Dokumentation (Qiagen GmbH, Hilden)
- TILLvISION für das Calcium-Imaging (TILL Photonics GmbH, München)
- LSM 510 Version 3.2 SP2 zur Bild-Dokumentation (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- Magelan 6.6 für den Plattenreader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Zellkultur

Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Adhärenz wachsende Zelllinien wurden in entsprechenden Medien in Zellkulturflaschen im Begasungsbrutschrank bei 5 % bzw. 7 % CO<sub>2</sub>, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Zellkultur wurden ausschließlich steril verpackte Einmalartikel oder unter Benutzung eines Autoklaven bei 121 °C und 1 bar gespanntem Überdruck mit Wasserdampf-sterilisierten Materialien verwendet.

##### 3.1.2 Kultivierung von Zelllinien und Primärzellen

- Kulturmedium HEK293: MEM  
10 % (v/v) FBS  
0,58 g/l L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin
- Kulturmedium T-REx<sup>®</sup>-293: DMEM High Glucose  
10 % (v/v) FBS (Tetracyclin negativ)  
0,58 g/l L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
250 µg/ml Zeocin  
5 µg/ml Blastocidin
- Kulturmedium Flp-In<sup>®</sup>T-REx<sup>®</sup>-293: DMEM High Glucose  
10 % (v/v) FBS (Tetracyclin negativ)  
0,58 g/l L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
75 µg/ml Zeocin  
15 µg/ml Blastocidin

- Kulturmedium INS-1E: RPMI 1640  
10 % (v/v) FBS  
0,58 g/l L-Glutamin  
10 mM HEPES  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
10 mM Natrium-Pyruvat  
1,0 mM β-Mercaptoethanol
  
- Kulturmedium Pankreas-Zellen: RPMI 1640  
10 %<sup>®</sup> (v/v) FBS  
0,58 g/l L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Die Kultivierung der Zelllinien HEK293 (humane embryonale Nierenzelllinie), T-REx<sup>®</sup>-293 und Flp-In<sup>®</sup>T-REx<sup>®</sup>-293 und INS-1E (Insulinoma Zellen) erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 20 ml Kulturmedium. Die primären Pankreaszellen wurden nach der Präparation auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in Ø 35 mm Kulturschalen ausgesetzt und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank kultiviert.

### 3.1.3 Passagieren von HEK293 Zellen für Transfektionen

Zum Passagieren konfluent gewachsener Zellen wurde nach Absaugen des alten Nährmediums einmal mit PBS (-/-) gewaschen und nach Entfernen des PBS für 3 min mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen der Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Zellkulturflasche gelöst und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit 10 ml frischem Nährmedium vereinzelt. Für Transfektionen wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschten Zelldichten durch entsprechende Verdünnung eingestellt. Anschließend wurden 75.000 - 100.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Ø 35 mm Zellkulturschalen auf Deckgläschen ausgesät.

Für das Routine-Passagieren wurden die Zellen abhängig von der verwendeten Zelllinie in einer Verdünnung von 1:5 – 1:20 in einer neuen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Das Passagieren der Zellen erfolgte in der Regel alle 3 - 5 Tage.

### 3.1.4 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Für subzelluläre Lokalisationsstudien, Western Blot Analysen und funktionelle Untersuchungen wurden HEK293 Zellen mit verschiedenen cDNA-Konstrukten der TRP-Familie transient transfiziert. Die Transfektion von HEK293 Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des nicht-toxischen Mehrkomponenten-Transfektionsreagenzes auf Lipidbasis FuGENE<sup>®</sup> HD. Die Methode basiert auf der Bildung eines Lipid-DNA-Komplexes und nutzt die Fähigkeit von Zellen Lipide durch Endocytose aufzunehmen. Für Transfektionen wurden  $7 \times 10^4$  HEK293 Zellen auf Glasplättchen in Zellkulturschalen ( $\varnothing$  35 mm) ausgesät und für 48 h inkubiert. Die Erzeugung des homogenen DNA-Lipid-Komplexes erfolgte durch Zugabe von 0,5 - 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in 200  $\mu$ l serumfreies Medium (Opti-MEM<sup>®</sup> I). Anschließend wurden 3  $\mu$ l FuGENE<sup>®</sup> HD pro  $\mu$ g DNA langsam in das Reaktionsgefäß eingebracht und gründlich gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch tröpfchenweise Zugabe unter sanftem Schwenken der Zellkulturschale gleichmäßig in das Nährmedium verteilt. Die Untersuchungen der Zellen wurden 1 - 3 Tage nach der Transfektion durchgeführt.

### 3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

- Einfrieremedium      10 % (v/v) DMSO  
                                 90 % (v/v) FBS

Zur Erstellung von Kulturen für die Langzeitlagerung wurden Zellen von zwei konfluent bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen unter Verwendung von Trypsin/EDTA (siehe 3.1.3) abgelöst und durch mehrfaches Pipettieren in frischem Medium vereinzelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 310 x g für 10 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 5 ml FBS resuspendiert. Im Anschluss wurden 5 ml Einfrieremedium zugegeben, vorsichtig durchmischt und 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Das schonende Einfrieren der Zellen erfolgte mit Hilfe des Cryo-1 °C Freezing Containers über Nacht bei -80 °C. Nach dem Einfriervorgang wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und gelagert.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C unter ständigem leichtem Schütteln aufgetaut und die Zellsuspension in 20 ml vorgewärmtes Kulturmedium in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Nach 8 h wurden die Zellen mit frischem Medium versehen, um das noch vorhandene DMSO zu entfernen.

### 3.1.6 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten aus Kulturzellen

- Lysepuffer :
  - 10 mM Imidazol, pH 6,8
  - 300 mM KCl
  - 300 mM Saccharose
  - 2 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM EGTA
  - 1 mM NaF
  - 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>
  - 1 mM NaVO<sub>3</sub>
  - 0,2 % (v/v) Triton X-100
  - 1 x Complete<sup>®</sup>-EDTA

Transfizierte HEK293 Zellen wurde nach dem Absaugen des Nährmediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS durch Zugabe von Lysepuffer lysiert. Dazu wurde eine konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale mit 1 ml Lysepuffer versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde zur Entfernung unlöslicher Bestandteile und Zelltrümmer mit 20.800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (siehe 3.3.1) ermittelt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.1.7 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten aus pankreatischen $\beta$ -Zellen

- SDS-Lysepuffer:
  - 21 mM Tris-HCl, pH 8,3
  - 0,67 % SDS
  - 238 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - 0,2 mM PMSF

Pankreatische Inseln wurden nach der Isolierung aus Mäusen unter einem Lichtmikroskop gezählt und in SDS-Lysepuffer für 10 min inkubiert. Hierzu wurden 0,8  $\mu$ l Lysepuffer pro Insel gegeben. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 94 °C denaturiert und mit

1,5 x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden bis zur Western Blot Analyse bei -20 °C gelagert.

### 3.1.8 Präparation von Membranproteinen aus Kulturzellen

- Membranpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
2 mM DTT  
1 mM EDTA  
Protease Inhibitor Cocktail (0,5 ml auf 10 ml)

Für die Präparation von Membranproteinen wurden native Zellen oder transfizierte HEK293 Zellen von zwei konfluent bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mittels Zellschaber in Kulturmedium abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 1 x mit PBS für 5 min und 800 x g bei RT gewaschen und das Zellpellet in 3 ml Membranpuffer aufgenommen. Das Aufschließen der Zellen erfolgte mechanisch durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier Ultraschall-Gerät. Nachfolgend wurde das Zellhomogenat zur Entfernung der Zellkerne für 2 min bei 800 x g und RT ohne Bremse, um das Aufwirbeln von Zelltrümmern zu vermeiden, zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Membranen durch Zentrifugation bei 20.800 x g und 4 °C für 90 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet in 500 µl Membranpuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA-Assays (siehe 3.3.1) ermittelt. Für nachfolgende Western Blot Analysen wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Verfahren zur gerichteten Mutagenese

Bei der molekularbiologischen Methode der gerichteten Mutagenese wird ein synthetisches Oligonukleotid (Primer), das eine definierte Mutation trägt, für eine *in vitro*-Neusynthese von DNA an den komplementären Strang der Matrizen-DNA angelagert. Eine DNA-Polymerase generiert eine Kopie der DNA, die nur in der Primer-Sequenz zu der Matrize differiert.

Mutagenesen wurden mit Hilfe des Phusion<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Hierzu wurden die Mutagenese-Ansätze entsprechend der Herstellerangaben mit den erforderlichen Primern zusammen pipettiert. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm: Initiale Denaturierung 98 °C für 30 s, 18 Zyklen je 98 °C für 10 s (Denaturierung), 68 °C für 10 s (Anlagerung) sowie 73 °C für 6 min (Polymerisation), abschließend 72 °C für 10 min (finale Polymerisation). Die Plasmidlänge von TRPM3-YFP beträgt ca. 12 kb, deshalb wurde eine Polymerisationszeit von 6 min gewählt bei einer Aktivität der DNA-Polymerase von 1 kb pro 30 s. Anschließend wurde die Ausgangs-DNA durch enzymatischen Verdau bei 37 °C für 1 h mit dem Restriktionsenzym DpnI, das nur methylierte DNA abbaut, aus dem Reaktionsansatz entfernt. Das amplifizierte Produkt wurde im Anschluss in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe 3.2.5), vermehrt und die Plasmid-DNA mittels Plasmid-DNA-Purification Kit isoliert (siehe 3.2.6). Zum Zwecke der Überprüfung wurde die isolierte Plasmid-DNA sequenziert.

### 3.2.2 RNA-Isolierung und RT-PCR

Um Genexpressionsmuster spezifischer Gen-Transkripte in Zellen zu untersuchen, können RNA-Sequenzen mit der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) in stabile cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden. Die Existenz eines Zielgens kann hiernach mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen werden.

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Maushirn auf Basis der modifizierten *Single-Step* Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987). Hierzu wurde das Gewebe direkt im Anschluss nach Entnahme vom Tier in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die RNA-Isolierung wurden 100 mg gefrorenes Hirngewebe mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert, in 1 ml Trizol lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Trizol ist ein monophasisches Gemisch aus Phenol, Guanidinthiocyanat und weiteren Komponenten, das eine Isolierung von Gesamt-RNA ermöglicht. Es erhält die Integrität der RNA durch Inaktivierung von RNAsen während der Zellyse und löst die Zellkomponenten.

Anschließend wurden 200 µl Chloroform zum Entfernen des Phenols zugegeben, gründlich gemischt und erneut für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 min und 4 °C wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol zur Fällung der RNA versetzt und gründlich gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgte eine erneute

Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zum Entfernen noch vorhandener Salze in 1 ml 75 % Ethanol bei 7.600 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet Luft-getrocknet, in 50 - 100 µl DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat, RNase Inhibitor) aufgenommen und 10 min bei 56 °C gelöst. Die Konzentration der erhaltenen Total-RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 photometrisch (siehe 3.2.7) bestimmt.

Nachfolgend wurde die RT-PCR im *Two-Step*-Verfahren durchgeführt, um optimale Reaktionsbedingungen für die verwendeten Enzyme zu erzeugen. Zunächst wurde die isolierte RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür erfolgten die RT-Reaktionen zur cDNA-Erstrangsynthese mit dem Omniscript<sup>®</sup>-RT-Kit. Die RT-Reaktionen wurden einschließlich der Kontrollen gemäß Herstellerangaben angesetzt. Sie enthielten neben Oligo-(dT)-Oligonukleotiden, die spezifisch an den Poly(A)-Schwanz eukaryontischer RNA binden und kurzen *random*-Hexaoligonukleotiden, die zufällig an RNA-Sequenzen binden auch sequenzspezifische Oligonukleotide. Die Zugabe der Reversen Transkriptase für die cDNA-Synthese erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurden die RT-Reaktionen für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Temperatur anschließend stufenweise bis 42 °C um je 1 °C für jeweils 5 min erhöht.

Die *in vitro*-Amplifikation der DNA wurde hiernach mit folgendem PCR-Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung 94 °C für 10 min; 36 Zyklen mit je 94 °C für 30 s (Denaturierung), 60 °C (T<sub>A</sub>) für 60 s (Polymerisation) sowie 72 °C für 60 s (Elongation), abschließend 72 °C für 10 min (finale Polymerisation). Die *Annealing*-Temperatur T<sub>A</sub> entspricht der optimalen Temperatur mit der die verwendeten Oligonukleotide mit dem DNA-Template hybridisieren und muss empirisch unter Einbezug der Schmelztemperatur T<sub>m</sub> ermittelt werden. Mit folgender Formel kann T<sub>A</sub> berechnet werden:

$$T_A = T_m - 5 \text{ °C} = [2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (G+C)] - 5 \text{ °C}$$

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Hilfe des QIAxcel System, einem automatisiertem, multikapillarem Gelelektrophorese System, das DNA-Fragmente analysieren kann, detektiert. Für eine nachfolgende Sequenzanalyse wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines präparativen DNA-Agarose-Gels aufgetrennt, anschließend aus der Gelmatrix isoliert (siehe 3.2.4) und sequenziert.

### 3.2.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

- 1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 8,5  
40 mM Essigsäure  
1 mM EDTA
- 6 x DNA-Ladepuffe: 10 mM Tris/HCl pH 8,0  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
30 % (v/v) Glycerin  
1 mM EDTA

Nukleinsäurestränge wurden unter Anwendung der horizontalen Agarosegelelektrophorese bei einer elektrischen Spannung von 80 V nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Konzentration der Agarose (NEEO-Ultra-Qualität) betrug entsprechend der Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,8 - 2,0 % (w/v) in 1 x TAE- (TRIS-Acetat-EDTA-) Puffer. Zum Nachweis der DNA-Fragmente wurde dem Gel der rote Phenanthridinfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer versetzt. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurenfragmenten wurde bei der elektrophoretischen Trennung stets ein Größenstandard (1 kb DNA-Leiter bzw. 50 bp Leiter) mit aufgetrennt. Zum Visualisieren der DNA-Fragmente wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung ein UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 312$  nm verwendet. Diese Wellenlänge lässt das Ethidiumbromid, das zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert, orange fluoreszieren. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennungen wurden unter UV-Licht mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System dokumentiert.

### 3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten zur Sequenzierung sowie Transformation wurden Mutageneseansätze auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und einer elektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Die DNA-Banden entsprechender Größe wurde unter Verwendung einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 312$  nm identifiziert und mittels Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wurde mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraktion Kits die DNA aus dem Gel entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert und abschließend sequenziert.

### 3.2.5 Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

- SOC-Medium: 0,5 % (w/v) Trypton  
2 % (w/v) Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Glukose
- LB<sub>Amp</sub>-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium  
50 µg/ml Ampicillin

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden zunächst kompetente *E. coli* Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und auf LB<sub>Amp</sub>-Agar kultiviert. Eine weitverbreitete Strategie, um die Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen zu erreichen, ist die Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten Zellen.

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden 50 ng Plasmid-DNA oder 5 µl PCR-Produkt mit 50 - 100 µl *E. coli* NEB Turbo kompetente Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis vorsichtig durchmischt. Die Ansätze wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s unterzogen. Unter sterilen Bedingungen wurde der Ansatz nach erfolgter Transformation mit 500 µl SOC-Medium versetzt und danach für 45 min bei 37 °C inkubiert. Für die klonale Selektion von *E. coli* Kolonien wurde im Anschluss daran 150 µl je Transformationsansatz auf eine auf 37 °C vorgewärmte, mit Ampicillin versetzte LB-Agar-Platte ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte für 12 - 16 h bei 37 °C.

### 3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

- LB<sub>Amp</sub>-Medium: 1 % (w/v) Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
86 mM NaCl  
50 µg/ml Ampicillin

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden je Transformationsansatz Kolonien, der auf LB<sub>Amp</sub>-Platten über Nacht gewachsenen, transformierten Bakterien gepickt und in mit 3 ml (für das Miniprep-Verfahren) bzw. 100 ml LB-Medium (für das Maxiprep-Verfahren) mit 50 mg/l Ampicillin versetzten, vorbereiteten sterilen 14 ml Kulturröhrchen bzw. Erlenmeyerkolben mit je einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden (15 min,

5.000 Upm) zentrifugiert und die Überstände quantitativ entfernt. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Verwendung eines Plasmid-DNA Purification Kits und wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 60 µl bzw. 300 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung der gereinigten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C. Die Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Miniprep-Verfahren erfolgte entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung des Pipettier-Roboters Freedom evo, der dementsprechend umgerüstet wurde.

### 3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und Total-RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA nach der Isolierung aus *E. coli*, sowie cDNA und Total-RNA nach Isolierung aus Mausgewebe erfolgte photometrisch in einem NanoDrop ND-1000.

Die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen wurde unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt und basieren auf der photometrischen Vermessung bei 260 nm. Enthält eine Lösung eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml, entspricht das einem Absorptionswert von 1 OD<sub>260</sub> (Optische Dichte). Mit diesem OD-Wert kann die Konzentration einer unbekanntes DNA-Lösung ermittelt werden. Bei nicht basengepaarten Nukleinsäuren, entsprechen eine Konzentration von 33 µg/ml für einzelsträngige DNA und eine Konzentration von 40 µg/ml für RNA einem Absorptionswert von 1 OD<sub>260</sub>. Proteine zeigen aufgrund der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption von 260 nm zu 280 nm dient als Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und besitzt für DNA ihr Optimum bei einem Wert von 1,8 und für RNA bei einem Wert von 2,0.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Kolorimetrischer Nachweis von Proteinen: Bicinchoninsäure (BCA) -Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der BCA-Assay verwendet. Das Verfahren wurde von Smith *et al.*, (1985) entwickelt und später von Redinbaugh & Turley (1986) an das Mikrotiterplatten-Format angepasst (Smith *et al.*, 1985; Redinbaugh & Turley, 1986). Grundlage der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  in alkalischem Milieu durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin sowie durch die Peptidbindungen. Dies ermöglicht eine Bindung des  $\text{Cu}^+$  mit dem BCA. Dabei bildet Bicinchoninsäure spezifisch mit  $\text{Cu}^+$  einen violetten Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 25  $\mu\text{l}$  einer 1:10 mit Puffer verdünnten Proteinlösung in einer Mikrotiter-Platte mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz versetzt und unter ständigem Schütteln 30 min bei 37 °C inkubiert. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte in einem Multiplate Reader gegen den verwendeten Puffer als Kontrolle. Mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden in einem Konzentrationsbereich von 0,05 – 0,5 mg Protein/ml Lösung konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### 3.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

- 1 x SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris  
192 mM Glycerin  
0,1 % (w/v) SDS

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eindimensionaler diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli in vertikaler Anordnung nach dem System der Firma Bio-Rad mit Gelen einer Größe von 82 x 72 x 1 mm (Laemmli, 1970). Auf jedes SDS-Gel wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Protein pro Vertiefung aufgetragen.

Bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese kamen Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 4 % zur Anwendung. Entsprechend den Molekulargewichten der zu trennenden Proteine wurden Trenngele in einem Konzentrationsbereich von 6 - 10 % Acrylamid gewählt.

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteingemische im Verhältnis 1:4 mit 4 x SDS-Probenpuffer Roti<sup>®</sup>-Load 1 versetzt und 10 min bei 65 °C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden je 20 µg Protein auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Für den Lauf durch das Sammelgel zum Konzentrieren der Proteinbanden wurde eine Spannung von 80 V gewählt, nach Übergang in das Trenngel wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Das relative Molekulargewicht der Proteine konnte über mitgeführte Molekulargewichtsstandards bestimmt werden. Hierbei korrelieren die relativen Mobilitäten der Proteine im SDS-Gel linear zum Logarithmus ihrer molaren Massen.

### 3.3.3 Tank-Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

- Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl  
192 mM Glycin  
20 % Methanol

Im Anschluss an die Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran. Proteine können so immobilisiert und mit der immunologischen Technik des Western Blottings nachgewiesen werden.

Das Blotting erfolgte nach dem Tank-Blot-Verfahren. Dabei wurde jeweils ein Sandwich aus SDS-Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran und puffergetränkten Filterpapieren direkt zwischen zwei Elektroden gelegt. Durch das Anlegen des elektrischen Feldes wandern die Proteine aus dem Gel, bis sie die Membran erreicht haben und dort immobilisiert haften bleiben. Der Transfer wurde in einem vertikalen Puffertank bei konstanter Spannung von 100 mA/Membran für 2 h unter Kühlung durchgeführt.

### 3.3.4 Färbung von Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S

Zur Überprüfung eines erfolgreichen elektrophoretischen Transfers von Proteinen auf die Nitrocellulosemembran, erfolgte eine Färbung der Blot-Membran mit Ponceau S (Salinovich & Montelaro, 1986). Ponceau S färbt die auf der Membran gebundenen Proteine reversibel und lässt eine anschließende Immundetektion der Proteine zu. Zudem fixiert die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure Proteine auf der Membran. Für die Färbereaktion werden die Membranen 5 – 10 min in Ponceau S-Lösung unter Schütteln bei RT inkubiert und nachfolgend der überschüssige Farbstoff zum Visualisieren der Proteinbanden mit H<sub>2</sub>O aus

der Membran gewaschen. Vor einer Immunfärbung wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

### 3.3.5 Immunchemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

- TBST-Puffer: 150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,2 % (v/v) Tween 20
- TBS-Puffer: 150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Auf eine Nitrocellulosemembran transferierte und dort immobilisierte Proteine können aufgrund ihrer Zugänglichkeit immunchemisch in einem indirekten Nachweisverfahren mit spezifischen Antikörpern detektiert werden (Hawkes *et al.*, 1982). Die Immundetektion erfolgte in vier Schritten (Blocken unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran, monospezifische Bindung eines Primärantikörpers an das Antigen, Bindung eines Enzym-konjugierten Sekundärantikörpers an den Antikörper-Antigen-Komplex, Nachweisreaktion), zwischen denen jeweils gründlich gewaschen wurde.

Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach dem Transfer und vor Beginn der Nachweisreaktion wurde die Nitrocellulosemembran mit 5 % Magermilchpulver in TBS-Puffer (Tris Buffered Saline) für 1 h abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Nitrocellulosemembran 2 x 10 min mit TBST-Puffer gewaschen, anschließend erfolgte nach erneutem Waschen mit TBS für 10 min die Inkubation für 45 min bei RT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, der als Peroxidase-Konjugat (Craven & Zagotta, 2006) vorliegt und daher eine Nachweisreaktion ermöglichte. Es wurde erneut 2 x 10 min mit TBST-Puffer und 1 x mit TBS gewaschen und nachfolgend mit ECL Advance Substrats, bei der ein Chemolumineszenzsubstrat durch die Peroxidase umgesetzt und dabei Lichtsignale erzeugt werden, nach dem Standardprotokoll des Herstellers inkubiert. Die Detektion und Dokumentation der erzeugten Lichtsignale erfolgte durch Exposition der Nitrocellulosemembran für 5 s - 10 min auf einem Röntgenfilm oder durch Einlesen mittels CCD-Kamera am Versa-Doc Luminiscent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System.

### 3.4 Imaging-Techniken

#### 3.4.1 Fluoreszenz Imaging Plate Reader (FLIPR) Assay

- Ca<sup>2+</sup>-Puffer: 140 mM NaCl  
5 mM KCl  
10 mM Glukose  
20 mM HEPES, pH 7,4  
2,5 mM Probenecid  
2 mM CaCl<sub>2</sub>
- Messpuffer: 140 mM NaCl  
5 mM KCl  
10 mM Glukose  
20 mM HEPES, pH 7,4  
2,5 mM Probenecid  
5 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,5 % DMSO

Mit Hilfe der Fluoreszenztechnik ist die Messung von Änderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration in lebenden Zellen und damit die Analyse und Quantifizierung von Calcium-sensitiven Zellprozessen möglich. Dabei kommen Calcium-sensitive Fluoreszenzindikatoren zur Anwendung. Ionen wie Calcium, die keine Autofluoreszenz besitzen, können indirekt durch Komplexbildung mit einem hochaffinen Farbstoff, der nach Ionenbindung seine Fluoreszenzeigenschaften ändert, gemessen werden. In der Zelle ist der Fluoreszenzindikator durch eine spezifische Wellenlänge anregbar. Die Detektion des daraufhin emittierten Lichts einer divergenten Wellenlänge erfolgt über einen Photodetektor. Der klassische Fluoreszenzfarbstoff wie Fluo-4 ist ein Einzel-Wellenlängen-Indikator, der eine spezifische Anregungs- und eine Emissionswellenlänge besitzt und deshalb für eine intrazelluläre Anwendung einen nur beschränkten Nutzwert zeigt. Zum einen beeinflusst ein unterschiedliches Volumen der Zellen unvorhersehbar die Intensität der Fluoreszenzemissionen und zum anderen ist es unmöglich die intrazelluläre Farbstoffkonzentration zu kontrollieren. Der Calcium-sensitive Einzel-Wellenlängen-Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 wird oftmals für Calciummessungen in *High-Throughput-Screens* von Calcium-permeablen Ionenkanälen in lebenden Zellen eingesetzt. Dazu wird der grünfluoreszierende Calciumindikator als Zellmembran-gängiger, nicht-fluoreszierender Acetoxymethylester (Fluo-4-AM) zum Beladen der Zelle verwendet. In der Zelle wird die Acetoxymethylester-Schutzgruppe durch unspezifische Esterasen abgespalten und das fluoreszierende Fluo-4 freigesetzt, das dann an freie Calciumionen binden kann. Für Fluoreszenz Imaging Plate Reader Technologie (FLIPR) Assays wurden stabil transfizierte

TRPC6-, TRPM2-, TRPM3- und TRPV4-Flip-In-TREx293 Zellen in 96-well Platten mit einer Dichte von 8.000 - 12.000 Zellen/well ausgesät und bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde die Expression von rekombinanten Proteinen durch Zugabe von Tetracyclin induziert und die Zellen, abhängig von der Zelllinie für weitere 18 - 72 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit 2 µM Fluo4-AM in CaCl<sub>2</sub>-Puffer beladen, danach zweimal mit Waschpuffer im automatisierten Platten-Wasch-System gewaschen und in ein 96-well Reader überführt. Der FLIPR<sup>Tetra</sup> verfügte über ein Diodenfeld als Anregungsquelle, einen 96-well Pipettor und ein Detektorsystem, das eine CCD-Imaging-Kamera nutzt. Zunächst erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit den Testsubstanzen. Nach Aufnahme einer Basislinie, wurden die Zellen durch die simultane Applikation ihrer spezifischen Agonisten stimuliert und die Fluoreszenzemissionen der 96 wells nach Anregung bei 488 nm bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm simultan detektiert. Für eine *Off-line* Analyse wurden die aufgenommenen Amplituden in relative Fluoreszenzen umgewandelt und die Werte aus Quadruplikaten der gleichen Platte gemittelt. Die Fähigkeit einer Substanz TRP-Kanäle zu blocken, wurde unter diesen optimierten Bedingungen wiederholt getestet. Die Antwort-Amplituden wurden aus den Fluoreszenzwerten berechnet. Die Kurven wurden durch Fitting der Funktion zu den Daten durch nicht-lineare Regression abgeleitet. Dabei ist a das Maximum, b die Bandbreite und x<sub>0</sub> der IC<sub>50</sub>-Wert.

$$f(x) = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}} \quad (\text{Formel 3-1})$$

Für die Aufstellung und den Vergleich der Rangfolge der Wirksamkeit der analysierten Fenamate wurden Konzentrationswirkungskurven von Mittelwerten aus jedem in Quadruplikaten durchgeführten Experiment im Hinblick auf einen spezifischen TRP-Kanal und einer Substanz berechnet.

### 3.4.2 Fluorometrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

- $\text{Ca}^{2+}$ -Messpuffer: 138 mM NaCl  
6 mM KCl  
1 mM  $\text{MgCl}_2$   
5,5 mM Glukose  
20 mM HEPES, pH 7,4  
2,5 mM  $\text{CaCl}_2$

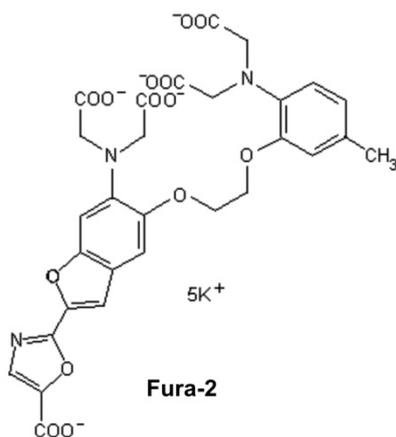
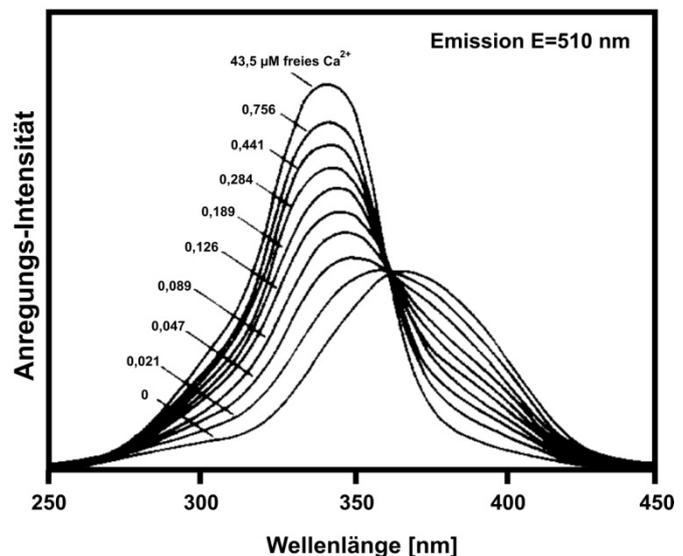
Im Gegensatz zu Einzel-Wellenlängen-Indikatoren wie Fluo-4 erlauben Dual-Wellenlängen-Indikatoren die quantitative Ratio-Fluoreszenz-Technik. Eine Besonderheit dieser Indikatoren ist das Auftreten einer Wellenlängenverschiebung im Fluoreszenzspektrum nach Bindung an ein Kation wie Calcium. Eine Verschiebung kann entweder im Anregungs- oder Emissionsspektrum auftreten. Fura-2 ist der am häufigsten verwendete ratiometrische und Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff, der intrazelluläre Calciummessungen ermöglicht und stellt ein Beispiel für einen Dual-Anregungswellenlängenfarbstoff dar (siehe Abb. 3-1. A). Fura-2 ist ein Derivat des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Durch eine Modifizierung der Carboxylgruppen mit einer Acetoxymethyl (AM) -Estergruppe ist Fura-2 ein ungeladenes und damit Zellmembran-permeables Molekül (= Fura-2-AM). Im Cytosol werden die lipophilen Blockierungsgruppen durch nicht-spezifische Esterasen abgespalten. Die Retentionszeit der dadurch entstandenen geladenen Form des Moleküls in der Zelle ist abhängig von der Fura-2-Konzentration und den Transportproteinen. Um eine unerwünschte inhomogene intrazelluläre Farbstoffverteilung in Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien durch ein Passieren intrazellulärer Membranen aufgrund zu langer Inkubationszeiten zu verhindern (Takahashi *et al.*, 1999), sollte die Fura-2-AM-Konzentration so gewählt werden, dass die cytosolischen Esterasen nicht übersättigen. Auch ein Transport von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluo-4 oder Fura-2 aus der Zelle durch in der Zellmembran lokalisierte organische Anionentransporter wie OAT-1 (organischer Anionen-Transporter Typ 1) kann durch Inhibition mit der Substanz Probenecid verhindert werden (Di Virgilio *et al.*, 1990). Sulfinpyrazon ist eine weitere Substanz, die einen Transport von Anionen durch die Zellmembran unterbindet. Insbesondere wird durch Sulfinpyrazon der Anionenkanal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, ein Mitglied der C-Subfamilie der ABC- (ATP-binding cassette-) Transporterfamilie geblockt (Diena *et al.*, 2007). Mit dem Einsatz von Sulfinpyrazon und Probenecid wird einem hohen Hintergrund während der Messung und einer schlechten Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzindikatoren entgegengetreten.

Das Anregungsmaximum von Fura-2 liegt unter Calcium-freien Bedingungen bei einer Wellenlänge von 363 nm und verschiebt sich in Calcium-gebundener Form nach 335 nm. Dabei erfolgt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Calciumkonzentration bei 335 nm und gleichzeitiger Reduktion der Fluoreszenzintensität bei 380 nm. In beiden Fällen kann die Intensität der Emissionsfluoreszenz bei 510 nm gemessen werden (siehe Abb. 3-1. B). Somit wird die Intensität der Fluoreszenz durch die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs (c), der Dicke der Zelle (d), den optischen Eigenschaften der Messapparatur (K) und der intrazellulären Calciumkonzentration bestimmt.

$$F_{340} = c * d * K * f \quad (\text{Formel 3-2})$$

Werden schnell alternierende Fluoreszenzmessungen bei den Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm ausgeführt, erhält man eine experimentell bestimmbare Größe durch Bildung der Ratio  $F_{340}/F_{380}$ , die nur von der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  abhängt. Durch  $F_{340}/F_{380}$ -Bildung der Fluoreszenzintensitäten von Calcium-gebundenem und Calcium-freiem Farbstoff kann die  $[Ca^{2+}]_i$  quantitativ ermittelt werden. Vorteil der Ratio-Bestimmung ist, dass sie unabhängig von der intrazellulären Farbstoffkonzentration und optischen Parametern ist. Auch eine Degradation des Fluoreszenzfarbstoffs durch Ausbleichen (*photobleaching*) und Unterschiede in der Anregungsintensität erfahren durch die Ratio-Technik eine Kompensation.

**A****B**

**Abb. 3-1.** (A) Strukturformel von Fura-2. (B) Anregungsspektrum von Fura-2 bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen.

Die fluorometrischen Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  in Einzelzellen erfolgten mit Hilfe des Fluoreszenzindikators Fura-2-AM bei Raumtemperatur unter Verwendung eines auf einen Monochromator basierenden Bildgebungssystems. Die Zellen wurden auf sterilen, unbeschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 24 - 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> transfiziert (siehe 3.1.4). Nach weiteren 72 h Inkubation wurden die Zellen mit 2 µM Fura-2-AM (gelöst in DMSO mit 0,01 % Pluronic F-127) für 30 min bei 37 °C in HEPES-gepufferter Standardlösung beladen. Pluronic F-127 ist ein nicht-ionischer, polyolischer, oberflächenaktiver Stoff, der eine Aufnahme der Acetoxymethylester von fluoreszierenden Ionenindikatoren mittels Dispersion in die Zellen erleichtert. Die Deckgläschen wurden anschließend kurz mit HBS-Puffer gewaschen, um den extrazellulär befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen und in eine Perfusionskammer einzuspannen. Für die Calciummessungen wurden die Fluoreszenzen alternierend bei 340 nm und 380 nm angeregt und transient transfizierte Zellen aufgrund ihrer YFP-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm identifiziert. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde die Fluoreszenz-Ratio  $F_{340}/F_{380}$  ermittelt. Die Osmolaritäten der verwendeten Lösungen wurde mit Hilfe eines digitalen Mikro-Osmometers über die Gefrierpunktanalyse bestimmt.

Abweichend von diesem Protokoll wurden aus Mäusen isolierte pankreatische  $\beta$ -Zellen 48 h nach Isolierung mit 2 µM Fura-2 (gelöst in DMSO mit 0,02 % Pluronic F-127) und dem Anionenkanal-Blocker Sulfinpyrazone durch Inkubation in RPMI 1640-Medium für 45 min bei 37 °C beladen. Vor der Calciummessung wurden die Inseln in HEPES-gepufferter Standardlösung (versetzt mit Sulfinpyrazon) für weitere 10 min gewaschen.

### 3.4.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

*In vivo* ist der Nachweis von Bindungen und Interaktionen von zwei Molekülen mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer Analyse (Siegel *et al.*, 2000) möglich. Das Prinzip der FRET-Analyse basiert auf der Fähigkeit vom angeregten Zustand eines Donor-Fluorophors strahlungsfrei Photonenenergie durch intermolekulare *longe-range*-Dipol-Dipol-Kopplung direkt auf ein benachbartes Akzeptor-Fluorophor zu übertragen, das ein gleichzeitiges Quenching der Donorfluoreszenz bedingt (Förster, 1948). Voraussetzung für den Energietransfer ist, dass Donor- und Akzeptormoleküle so gewählt werden, dass die Emissionswellenlänge des Donors mit der Anregungswellenlänge des Akzeptors überlappt.

Die Effizienz des Energietransfers  $E$  ist zusätzlich stark abhängig von der relativen Orientierung der Übergangsdipole (räumliche Orientierung) von Donor- und Akzeptor-Chromophor sowie dem Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül. Die Entfernungsabhängigkeit der FRET-Effizienz, wird über die Förster-Gleichung beschrieben.

$$E = \left( 1 + \left( \frac{r}{R_0} \right)^6 \right)^{-1} \quad (\text{Formel 3-3})$$

Der Abstand  $R_0$ , bei dem der Energietransfer 50 % beträgt, bezeichnet man als Förster Radius. Kleine Änderungen des intermolekularen Abstands  $r$  zwischen Donor und Akzeptor gehen als sechste Potenz in die FRET-Effizienz ein. Abhängig von der gewählten Kombination von Chromophoren können FRET-Effizienzen nur bis zu einem Abstand von 1 - 10 nm detektiert werden. Bei einer spezifischen Interaktion führt das Anregen des Donor-Chromophors (CFP, *cyan fluorescent protein*) zu einer Emission von Donorfluoreszenz und damit zu einer verstärkten Akzeptorfluoreszenz (YFP, *yellow fluorescent protein*) und gleichzeitiger Reduktion der Donoremission.

Die FRET-Analyse wurde nach der Akzeptor-Bleich-Methode (Siegel *et al.*, 2000) durchgeführt. Zur Quantifizierung der absoluten FRET-Effizienz zwischen Donor- und Akzeptormolekül wurde die CFP-Emission vor und nach dem selektiven Bleichen (*photobleach*) von YFP gemessen. Dabei ist der Anstieg (*dequenching*) der CFP-Emission ein direktes Maß der FRET-Effizienz  $E$  und kann nach folgender Formel berechnet werden (Cantor & Schimmel, 1980).

$$E = 1 - \left( \frac{F_{DA}}{F_D} \right) \quad (\text{Formel 3-4})$$

$F_{DA}$  ist die Donoremission vor dem Bleichen eines anwesenden Akzeptors, während  $F_D$  die Donoremission nach dem Bleichen des Akzeptors beschreibt.

Zur Bestimmung der FRET-Effizienz wurden HEK293 Zellen auf Deckgläschen aus Glas ausgesetzt und mit cDNAs der zu analysierenden Proteine im Verhältnis 2:1 Akzeptor zu Donor kotransfiziert. Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines inversen Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 63 x/1,4-Objektiv in Standard-HEPES-Puffer. Des Weiteren wurden eine Xenondampfampe als Lichtquelle, ein Monochromator, eine CCD-Kamera zur Signaldetektion und ein motorisierter Filterrad-Wechsler zum synchronen Wechseln der Bandpassfilter für CFP (475 – 505 nm) und YFP (535 - 565 nm) eingesetzt. Das cyan fluoreszierende Protein (CFP) diente als Donor und wurde bei 410 nm zur Detektion

angeregt. Das *yellow* fluoreszierende Protein (YFP) wurde als Akzeptor eingesetzt und bei 515 nm zur Detektion und bei 512 nm zum Bleichen angeregt.

### 3.4.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

- HBS-Puffer: 138 mM NaCl  
6 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
5,5 mM Glukose  
20 mM HEPES, pH 7,4  
1 mM CaCl<sub>2</sub>
- Fixierlösung: 100 % Methanol (eiskalt)
- Blockierlösung: 10 % (v/v) FBS/PBS

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) ist ein bildgebendes Verfahren, das eine hohe räumliche Auflösung von morphologischen Details auf subzellulärer Ebene ermöglicht. Dabei nutzt man den Effekt emittierten Lichts einer mittels Lasern angeregten Probe in der Fokusebene auf eine variable Lochblende (*pinhole*) zu fokussieren, das von einem dahinterliegenden Photomultiplier detektiert werden kann. Da Fokuspunkt und *pinhole* konfokal sind, d.h. in konjugierten Ebenen liegen, eliminiert die Lochblende Streulicht, das außerhalb der Fokusebene von der Probe emittiert wird. Nur Licht aus dem Fokuspunkt kann die Lochblende passieren (Pawley, 1995).

Zur Detektion der subzellulären Lokalisation heterolog exprimierter sowie nativer Proteine in unterschiedlichen Zellsystemen wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet. Dazu wurden Proteine aufgrund eines YFP-Fluoreszenzanteils oder durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Hierbei werden Proteine in fixierten Zellen bzw. Geweben über Fluorophor-gekoppelte Antikörper spezifisch sichtbar gemacht. Ein unmarkierter Primärantikörper bindet zunächst an das entsprechende Antigen. Anschließend wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper verwendet. Bei einer anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Präparate wird das Fluorophor des Sekundärantikörpers mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Durch das daraufhin emittierte Licht einer spezifischen Wellenlänge mit einer anderen Fluoreszenzeigenschaft können gebildete Antikörperkomplexe visualisiert werden.

Zellen für Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta), das mit einem Argon-Laser ausgestattet war, wurden wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben ausgesät und transfiziert. Für die Aufnahmen wurde ein inverses Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63 x/1,4 Öl-Immersions-Objektiv verwendet. Alle Experimente wurden bei

RT in HBS-Puffer durchgeführt. YFP wurde mit der 488 nm Linie des Argon-Lasers angeregt und die über einen 505 nm *long pass* Filters passierten Emissionssignale mit Hilfe des konventionellen Detektors des LSM detektiert. Die konfokalen *pinhole*-Einstellungen wurden so gewählt, dass optische Ebenen von 0,8 - 1,4  $\mu\text{M}$  erreicht wurden.

### 3.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

- Permeabilisierungspuffer: 0,3 % Triton X-100 in PBS
- Blockierlösung: 5 % NGS in PBS

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte für 2 x 5 min in Rotihistol überführt und anschließend für je 5 min in 2 x 100 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol inkubiert. Danach wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen. Um die Epitope in den Geweben für eine Antikörperbindung zugänglich zu machen, wurden die Schnitte 30 min mit Permeabilisierungspuffer behandelt und danach 3 x für 5 min mit PBS gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden vor der Inkubation mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer mit Blocklösung für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurden 600  $\mu\text{l}$  Primärantikörper in entsprechender Verdünnung auf die Schnitte aufgetragen und bei 4 °C über Nacht in der Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Abnehmen des Primärantikörpers und dem Waschen in PBS (3 x 5 min) wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper appliziert. Unter Vermeidung von Lichteinwirkung wurde für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für je 5 min wurden die Präparate in Roti-Mount Fluor Care DAPI eingedeckt, das zusätzlich die Zellkerne gegenfärbt. Als Kontrolle wurde ein nur mit Sekundärantikörper behandelter Schnitt mitgeführt. Die anschließende mikroskopische Analyse erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop.

### 3.5 Tierexperimentelles Arbeiten

#### 3.5.1 Tierhaltung

Für die Zucht von homozygoten TRPM1- und TRPM3-*Knockout*-Mäusen wurden heterozygote Tiere von der Firma Texas A & M Institute For Genomic Medicine (TIGM) bezogen. Die Herstellung der TRPM1-*Knockout*- und TRPM3-*Knockout*-Mäuse erfolgte durch die Firma Lexicon Pharmaceuticals Incorporated.

Die Erzeugung des klassischen *Knockouts* wurden durch gezielte Mutationen (Deletionen) im kodierenden Exon 17 (TRPM3) und in den kodierenden Exons 4 - 6 (TRPM1) in aus der Mauslinie 1129SvEv<sup>Brd</sup> stammenden embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durchgeführt. Die entstandenen chimären Mäuse wurden nachfolgend mit der Mauslinie Albino C57BL/6J verpaart, um die F1-Generation heterozygoter Tiere zu erzeugen. Diese Nachkommen wurden untereinander verpaart, um in der F2-Generation heterozygote, homozygote und Wildtyp-Tiere zu züchten. Die Haltung und Züchtung der transgenen Mäuse wurde während des gesamten Versuchszeitraums im spezifisch pathogenfreien (SPF) Hygienebereich der Tierversuchsanlage des Instituts unter Standardbedingungen durchgeführt. Tierpfleger und Tierärzte führten regelmäßige Kontrollen zur Überwachung des Gesundheitszustands der Tiere durch.

#### 3.5.2 Tierzucht

Um für das tierexperimentelle Arbeiten sowohl TRPM1- bzw. TRPM3-*Knockout*-Tiere als auch Wildtyp-Tiere mit gleichem genetischen Hintergrund zu erhalten, wurden geschlechtsreife männliche heterozygote TRPM1-*Knockout*-Mäuse mit geschlechtsreifen heterozygoten TRPM1-*Knockout*-Weibchen bzw. geschlechtsreife männliche heterozygote TRPM3-*Knockout*-Mäuse mit geschlechtsreifen heterozygoten TRPM3-*Knockout*-Weibchen verpaart.

### 3.5.3 Genotypisierung der TRPM3- und TRPM1-*Knockout*-Mäuse

- Lysepuffer: 500 mM KCl  
100 mM Tris/HCl, pH 8,3  
1,0 % (v/v) Tween 20  
1,0 % (v/v) Triton X-100  
500 µg/ml Proteinase K

Um den genauen genetischen Status der, bei der Zucht entstandenen transgenen Mäuse zu überprüfen, wurde im Alter von drei Wochen genomische DNA zur Bestimmung des Genotyps herangezogen. Für die Genotypisierung wurde Ohrgewebe, das bei der Ohrlochung zur individuellen Kennzeichnung der einzelnen Tiere anfiel, für die PCR-Analyse verwendet. Hierzu wurde das Mausgewebe in 100 µl Lysepuffer über Nacht bei 55 °C lysiert, danach die Proteinase K bei 94 °C für 15 min inaktiviert und die Probe zum Entfernen von Zelltrümmern 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Schließlich wurde das Lysat anhand von spezifischen Primern einer PCR-Analyse unterzogen. Für die Genotypisierungsreaktion wurde 1 µl der lysierten Probe eingesetzt. Die *in vitro*-Amplifikation mittels PCR erfolgte bei einer initialen Denaturierung der DNA für 3 min bei 94 °C, es folgten 32 Zyklen mit je 94 °C für 30 s (Denaturierung), 60 °C für 30 s (*Annealing*) sowie 72 °C für 60 s (Elongation) und abschließend 72 °C für 10 min (finale Polymerisation). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAxcel System, einem automatisiertem, multikapillarem Gelelektrophoresesystem, detektiert. Bei der Genotypisierungs-PCR für TRPM1-Mäuse wird für das Wildtyp-Allel ein PCR-Produkt von 840 bp (Primer NSKOM-31; NSKOM-32) und für das *Knockout*-Allel ein PCR-Produkt von 280 bp (Primer NSKOM-31; NSKOM-Neo3a) amplifiziert. In den Genotypisierungs-PCRs für TRPM3-Mäuse wird in den Polymerase-Kettenreaktionen für das Wildtyp-Allel ein Amplifikat der Größe von 376 bp (Primer NSKOM-Neo3a; NSKOM-06) und für das *Knockout*-Allel ein Amplifikat von 397 bp (Primer NSKOM-03; NSKOM-06) gebildet.

### 3.5.4 Isolation von pankreatischen β-Zellen aus Maus

Nach der zervikalen Dislokation wurden die *Papilla vateri* der Maus mit OP-Klammern abgeklemmt und 2 ml Kollagenase (1,9 U/ml) in 1 x HBSS-Puffer (4 °C) über den Gallengang in den Pankreas injiziert. Dieser wurde anschließend chirurgisch entfernt, für 10 min bei 37 °C inkubiert, die Verdauungsreaktion durch Zugabe von HBSS-Puffer (4 °C) gestoppt, gründlich gemischt und für 2 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit 1 x

HBSS-Puffer (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Inseln unter einem Mikroskop gepickt und in frischem HBSS-Puffer in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) überführt. Die Inseln wurden erneut in 2 x HBSS-Puffer (4 °C) gewaschen und in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt. Der HBSS-Überstand wurde mittels Pipette entfernt und die Inseln nach Zugabe von Trypsin/EGTA bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Verdauungsreaktion mit RPMI 1640-Medium gestoppt und die Inseln für 2 min bei 750 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Inseln in RPMI 1640-Medium aufgenommen und schließlich auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen in Zellkulturschalen (Ø 35 mm) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.5.5 Extraktion von Proteinen aus Organen

Für die Extraktion von Proteinen wurden Organe aus *Knockout*-, heterozygoten und Wildtyp-Tieren in 2 ml PBS, versetzt mit Proteaseinhibitor, unter Verwendung des Ultra-TURRAX<sup>®</sup> homogenisiert. Die Organe wurden anschließend durch Zugabe von 1 % Triton X-100 für 15 min bei 4 °C unter Drehen lysiert. Zellreste wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4.500 Upm und 4 °C entfernt. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und nochmals zentrifugiert (10 min bei 13.000 Upm und 4 °C). Der Überstand wurde in ein anderes Reaktionsgefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.5.6 Herstellung von Paraffinschnitten fixierter Gewebe für die Licht- und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

#### *Immersionsfixierung von Geweben*

Durch das Fixieren soll ein Augenblickszustand eines Gewebes, d.h. möglichst unzersetzt und naturgetreu festgehalten werden. Die Herstellung von Paraffinpräparaten von zu untersuchenden Geweben nach Organentnahme für die Licht- und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte mittels Immersionsfixierung. Dazu wurden die Gewebe vor der Paraffineinbettung über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS als Fixativ inkubiert.

### *Paraffineinbettung*

Da fixierte Gewebe nicht die erforderliche Festigkeit für ein Schneiden mit dem Mikrotom zur Herstellung von Gewebeschnitten besitzen, werden sie vor dem Schneiden mit einem Medium behandelt, das dem Präparat eine gute schneidbare Konsistenz verleiht. Das am häufigsten verwendete Einbettmittel ist Paraffin, das die Herstellung dünner Schnitte (1 - 5 µm) ermöglicht. Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die PFA-fixierten Gewebe zunächst über eine steigende Alkoholreihe (je 1 h in 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % Ethanol, 3 x 20 min 100 % Ethanol, 30 min 100 % Ethanol/Rotihistol (1:1), 3 x 20 min 100 % Rotihistol) dehydriert und in auf 60 °C erwärmtes flüssiges Paraffin überführt. Nach dem dreimaligen Wechsel der Paraffinlösungen (1 h, über Nacht und 1 h) zum Entfernen des überschüssigen Rotihistols, erfolgte die Paraffineinbettung der fixierten Gewebe. Hierzu wurde das Gewebe in Metallförmchen überführt und mit Paraffin überschichtet. Das Aushärten des Paraffins erfolgte auf Eis.

### *Herstellung von Paraffinschnitten*

Von den hergestellten Paraffinblöcken wurden 5 µm dünne Paraffinschnitte an einem Schlittenmikrotom angefertigt und diese nachfolgend zum Strecken in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad überführt. Die gestreckten Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet, um ein Abschwimmen bei nachfolgenden Inkubationsschritten zu unterbinden.

### **3.5.7 Hämatoxilin-Eosin (HE) -Färbung von Pankreasgewebe**

Die HE-Färbung dient der Übersicht bei der anhand eines konsekutiven Einsatzes zweier Einzelfärbungen verschiedene Gewebsstrukturen in Paraffinschnitten mikroskopisch unterschieden werden können.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte des murinen Pankreasgewebes für 2 x 10 min in Rotihistol (100 %) entparaffiniert. Nachfolgend wurden die Schnitte für jeweils 5 min in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (2 x 100 % Ethanol, je 1 x 90 %, 70 % und 50 % Ethanol). Nach einer Inkubation für 5 min in Wasser wurden die Schnitte für 10 s in Hämatoxylinlösung gefärbt, anschließend zum Entfernen überschüssiger Färbelösung 3 x für 2 min in Wasser gewaschen und danach in 0,1 % Ammoniumhydroxid inkubiert. Nach einem erneuten Inkubationsschritt in Wasser folgte eine Gegenfärbung durch Inkubation für 10 min in 0,1 % Eosinlösung (versetzt mit Eisessig), an den sich fünf kurze Waschschrte in H<sub>2</sub>O

anschlüssen. Hiernach wurden die Schnitte zum Dehydrieren sukzessiv 1 min mit Ethanol (80 %), je 2 x 5 min mit Ethanol (100 %) und Rotihistol (100 %) inkubiert. Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit dem Roti-Histokitt-Eindeckmedium und das Aushärten über Nacht unter dem Abzug.

In der HE-Färbung werden die Zellkerne durch Hämatoxylin blau angefärbt, während Eosin Plasmaproteinen wie Muskelzytoplasma und kollagenen Fasern eine rote Färbung gibt. Auch Erythrozyten bzw. Blutgefäße können an ihrer ziegelroten Färbung identifiziert werden.

## 4 Ergebnisse

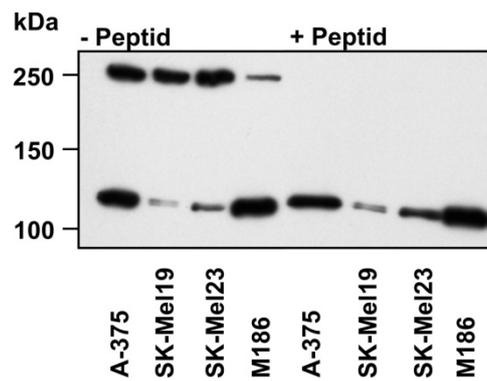
Über die physiologischen Funktionen von TRPM1 und TRPM3, Mitglieder der Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM) Subfamilie ist wenig bekannt. Da der TRPM1-Kanal pharmakologisch und biophysikalisch im rekombinanten System bisher kaum charakterisiert werden konnte, sollte die Funktion des TRPM1-Proteins in Melanozyten untersucht werden.

### 4.1 Charakterisierung von TRPM1 in Melanozyten

#### 4.1.1 Nachweis der Proteinexpression von TRPM1 in Melanozyten

Über *in situ*-Hybridisierungen und Analysen der Expression von alternativ gespleißten Transkripten von Melastatin (TRPM1) in humanen Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass verschiedene TRPM1-Spleißvarianten in Melanozyten und pigmentierten metastasierenden Zelllinien detektierbar sind (Duncan *et al.*, 1998; Fang & Setaluri, 2000; Hammock *et al.*, 2006).

Wir untersuchten die funktionelle Rolle des Kanal-bildnenden Proteins TRPM1 in Melanozyten und überprüften, ob eine Expression von TRPM1 in verschiedenen Melanozyten-Zelllinien auf Proteinebene nachweisbar ist. Von den nicht-pigmentierten Melanozyten-Zelllinien A-375 und M186 sowie von den pigmentierten Melanozyten-Zelllinien SK-Mel19, SK-Mel23 und SK-Mel28 wurden Membranproteinextrakte hergestellt und im Anschluss Western Blot Analysen durchgeführt. Der Nachweis von TRPM1 erfolgte mit Hilfe eines anti-TRPM1-Antikörpers.



**Abb. 4-1. Expression von TRPM1 in Melanozyten.** Exemplarisch gezeigt sind Western Blot Analysen von Proteinextrakten der Melanozyten-Zelllinien A-375, SK-Mel19, SK-Mel23 und M186. Der Nachweis von TRPM1 erfolgte mit einem anti-TRPM1-Antikörper. Als Nachweis für eine TRPM1-spezifische Bande wurde ein immunogenes Peptid eingesetzt. In Anwesenheit des Peptids war kein TRPM1-spezifisches Signal sichtbar (Blot, + Peptid).

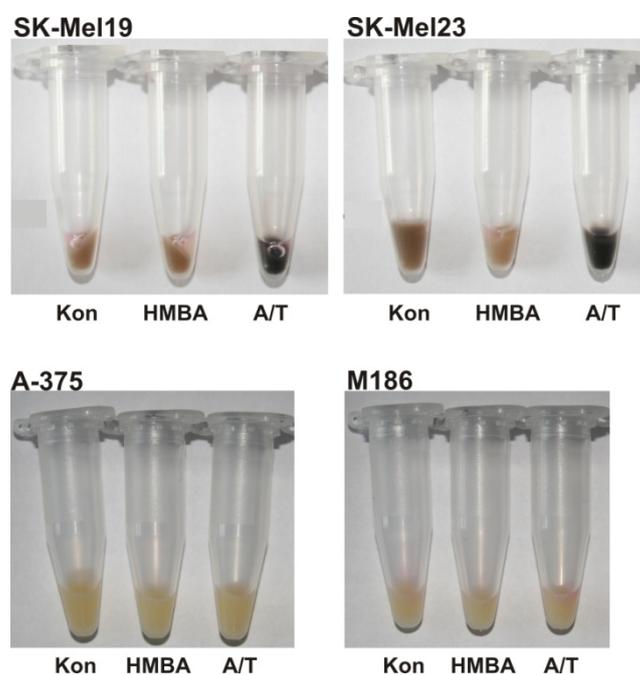
Die Daten der Western Blot Analysen zeigten eine Proteinexpression von TRPM1 in allen untersuchten Melanozyten-Zelllinien. Der Antikörper visualisierte Proteine von einer Molekulargröße von 220 kDa und 100 kDa (siehe Abb. 4-1.). Um zu überprüfen, ob es sich um TRPM1-spezifische Banden handelt, wurden zwei identische Blotmembranen hergestellt, die einmal mit dem anti-TRPM1-Antikörper und einmal mit dem anti-TRPM1-Antikörper in Gegenwart eines immunogenen Peptids inkubiert wurden (siehe Abb. 4-1.). Die Bande mit einer molekularen Größe von 220 kDa war TRPM1-spezifisch, da das Signal in Anwesenheit des immunogenen Peptids fehlt.

Aus der Literatur geht hervor, dass TRPM1 möglicherweise in vesikulären Strukturen exprimiert wird und eine Rolle bei dem Transport und der Bildung von Melanin spielen könnte. Da ein Nachweis von TRPM1 in allen untersuchten Melanozyten-Zelllinien bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob eine Steigerung der Melaninsynthese in Melanozyten durch chemische Induktionen eine Wirkung auf die Proteinexpression von TRPM1 zeigt. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob in den verwendeten Zelllinien eine gesteigerte Synthese von Melanin induziert werden kann.

#### 4.1.2 Einfluss einer Melaninüberexpression auf die Kanalproteine TRPM1 und TRPM2 in Melanozyten-Zelllinien

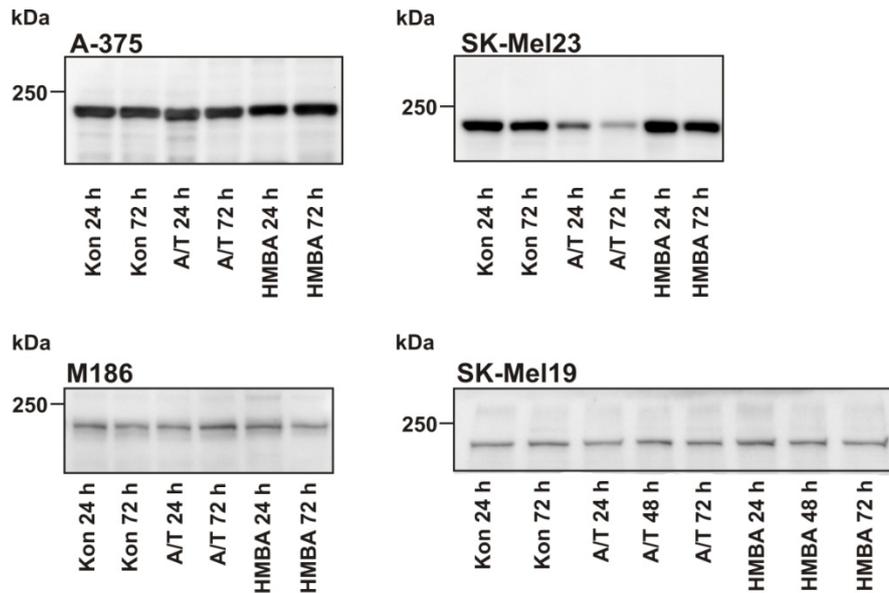
In Experimenten mit Hexamethylenbisacetamid- (HMBA-) behandelten, humanen, pigmentierten Melanoma-Zelllinien konnte eine Hochregulation von verschiedenen TRPM1-mRNA-Transkripten nachgewiesen werden. Um zu analysieren, ob HMBA sowie

Ammoniumchlorid/Tyrosin (A/T) einen Einfluss auf die Melaninproduktion in verschiedenen Melanozyten-Zelllinien ausüben, wurden die Melanozyten für 72 h mit der entsprechenden Substanz bzw. Substanzkombination im Medium kultiviert, anschließend zentrifugiert und die spezifischen Pigmentierungen der Zellpellets dokumentiert. Die Behandlung der Melanozyten für 72 h mit HMBA führte zu keiner gesteigerten Pigmentbildung, während eine Kultivierung der Melanozyten-Zelllinien mit Ammoniumchlorid/Tyrosin für 72 h in SK-Mel19, SK-Mel23 und SK-Mel28 die Synthese von Melanin deutlich verstärkte. Die gesteigerte Melaninbildung wurde durch eine schwarzbraune Verfärbung der Zellpellets im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestätigt (siehe Abb. 4-2.).



**Abb. 4-2. Melaninsynthese in Melanozyten.** Gezeigt sind Zellpellets der Melanozyten-Zelllinien SK-Mel19, SK-Mel23, A-375 und M186 nach Behandlung mit 5 mM Hexamethylenbisacetamid (HMBA) und 10 mM/400 μM Ammoniumchlorid/Tyrosin (A/T) für 72 h sowie entsprechend unbehandelte Kontrollen (Kon). Die Zelllinien SK-Mel19 und SK-Mel23 weisen nach A/T-Behandlung eine gesteigerte Melaninsynthese auf.

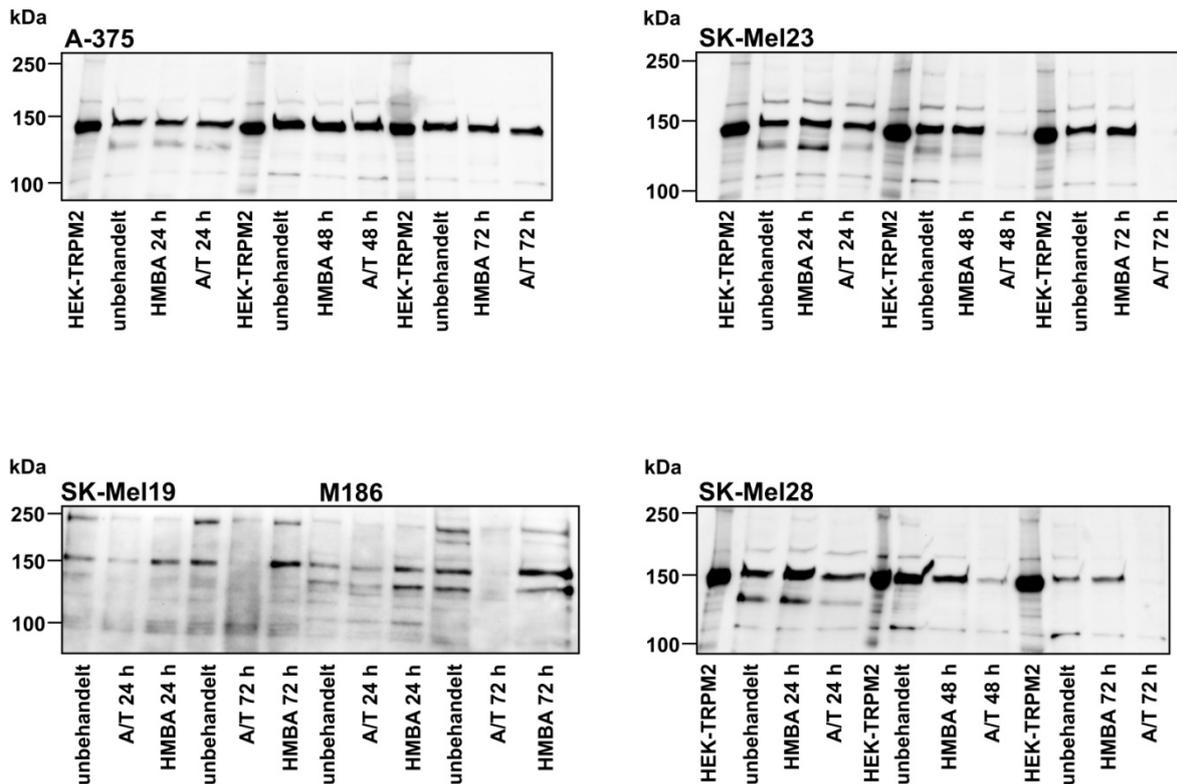
Anschließend wurden die Zellpellets aufgearbeitet und die Melanozyten-spezifische TRPM1-Expression mittels Western Blot Analysen in den Membranproteinextrakten überprüft. Die TRPM1-Expressionsanalyse auf Proteinebene erfolgte mit Hilfe eines anti-TRPM1-Antikörpers.



**Abb. 4-3.** Effekt einer gesteigerten Melaninsynthese auf die TRPM1-Expression in Melanozyten. Exemplarisch gezeigt ist die proteinbiochemische Charakterisierung der Extrakte von Membranproteinen verschiedener Melanozyten-Zelllinien (A-375, SK-Mel19, SK-Mel23, M186) nach zeitabhängiger Inkubation mit Hexamethylenbisacetamid (HMBA) und Ammoniumchlorid/Tyrosin (A/T, 10 mM/400  $\mu$ M) sowie entsprechender Kontrollen (Kon). Das TRPM1-Signal wurde mit einem TRPM1-spezifischen Antikörper detektiert.

In den untersuchten Zelllinien hatte die Behandlung von HMBA keinen Einfluss auf die TRPM1-Expression (siehe Abb. 4-3.). Während in A-375, SK-Mel19 und M186 Zellen auch die Behandlung mit Ammoniumchlorid/Tyrosin keinen Effekt auf die Expression von TRPM1 zeigte, führte diese Behandlung in SK-Mel23 Zellen zu einer Herunterregulation von TRPM1 (siehe Abb. 4-3.). Ein deutlicher Effekt war bereits nach 24 h zu beobachten und nach 72 h war das TRPM1-Protein nicht mehr detektierbar. Eine Applikation von Ammoniumchlorid und der Aminosäure L-Tyrosin, die zu einer Zunahme der Melaninproduktion führt, resultierte nur bei SK-Mel23 Zellen in einer zeitabhängigen Abnahme des TRPM1-Proteins. Durch die Behandlung mit HMBA blieb die Expression des TRPM1-Kanals auch in SK-Mel23 Zellen unbeeinflusst.

Wir untersuchten, ob eine TRPM2-Expression in Melanozyten nachweisbar ist und diese parallel zur Melaninsynthese reguliert wird. Wiederum wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid/Tyrosin (Hoogduijn *et al.*, 2004) bzw. HMBA (Fang & Setaluri, 2000) behandelt und nach Extraktion der Membranproteine Western Blot Analysen durchgeführt. Der Nachweis des TRPM2-Signals erfolgte mit einem TRPM2-spezifischen Antikörper.



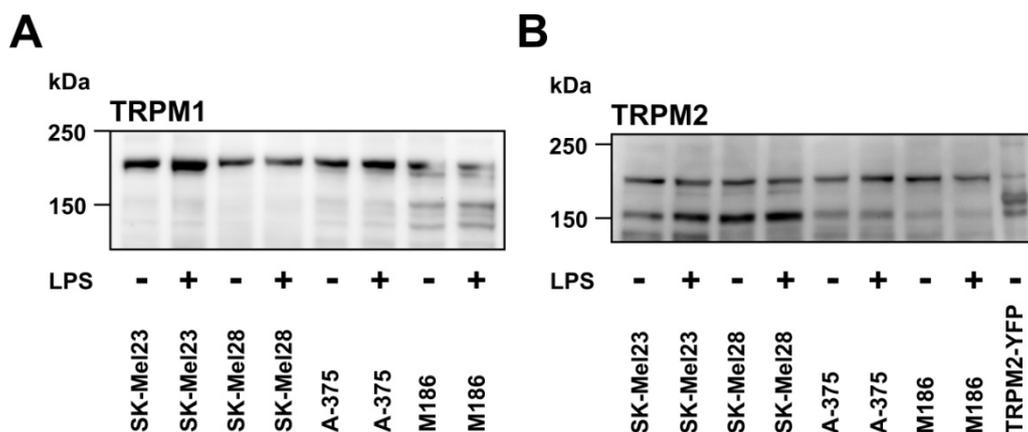
**Abb. 4-4.** Wirkung einer erhöhten Melaninproduktion auf die TRPM2-Expression in Melanozyten. Dargestellt sind Western Blot Analysen der Membranextrakte verschiedener Melanozyten-Zelllinien (A-375, SK-Mel19, SK-Mel23, SK-Mel28, M186) nach zeitabhängiger Inkubation mit HMBA bzw. Ammoniumchlorid/Tyrosin (A/T) sowie Kontrollen (unbehandelt) und Lysate TRPM2-exprimierender HEK293 Zellen. Die Detektion erfolgte mit einem anti-TRPM2-Antikörper.

In allen untersuchten Melanozyten-Zelllinien konnte eine TRPM2-Expression mittels Western Blot nachgewiesen werden. Es ist erkennbar, dass die Proteinexpression von TRPM2 in den SK-Mel19, SK-Mel23, SK-Mel28 und M186 nach Ammoniumchlorid/Tyrosin-Behandlung mit zunehmender Inkubationszeit herunterreguliert wird und nach 72 h nicht mehr nachweisbar ist (siehe Abb. 4-4.). Die Melaninproduktion verhält sich somit reziprok zu der Proteinexpression des TRPM2. In der Zelllinie A-375, einer Melanozytenlinie, die keine Melaninsynthese zeigt, bleibt das TRPM2-Signal über die Zeit hinweg unverändert und vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 4-4.). In A-375 Zellen kommt es somit weder zu einer Hoch- noch zu einer Herunterregulation. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation der Melaninsynthese mit einer Regulation der TRPM2-Expression einhergeht. In allen HMBA-behandelten Zelllinien mit Ausnahme von SK-Mel28 war hingegen kein signifikanter Unterschied in der TRPM2-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen detektierbar. In HMBA-behandelten SK-Mel28 Zellen konnte nach 72 h auch eine starke Herunterregulation von TRPM2 nachgewiesen werden.

Da wie in der Einleitung erwähnt TRPM2 in Makrophagen eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt und durch Lipopolysaccharid (LPS) heraufreguliert wird (Wehrhahn *et al.*, 2010), wurde untersucht, ob eine LPS-Stimulation in Melanozyten einen Effekt auf die Proteinexpression von TRPM1 und TRPM2 zeigt. Dazu wurden unterschiedliche Melanozytenlinien mit LPS behandelt und die Expression von TRPM1 und TRPM2 mittels Western Blot untersucht.

#### 4.1.3 Wirkung von LPS auf TRPM1 und TRPM2 in Melanozyten

Hierzu wurden unterschiedliche Melanozyten-Zelllinien für 96 h mit LPS behandelt, anschließend Membranextrakte hergestellt und diese mittels Western Blot untersucht. Die Charakterisierungen der TRPM1- sowie TRPM2-Proteine wurden mit ihren korrespondierenden Antikörpern (anti-TRPM1 und anti-TRPM2) durchgeführt.



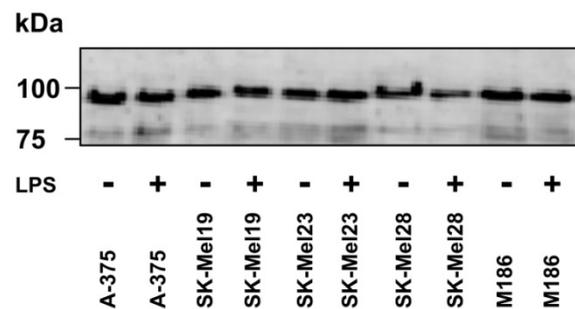
**Abb. 4-5. LPS-induzierte TRPM1- und TRPM2-Expression in Melanozyten.** Gezeigt sind Western Blot Analysen von Lysaten verschiedener Melanozytenlinien nach 96 h Behandlung mit LPS (Lipopolysaccharid) sowie unbehandelte Kontrollen (Kon). (A) Nachweis von TRPM1 und (B) TRPM2 mit den jeweiligen korrespondierenden Antikörpern.

Die Analyse zeigte mit dem anti-TRPM1-Antikörper eine spezifische TRPM1-Bande für die Proteinexpressionen von TRPM1 mit einer molekularen Größe von ungefähr 220 kDa in allen untersuchten Melanozyten-Zelllinien. Zwischen den LPS-behandelten Zellen und den Kontrollzellen waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TRPM1 detektierbar. Ein vergleichbares Ergebnis wurde beim Vergleich der TRPM2-Expression erreicht. Hier zeigte der anti-TRPM2-Antikörper ein spezifisches TRPM2-Signal auf der Blotmembran mit einer molekularen Größe von 170 kDa in den untersuchten Melanozytenlinien an. Somit konnte der Nachweis geführt werden, dass eine

LPS-Behandlung verschiedener Melanozyten-Zelllinien weder zu einem Anstieg noch zu einer Reduktion der Proteinexpressionen von TRPM1 und TRPM2 führt (siehe Abb. 4-5. A und B).

Kürzlich wurde auf mRNA- und Proteinebene der Nachweis geführt, dass der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) funktionell in humanen Melanozyten exprimiert wird (Ahn *et al.*, 2008).

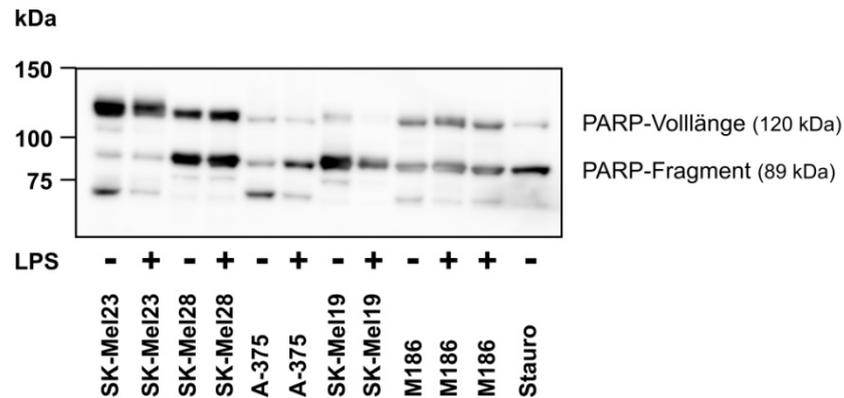
Um zu untersuchen, ob LPS die Proteinexpression von TLR-4 beeinflusst, wurden für 96 h mit LPS behandelte Melanozyten-Zelllinien und entsprechende unbehandelte Kontrollen auf ihre TLR-4-Expression mittels Western Blot untersucht. Das spezifische Signal der TLR-4-Proteinexpression mit einer molekularen Größe von 95 kDa wurde mittels anti-TLR-4 Antikörper nachgewiesen.



**Abb. 4-6. Auswirkung von LPS auf den Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) in Melanozyten.** Gezeigt ist die TLR-4-Proteinexpression verschiedener Melanozytenlinien nach 96 h Inkubation mit LPS (Lipopolysaccharid) und unbehandelten Kontrollen (Kon) mittels Western Blot von Lysaten.

Es war kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von TLR-4 zwischen den LPS-behandelten Zelllinien A-375, SK-Mel19, SK-Mel23, SK-Mel28 und M186 und den entsprechend unbehandelten Kontrollen nachweisbar (siehe Abb. 4-6.).

Da im Verlauf der 96-stündigen Behandlung der Melanozyten-Zelllinien mit LPS eine erhöhte Zellsterblichkeit beobachtet wurde, erfolgte weiterführend die Untersuchung einer möglichen LPS-induzierten Apoptose. Hierfür wurden Melanozytenlysate angefertigt und die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Expression (Zhang *et al.*, 2006) mittels Western Blot Analyse detektiert. Nach Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) wird durch die Effektor-Caspase-3 die Fragmentierung des 116 kDa großen PARP-Proteins in ein 85 kDa und ein 25 kDa Fragment vermittelt (Kaufmann *et al.*, 1993).



**Abb. 4-7. Effekt von LPS auf PARP in Melanozytenlinien.** Gezeigt sind Western Blot Analysen von Membranpräparationen verschiedener Melanozytenlinien nach 96 h Behandlung mit LPS (Lipopolysaccharid) sowie unbehandelter Kontrollen (Kon). Nachweis des Apoptosemarkers PARP mit einem anti-PARP-Antikörper. Für 18 h mit Staurosporin (Stauero) behandelte Lysate von HEK293 Zellen wurden als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Bildung eines 89 kDa-Fragments von PARP aus Spaltung des 120 kDa Vollängenproteins durch die Effektor-Caspase-3 weist zwischen den einzelnen mit LPS-behandelten Melanozyten-Zelllinien im Vergleich zu ihren korrespondierenden unbehandelten Kontrollen vergleichbare Bandenintensitäten auf (siehe Abb. 4-7.). Das PARP-Signal wurde mit einem PARP-spezifischen Antikörper detektiert, der sowohl das Vollängenprotein als auch das 89 kDa Protein erkennt. Als Positivkontrolle wurde ein Zelllysat von Staurosporin-behandelten HEK293 Zellen mitgeführt, das einen nahezu kompletten Abbau des Vollängen-PARP zeigt. Staurosporin ist ein Proteinkinaseinhibitor (Tamaoki *et al.*, 1986) und induziert Apoptose über die Aktivierung des intrinsischen Signalweges (Sanchez *et al.*, 1992). In den Western Blot Analysen war kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression des 120 kDa großen PARP-Vollängenproteins und dem 89 kDa großen Spaltprodukt zwischen den LPS-behandelten Melanozyten und den entsprechend unbehandelten Kontrollen detektierbar. Die erhaltenen Ergebnisse lassen keine Aktivierung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg durch eine PARP-Spaltung erkennen. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Effekt des Zellsterbens vermutlich nicht durch Apoptose vermittelt wurde und ein anderer Mechanismus zum Zelltod führt.

In unseren Untersuchungen verschiedener für die Funktion von TRPM1 in Melanozyten beteiligter Faktoren, konnte keine Wirkung einer induzierten Melaninsynthese auf die TRPM1-Expression gezeigt werden. Zusätzlich konnte kein Nachweis der Beteiligung von TRPM1 an einer LPS-induzierten Immunantwort erfolgen. Zudem war keine Mitwirkung von TRPM1 an der Apoptose nachweisbar.

## 4.2 Charakterisierung von TRPM1-*Knockout*- und TRPM3-*Knockout*-Mauslinien

### 4.2.1 Genotypisierung mittels PCR-Reaktion

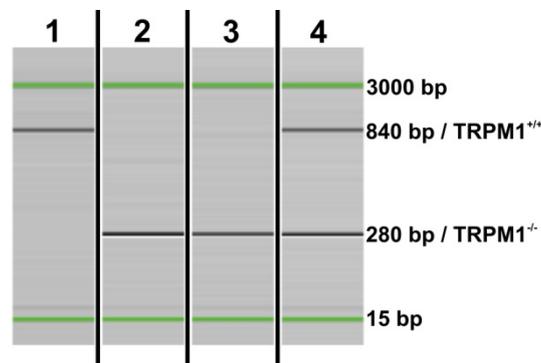
Der Kationenkanal TRPM1 stellt mit 57 % identischen Aminosäuren (Pedersen *et al.*, 2005), das zu TRPM3 am stärksten verwandte Protein dar. Beide TRPM-Proteine bilden jeweils einen konstitutiv aktiven, nicht-selektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanal, deren physiologischen Funktionen weitgehend unklar sind. In der vorliegenden Arbeit sollten TRPM1- bzw. TRPM3-*Knockout*-Mäuse charakterisiert werden, wobei bei einem klassischen *Knockout* mögliche Kompensationsmechanismen, die zur Hochregulation führen könnten, nicht ausgeschlossen werden können.

Für die funktionelle *in vivo*-Analyse von TRPM1 wurden TRPM1-*Knockout*-Mäuse, die von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated generiert wurden, über das Texas A & M Institute For Genomic Medicine (TIGM) bezogen. Lexicon hat eine erste grobe Phänotypisierung der Mauslinie durchgeführt, doch ließen die Daten noch viele Fragen unbeantwortet. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Tiere gezüchtet und für eigene Versuche verwendet. Durch heterozygote Verpaarung wurde die Generierung von Wildtyp- und *Knockout*-Mäusen aus demselben Wurf gewährleistet. Dies bedingt, dass von jedem Tier eine Genotypisierung durchzuführen war. Der funktionellen Charakterisierung ging die Genotypenanalyse der zu analysierenden Mäuse voran, um eindeutig sicherzustellen, dass die Tiere, die von der Firma beschriebene Deletion in den Exons 4 – 6 des TRPM1-Gens aufweisen. Darüber hinaus konnte so garantiert werden, dass für die nachfolgenden Untersuchungen jeweils Wildtyp- und TRPM1<sup>-/-</sup>-Geschwister miteinander verglichen werden konnten. Die molekularbiologische Bestimmung des Genotyps der transgenen Mäuse erfolgte nach Lyse von Segmenten des Ohres, anschließender Isolierung der genomischen DNA und genetischer Analyse mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide.

Im Zuge der Genotypisierung der TRPM1-Mauslinie für eine Charakterisierung von TRPM1 wurde gleichfalls eine von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated generierte TRPM3-*Knockout*-Mauslinie (TRPM3<sup>-/-</sup>), die eine Charakterisierung von TRPM3 ermöglichen soll, von TIGM bezogen. Auch hier wurde nach durchgeführter Phänotypisierung durch Lexicon kein offensichtlicher Phänotyp für TRPM3-defiziente Mäuse beschrieben. Nach Erhalt von Nachkommen, der ebenfalls auf heterozygoten TRPM3-Tieren basierenden Zucht, erfolgte die Genotypenanalyse der TRPM3-Mäuse über zwei separate

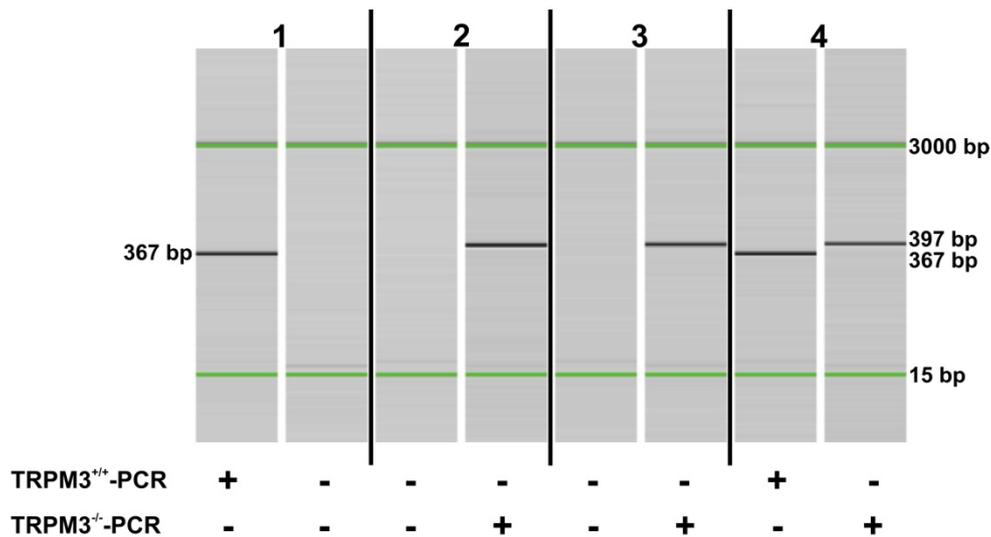
PCR-Reaktionen. Eine PCR-Reaktion diente dem Nachweis für das Wildtyp-Allels (TRPM3<sup>+/+</sup>-PCR), während die zweite PCR das *Knockout*-Allel (TRPM3<sup>-/-</sup>-PCR) des TRPM3-Gens detektieren sollte.

Bei der Genotypisierungsreaktion für das Wildtyp-Allel von TRPM1 wurde mit den entsprechenden Oligonukleotiden ein zu erwartendes PCR-Produkt mit einer Größe von 840 bp amplifiziert (siehe Abb. 4-8. Spur 1). In PCR-Reaktionen von TRPM1-*Knockout*-Mäusen war das 840 bp große Produkt nicht nachweisbar, allerdings wurde hier durch die deletionsflankierenden Primer ein Amplifikat mit einer Größe von 280 bp nachgewiesen (siehe Abb. 4-8. Spuren 2 und 3). In heterozygoten Tieren sind wie zu erwarten beide Banden (840 bp und 280 bp) detektierbar (siehe Abb. 4-8. Spur 4).



**Abb. 4-8. Bestimmung des Genotyps von Wildtyp-, heterozygoten und TRPM1-*Knockout*-Mäusen.** Exemplarische Darstellung der durch eine Genotypisierungs-PCR erhaltenen DNA-Fragmente, ausgewertet mit dem auf Kapillarelektrophorese-basierendem, automatisierten DNA-Analysesystem QIAxcel. Das Wildtyp-Allel wurde durch ein Amplifikat von 840 bp (Spur 1), das TRPM1-*Knockout*-Allel durch ein Amplifikat von 280 bp (Spur 2 und 3) und heterozygote Genotypen durch das Auftreten beider PCR-Produkte (Spur 4) nachgewiesen.

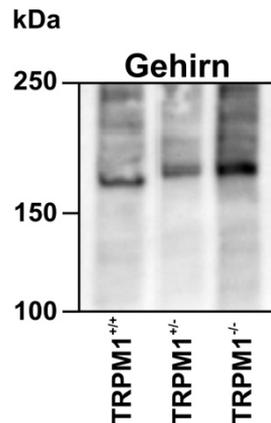
Während bei den TRPM1-Tieren die Genotypisierung mit einer PCR-Reaktion erreicht werden konnte, war es bei den TRPM3-Tieren notwendig die Genotypisierung der Tiere mittels zweier verschiedenener Ansätze nachzuweisen. Durch die spezifische Primerlage im TRPM3-Gen konnte mit Hilfe der Wildtyp-PCR ausschließlich in Wildtyp-Tieren und in heterozygoten Tieren ein 367 bp großes PCR-Produkt detektiert werden. Gegenteiliges war bei der *Knockout*-PCR zu beobachten. In den TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren wurde ein 397 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, das nicht in der Wildtyp-Maus nachzuweisen war. Als Positivkontrolle diente auch hier wieder das heterozygote Tier, das neben der 367 bp großen Bande ebenfalls eine Bande mit einer Größe von 397 bp aufwies. Mit diesem Verfahren konnten die Genotypen der Tiere bestimmt werden.



**Abb. 4-9. Genotypisierung von Wildtyp-, heterozygoten und TRPM3-Knockout-Mäusen.** Exemplarisch gezeigt sind die bei den Genotypisierungs-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente, ausgewertet mit dem auf Kapillarelektrophorese-basierendem, automatisierten DNA-Analysesystem QIAxcel. Nachweis von Wildtyp- (1), TRPM3-Knockout- (2 - 3) und heterozygoten- (4) Tieren.

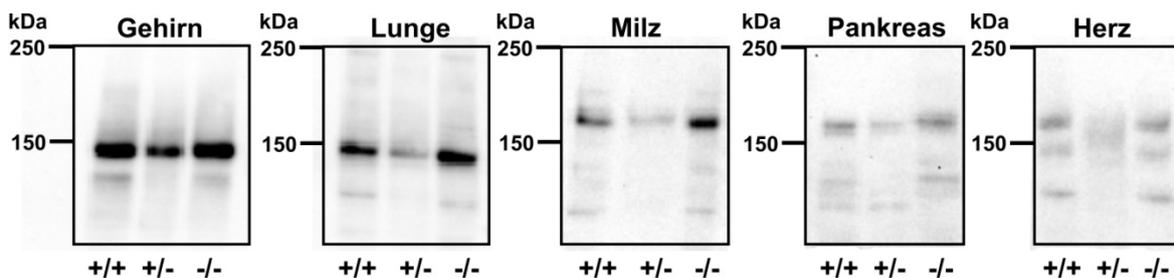
#### 4.2.2 Analyse einer TRPM1-Knockout- sowie einer TRPM3-Knockout-Mauslinie mittels Western Blot

Die Genotypisierungsreaktionen bestätigten die Deletion der Exons 4 - 6 bei TRPM1<sup>-/-</sup>- und des Exons 17 bei TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren. Um sicherzustellen, dass die Bildung des TRPM1- bzw. TRPM3-Proteins in diesen Mäusen auch effektiv unterbunden worden ist, wurden Western Blot Analysen an unterschiedlichen Tierorganextrakten durchgeführt. Dazu wurden zunächst Gehirne von TRPM1<sup>+/+</sup>-, TRPM1<sup>+/-</sup>- und TRPM1<sup>-/-</sup>-Tieren isoliert und nach Aufbereitung biochemisch analysiert. Zum Nachweis des TRPM1-Proteins wurde ein anti-TRPM1-Antikörper verwendet. Ein TRPM1-spezifisches Signal konnte mit Hilfe des Antikörpers im Gehirn nachgewiesen und somit die Expression des TRPM1-Protein zum ersten Mal gezeigt werden (siehe Abb. 4-10.). Der Nachweis von TRPM1 erfolgte sowohl in Wildtyp- als auch in heterozygoten Mausgehirnen. Dabei zeigten die auf der Blotmembran erhaltenen Proteinbanden aus den Gehirnextrakten eine molekulare Größe von ungefähr 180 kDa an, die der postulierten Größe von TRPM1 entsprechen. Das TRPM1-spezifische Signal konnte jedoch auch unerwartet in den TRPM1<sup>-/-</sup>-Tieren detektiert werden. (siehe Abb. 4-10.).



**Abb. 4-10. Expression des TRPM1-Proteins im murinen Gehirn.** Gezeigt sind die biochemischen Analysen der Proteinlysate einer TRPM1-Wildtyp- (TRPM1<sup>+/+</sup>), einer Heterozygoten (TRPM1<sup>+/-</sup>) und einer TRPM1-Knockout- (TRPM1<sup>-/-</sup>) Maus. Das TRPM1-Protein ist in allen analysierten Genotypen detektierbar. Der Nachweis des TRPM1-Proteins im Gehirn erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen TRPM1.

Für die Charakterisierung der TRPM3-Tiere wurden die Organe Gehirn, Lunge, Pankreas, Milz sowie Herz von TRPM3<sup>+/+</sup>-, TRPM3<sup>+/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen entnommen. Die Membranextrakte dieser Gewebe wurden mittels Western Blot Verfahren analysiert. Für einen TRPM3-Nachweis wurde ein in der Arbeitsgruppe generierter und charakterisierter TRPM3-spezifischer Antikörper verwendet (Grimm *et al.*, 2003). Ein spezifisches TRPM3-Signal bei einem Molekulargewicht von 150 kDa konnte sowohl in der Positivkontrolle TRPM3<sup>+/+</sup>-, als auch in TRPM3<sup>+/-</sup>-Tieren detektiert werden. Auch hier wurde entgegen den Erwartungen das TRPM3-Protein in allen analysierten Geweben der TRPM3<sup>-/-</sup>-Tiere nachgewiesen (siehe Abb. 4-11.).



**Abb. 4-11. Nachweis des TRPM3-Proteins in verschiedenen murinen Geweben mittels Western Blot.** Gezeigt sind die biochemischen Analysen der Proteinlysate einer TRPM3-Wildtyp- (+/+), einer heterozygoten (+/-) und einer TRPM3-Knockout-Maus (-/-). Der Nachweis des TRPM3-Proteins in Gehirn, Lunge, Milz, Pankreas und Herz erfolgte mit einem anti-TRPM3-Antikörper.

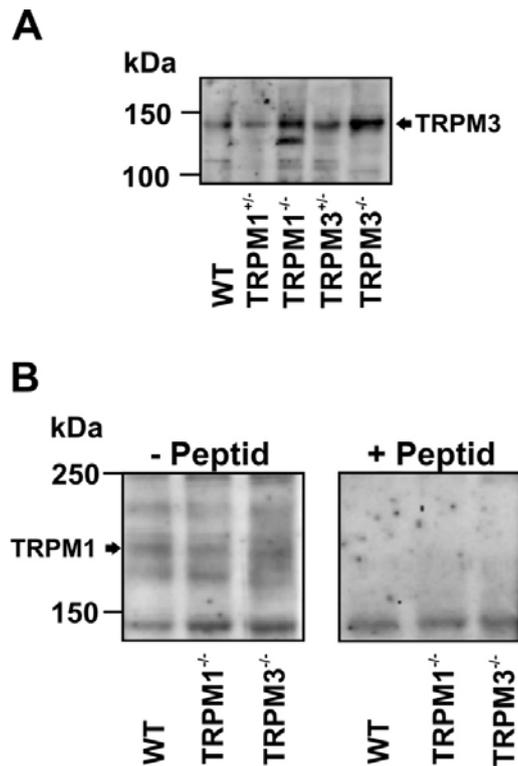
In den durchgeführten Analysen konnte sowohl das TRPM1-Protein unerwartet im Gehirn der TRPM1<sup>-/-</sup>-Mauslinie als auch das TRPM3-Protein in allen untersuchten Geweben der TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie mit Hilfe der Western Blot Analyse detektiert werden. Dieser Befund war insofern überraschend, als dass die *Knockout*-Strategien so angelegt waren, dass durch Deletion von Exon 17 bei TRPM3<sup>-/-</sup> bzw. der Exone 4 - 6 bei TRPM1<sup>-/-</sup> eine Deletion von 3n+1 bzw. 3n+2 Nukleotiden erreicht werden sollte, so dass durch Änderung des

Leserahmens die Bildung des Volllängenprotein unterbrochen sein sollte. Diese genetischen Manipulationen hätten zu mRNA-Transkripten mit Leserasterverschiebung-bedingten Mutationen geführt und als Resultat zur Bildung von verkürzten *Nonsense*-Proteinen. Bei den hier untersuchten *Knockout*-Tieren waren jedoch sowohl TRPM1 in TRPM1<sup>-/-</sup> als auch TRPM3 in TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen in voller Länge detektierbar.

Im Hinblick auf Literaturbefunde und den erfolgten Nachweis von TRPM3 im Pankreasgewebe, wurde im Folgenden untersucht, ob das TRPM3-Protein im exokrinen oder endokrinen Teil des Pankreas exprimiert wird. Hierzu wurden die endokrinen Anteile aus Pankreaten, die Langerhans-Inseln, isoliert und mittels Western Blot analysiert. Da das TRPM1-Protein zu TRPM3 eine starke Homologie aufweist, kann eine mögliche Protein-Interaktion angenommen werden. So lag die Vermutung nahe, dass Melastatin (TRPM1) wie TRPM3 in Langerhans-Inseln exprimiert wird.

#### **4.2.3 Analyse der TRPM1- sowie TRPM3-Expression in Langerhans-Inseln mittels Western Blot**

Die Western Blot Analysen zeigten eine eindeutige Expression des TRPM3-Kanals im Pankreas. Da die Langerhans-Inseln aber nur 2 % des Gesamtpankreasgewebes ausmachen war es schwierig allein über die Analyse des Gesamtpankreas eine Aussage über die Proteinexpression spezifisch in Inselzellen zu geben. Deshalb wurden im nächsten Schritt isolierte murine Langerhans-Inseln von Wildtyp-, TRPM1<sup>+/-</sup>- und TRPM1<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie in TRPM3<sup>+/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen (siehe Abb. 4-12. A) durch biochemische Analyse untersucht. Wiederum wurde der TRPM3-spezifische Antikörper verwendet. Für die Analysen wurden die isolierten Inseln gezählt und entsprechend mit Probenpuffer versetzt, so dass für jeden zu analysierenden Genotyp eine gleiche Menge an Proteinlysate geladen werden konnte. Um ergänzend zu untersuchen, ob das zu TRPM3 am stärksten homologe Protein TRPM1 ebenfalls eine Expression im endokrinen Anteil des Pankreas zeigt, wurden die aus dem exokrinen Gewebe des Pankreas isolierten Langerhans-Inseln lysiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Zur Visualisierung eines möglichen TRPM1-Signals wurde ein TRPM1-spezifischer Antikörper eingesetzt (siehe Abb. 4-12. B).



**Abb. 4-12. Nachweis von TRPM1 und TRPM3 in Langerhans-Inseln.** (A) Gezeigt sind Western Blot Analysen von Insellysaten isoliert aus Wildtyp- (WT), heterozygoten- (TRPM1<sup>+/-</sup>), TRPM1-*Knockout*- (TRPM1<sup>-/-</sup>) sowie heterozygoten- (TRPM3<sup>+/-</sup>) und TRPM3-*Knockout*- (TRPM3<sup>-/-</sup>) Mäusen unter Verwendung eines TRPM3-spezifischen Antikörpers. (B) Dargestellt sind Western Blot Analysen von Insellysaten aus WT-, TRPM1<sup>-/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren mit einem anti-TRPM1-Antikörper.

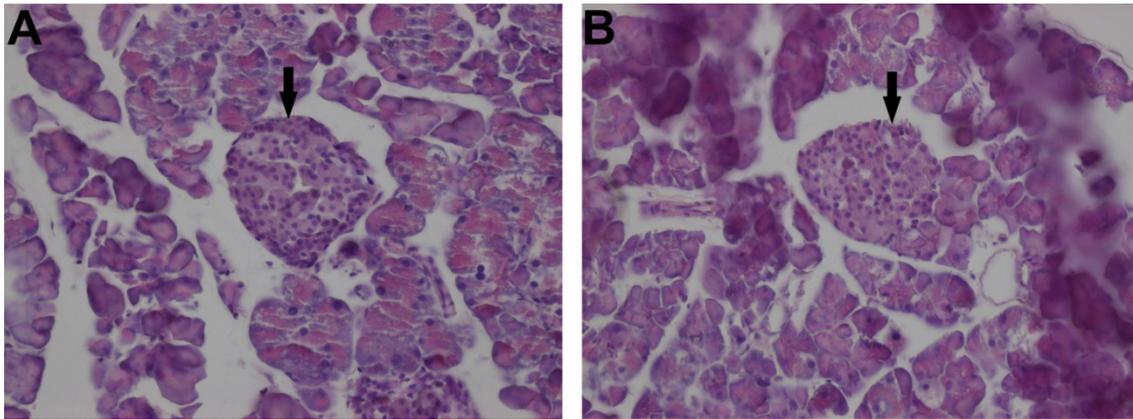
Beim Vergleich der TRPM3-Bandenintensitäten fällt auf, dass es sowohl in TRPM1<sup>-/-</sup>-Inseln als auch in TRPM3<sup>+/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Inseln im Gegensatz zu Wildtyp- und TRPM1<sup>+/-</sup>-Inseln zu einer Hochregulation des TRPM3 kommt. Dies lässt vermuten, dass ein möglicher Funktionsverlust des TRPM3 durch eine Hochregulation der TRPM3-Proteinbiosynthese sowohl in TRPM1<sup>-/-</sup>- als auch in TRPM3<sup>+/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren kompensiert werden soll.

Die Western Blot Analyse der Langerhans-Inseln zum Nachweis von Melastatin zeigte, dass in Wildtyp, TRPM1<sup>-/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen TRPM1 detektierbar war und somit in Langerhans-Inseln exprimiert wird. Eine mögliche Hochregulation des TRPM1-Proteins in TRPM1- sowie TRPM3-defizienten Tieren kann aufgrund der gleichen Bandenintensitäten ausgeschlossen werden.

#### 4.2.4 Nachweis von TRPM3 in Insulin-sezernierenden $\beta$ -Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz

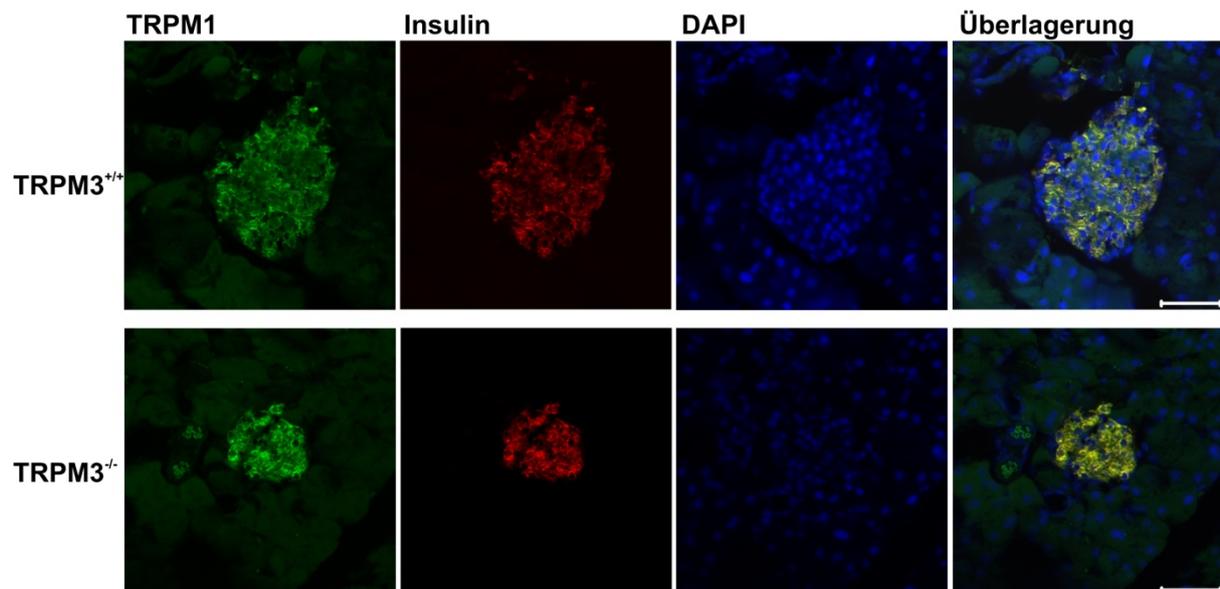
In den untersuchten Langerhans-Inseln von Wildtyp-, TRPM1<sup>-/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren konnte das TRPM1-Protein durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Auch das TRPM3-Protein war in Langerhans-Inseln von Wildtyp-, TRPM3<sup>+/-</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>- sowie TRPM1<sup>+/-</sup>- und TRPM1<sup>-/-</sup>-Tieren detektierbar. Um die Frage zu klären, ob die Kationenkanäle TRPM1 und TRPM3 in den Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen der Inseln exprimiert werden, wurden murine Pankreate isoliert, histologisch aufgearbeitet und anschließend über einen indirekten immunhistochemischen Nachweis mit einem anti-TRPM1-Antikörper bzw. einem TRPM3-spezifischen Antikörper gefärbt.

Für den Nachweis der Proteinexpression von TRPM1 und TRPM3 in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln, wurden die für Antikörper leicht zugänglichen Paraffingewebeschnitte von Langerhans-Inseln von Wildtyp- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren mit einem anti-TRPM1-Antikörper sowie einem TRPM3-spezifischen Antikörper inkubiert und ein möglicher TRPM1- bzw. TRPM3-Antigen-Antikörper-Komplex mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Die Identifizierung der  $\beta$ -Zellen erfolgte durch eine Gegenfärbung mit einem Insulin-spezifischen Antikörper. Vor der Immundetektion erfolgte zur Unterscheidung endokriner und exokriner Gewebsstrukturen im Pankreasgewebe eine Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). In den HE-gefärbten Gewebeschnitten heben sich die Langerhansschen Inseln, die zu 80 % aus Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen, zu 15 % aus Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen sowie zu 5 % aus Somatostatin-produzierenden  $\delta$ - und Pankreas Polypeptid-produzierenden F-Zellen bestehen, deutlich vom umliegenden weniger kernreichen Drüsengewebe ab. Die Langerhans-Inseln stellen sich als kleine begrenzte Strukturen mit runden bis ovalen Zellkernen dar. Durch Hämatoxylin kommt es zu einer dunkelblauen Färbung der Zellkerne (siehe Abb. 4-13.).



**Abb. 4-13. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Pankreasschnitten nach Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung.** Abgebildet sind Paraffinschnitte des Pankreas, mit einem Querschnitt durch eine Langerhans-Insel einer (A) Wildtyp und einer (B) TRPM3-*Knockout*-Maus nach HE-Färbung.

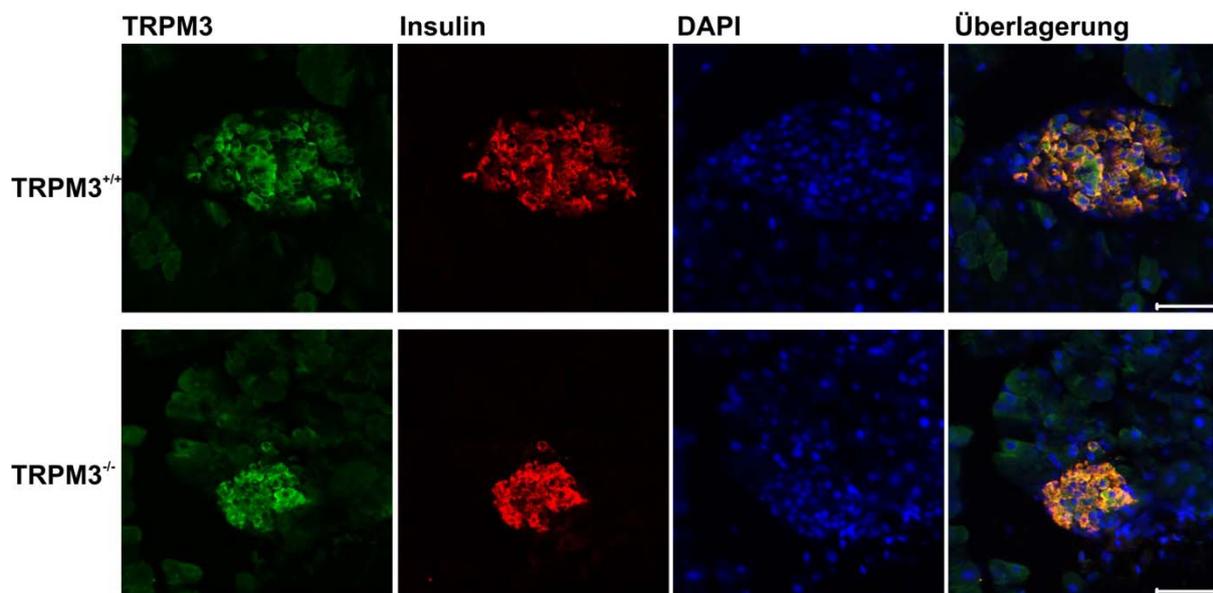
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse konnte hier im Rahmen der indirekten Immundetektion (siehe Abb. 4-14.) in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten des Pankreas ein Nachweis von Melastatin (TRPM1) in den Langerhans-Inseln sowohl in Wildtyp als auch in TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren (grün) erbracht werden. Aufgrund der Gegenfärbung der Inseln mit einem Insulin-spezifischen Antikörper (rot) zeigen die Färbungen zudem, dass das TRMP1-Protein hauptsächlich in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen exprimiert wird. Zur besseren Identifizierung der Inseln wurden die Kerne mit dem interkallierenden Farbstoff DAPI angefärbt (blau).



**Abb. 4-14. Immunfluoreszenz-Antikörper-Doppelfärbung von TRPM1 und Insulin in murinen  $\beta$ -Zellen.** Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Paraffinschnitten der Langerhans-Inseln einer Wildtyp- (TRPM3<sup>+/+</sup>) und einer TRPM3-*Knockout*- (TRPM3<sup>-/-</sup>) Maus nach Färbung mit Antikörpern gegen TRPM1 (grün) und Insulin (rot). Mit DAPI erfolgte eine Zellkernfärbung (blau). Eine Kolokalisation von TRPM1 und Insulin ist durch Überlagerung der Fluoreszenz-Einzelaufnahmen dargestellt. Der Balken entspricht einer Größe von 50  $\mu$ m.

Die Fluoreszenzaufnahmen zur Bestimmung der Expression von TRPM3 zeigten eine Lokalisation des TRPM3-Proteins in den Langerhans-Inseln (grün) an. Durch eine Gegenfärbung der Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen mit einem Insulin-spezifischen Antikörper (rot) ist eine Kolokalisation von TRPM3 mit dem Peptidhormon Insulin detektierbar (gelb) und ergibt einen Nachweis einer Proteinexpression von TRPM3 in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas sowohl in TRPM3<sup>+/+</sup>- als auch TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen (siehe Abb. 4-15.).

Die auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren offensichtlichen Größenunterschiede zwischen den Langerhans-Inseln aus TRPM3<sup>+/+</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren, ergaben sich aus den zufällig ausgewählten Bildausschnitten und somit der zufällig ausgewählten Insel. Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen dieser Arbeit statistisch nicht weiter untersucht.



**Abb. 4-15. Immunhistochemischer Nachweis des TRPM3 in murinen  $\beta$ -Zellen.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Pankreasschnitten einer Wildtyp- (TRPM3<sup>+/+</sup>) und einer TRPM3-*Knockout*- (TRPM3<sup>-/-</sup>) Maus nach Färbung mit Antikörpern gegen TRPM3 (grün) und Insulin (rot). Eine Zellkernanfärbung erfolgte durch DAPI (blau). Eine Kolokalisation von TRPM3 und Insulin ist durch Überlagerung der Fluoreszenzeinzelaufnahmen gezeigt. Der Balken entspricht einer Größe von 50  $\mu$ m.

Neben der Proteinexpression von TRPM1 konnte TRPM3 in Insulin-sezernierenden Zellen nachgewiesen werden. Die im Pankreasgewebe nachgewiesene TRPM1- und TRPM3-Expression konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz dem endokrinen Anteil des Pankreas zugeordnet werden.

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Proteinexpression von TRPM1 und TRPM3 konnte sowohl für die TRPM1<sup>-/-</sup>- als auch für die TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie der Nachweis geführt werden, dass die beabsichtigte *Knockout*-Strategie von Lexicon nicht zum Verlust der Proteine führte, da die Proteine mit ihren jeweiligen spezifischen Antikörper noch

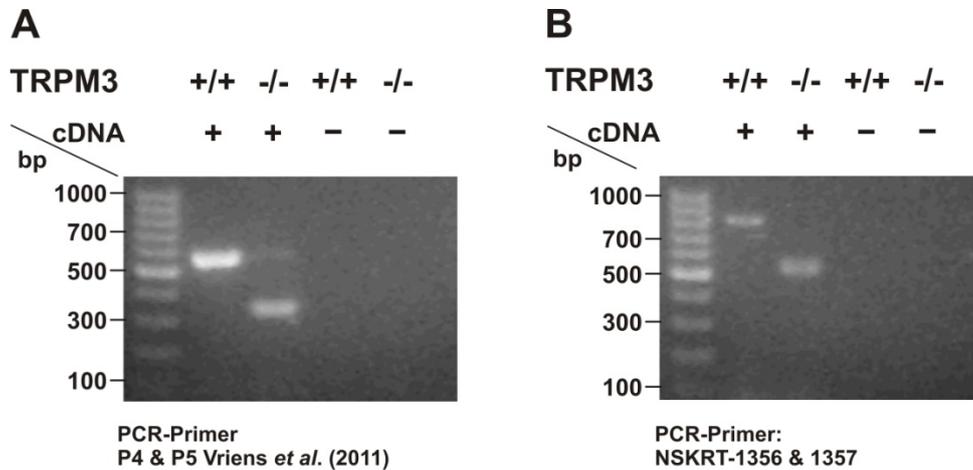
nachweisbar waren. Um diesen Umstand genauer zu analysieren, habe ich mich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie konzentriert und diese weiter charakterisiert, um den Grund für die nachgewiesenen TRPM3-Proteinexpression in TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen zu untersuchen.

#### 4.2.5 Charakterisierung einer TRPM3-Knockout-Mauslinie mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Da in den Western Blot Analysen von verschiedenen Geweben der Nachweis von TRPM3 in TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden konnte und diese Ergebnisse zusätzlich durch immunhistochemische Färbungen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen bestätigt wurden, stellte sich die Frage, warum das TRPM3-Protein in TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen detektierbar war, obwohl die Genotypisierungen eine Deletion des Exons 17 bestätigten. Um zu überprüfen, ob es sich um einen klassischen- oder einen pseudo-Knockout handelt, wurde das Genexpressionsmuster von TRPM3 in Wildtyp und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus TRPM3-exprimierendem Mausgewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach erfolgreicher reverser Transkription von aus Gehirn gewonnener RNA von TRPM3<sup>+/+</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine anschließende Amplifikation mit spezifischen Primern in den Zielsequenzen von TRPM3 durchgeführt. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen zeigten die amplifizierten Fragmente bei den verwendeten cDNA-Proben eine distinkte Bande im Agarosegel.

Für die PCR-Reaktionen wurden zunächst spezifische Oligonukleotide (Primer) gewählt, die in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zum Nachweis eines klassischen TRPM3-Knockouts in der von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated hergestellten TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie auf mRNA-Ebene verwendet wurden (Vriens *et al.*, 2011). In den RT-PCR-Analysen von TRPM3<sup>-/-</sup>- und TRPM3<sup>+/+</sup>-Mäusen wurde ein zu erwartendes spezifisches Fragment mit einer Größe von 551 bp für TRPM3 in der Wildtyp-PCR amplifiziert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Vriens *et al.* (2011), die kein Fragment in den TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren amplifizieren konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Amplifikationsreaktion ein um 229 bp kleineres Fragment mit einer Größe von ca. 322 bp nachgewiesen (siehe Abb. 4-16. A). Dieses Primerpaar deckte jedoch nur einen engen Bereich um das Exon 17 ab. Für eine Validierung des Ergebnisses wurde ein zweites Primerpaar gewählt, das einen größeren Bereich um Exon 17 herum abdeckte. Damit konnte in TRPM3<sup>+/+</sup>-Mäusen ein Fragment mit

einer Größe von 780 bp sowie ein um 229 bp kleineres Produkt mit einer Größe von ca. 551 bp bei TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren amplifiziert werden (siehe Abb. 4-16. B). Die erzielten Fragmentgrößen entsprachen den vorhergesagten Längen.



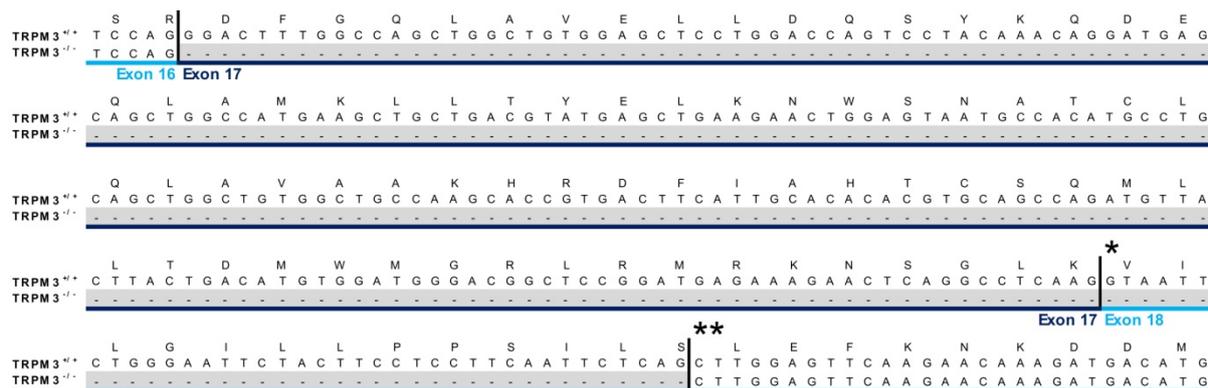
**Abb. 4-16. TRPM3 in Wildtyp und TRPM3-Knockout-Mäusen.** Gezeigt sind RT-PCRs von mRNA aus TRPM3<sup>+/+</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen mit unterschiedlichen Sets von spezifischen Oligonukleotiden. (A) Amplifiziert wurde ein spezifisches Fragment für TRPM3<sup>+/+</sup> bei 551 bp sowie ein Fragment bei 322 bp für TRPM3<sup>-/-</sup>. (B) Ein spezifisches Fragment war für TRPM3<sup>+/+</sup> bei 780 bp und ein Fragment bei 551 bp in TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren detektierbar. Mitgeführt wurden entsprechende Negativkontroll-PCRs ohne cDNA.

Die sichtbaren Unterschiede in den Intensitäten zwischen den Wildtyp-Banden von 551 bp für das verwendete Primerpaar P4 & P5 sowie von 780 bp für das eingesetzte Primerpaar NSKRT-1356 & 1357 basieren auf den Positionen der verwendeten Oligonukleotidpaare. Aus den Längen der PCR-Banden konnte kein direkter Aufschluß über die widersprüchlichen Proteinbefunde erreicht werden. Daher wurden die erhaltenen DNA-Fragmente isoliert und sequenziert.

#### 4.2.6 Sequenzanalyse der durch RT-PCR erhaltenen Amplifikate von TRPM3

Die Auswertung der Sequenzanalyse erbrachte den Nachweis, dass die in beiden RT-PCR-Reaktionen von Wildtyp-Tieren erhaltenen Amplifikate, der publizierten TRPM3-Protein-kodierenden Sequenz entsprechen. Beim Vergleich, der mit beiden Primerpaaren durchgeführten RT-PCR-Reaktionen von TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren waren jedoch signifikante Unterschiede detektierbar. Das erhaltene PCR-Produkt aus den RT-PCRs von TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren mit dem Primerpaar von Vriens *et al.* (2011) P4 & P5 zeigte die Transkription einer um 229 bp verkürzten mRNA und wies auf eine Deletion in Exon 17 hin, die in einem Frameshift resultiert. Bei dem in den RT-PCRs von TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren

verwendeten spezifischen Oligonukleotidpaar NSKRT 1356 & 1357, dass einen weiteren Bereich im TRPM3-Gen abdeckte, wurde ebenfalls eine Deletion in Exon 17 nachgewiesen sowie überraschend eine zusätzliche Deletion von 38 bp in Exon 18. Diese zusammen 267 bp große Deletion resultiert in dem Erhalt des Leserahmens des TRPM3-Gens und somit zu einer In-Frame-Deletion von 89 Aminosäuren des TRPM3-Proteins (siehe Abb. 4-17.). Ein Unterschied von 89 Aminosäuren ist bei der Analyse von 1325 AS kodierenden bzw. 1707 AS kodierenden Proteinen nicht als Laufunterschied in den Western Blot Analysen erkennbar.



**Abb. 4-17. Sequenzanalyse und Sequenzvergleich von TRPM3-Wildtyp und TRPM3-KO.** Gezeigt sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen und die korrespondierende Aminosäuresequenz des TRPM3-Gens von Exon 16, 17 und beginnendem Exon 18 einer TRPM3-Wildtyp (TRPM3<sup>+/+</sup>) und einer TRPM3-Knockout (TRPM3<sup>-/-</sup>)-Maus. Ein Strich in der Sequenz entspricht einer deletierten Nukleinbase. \* zeigt den üblichen Exon/Exon-Übergang der hier zur Deletion von 229 bp mit Leserasterverschiebung führt. \*\* zeigt die Position des neuen Exon/Exon-Übergangs, der eine Deletion von 38 bp und dadurch eine Deletion von 89 AS unter Erhalt des Leserasters bedingt.

Um im rekombinanten System zu überprüfen, ob die Deletionsmutante von TRPM3 noch funktionell ist und in den gleichen Kompartimenten wie das TRPM3-Wildtyp-Protein lokalisiert ist, wurde *in vitro* eine TRPM3-Deletionsmutante hergestellt und charakterisiert.

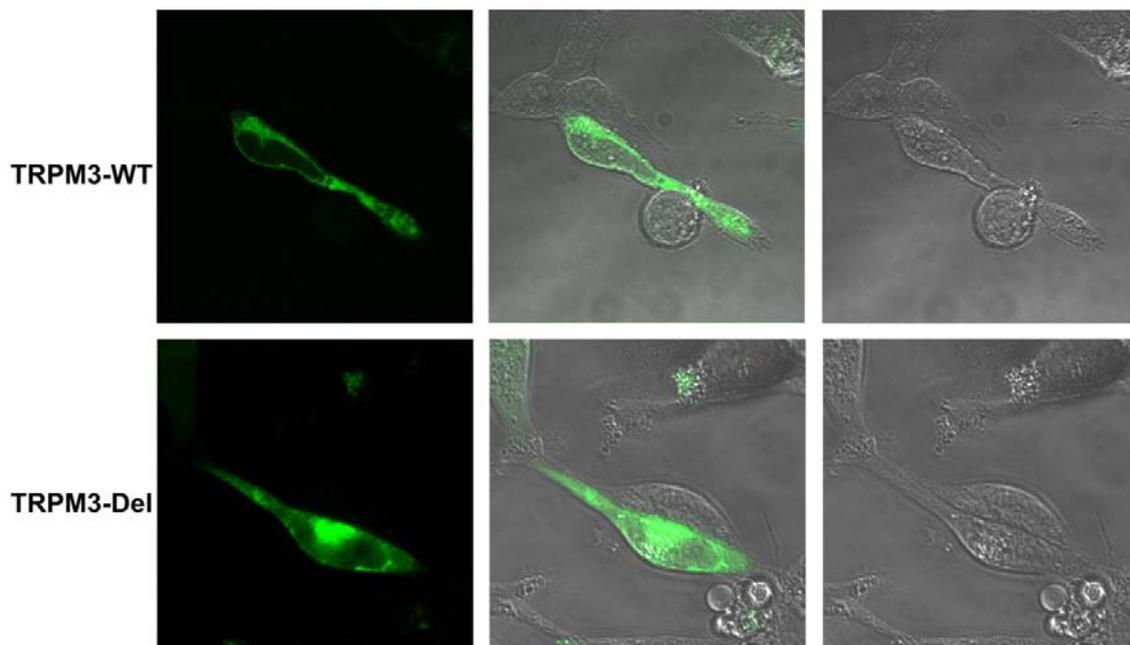
### 4.3 Generierung und Charakterisierung der TRPM3-Deletionsmutante im heterologen Expressionssystem

Für eine spezifische Analyse des um 89 Aminosäuren verkürzten TRPM3-Proteins im rekombinanten System hinsichtlich Funktion und Expression, wurde aus den in der Arbeitsgruppe bereits generierten und C-terminal mit YFP bzw. CFP fusionierten TRPM3-Wildtyp-cDNAs entsprechende cDNAs von TRPM3-Deletionsmutanten (TRPM3-Del) hergestellt. Als Ausgangs-cDNA wurde dabei die in früheren Versuchen bereits zur Charakterisierung der TRPM3-Funktion verwendete TRPM3-Variante eingesetzt, die für ein 1325 Aminosäuren langes Protein kodiert. Diese wurde im Verlauf der

vorliegenden Arbeit als TRPM3-WT und die daraus generierte Deletionsmutante als TRPM3-Del bezeichnet. Nach Mutagenese und Überprüfung der kodierenden Sequenzen der TRPM3-CFP- bzw. TRPM3-YFP-Deletionskonstrukte wurde das deletierte Protein im heterologen Expressionssystem analysiert.

#### 4.3.1 Subzelluläre Lokalisation und Verteilung von TRPM3-Wildtyp und TRPM3-Deletionsmutante

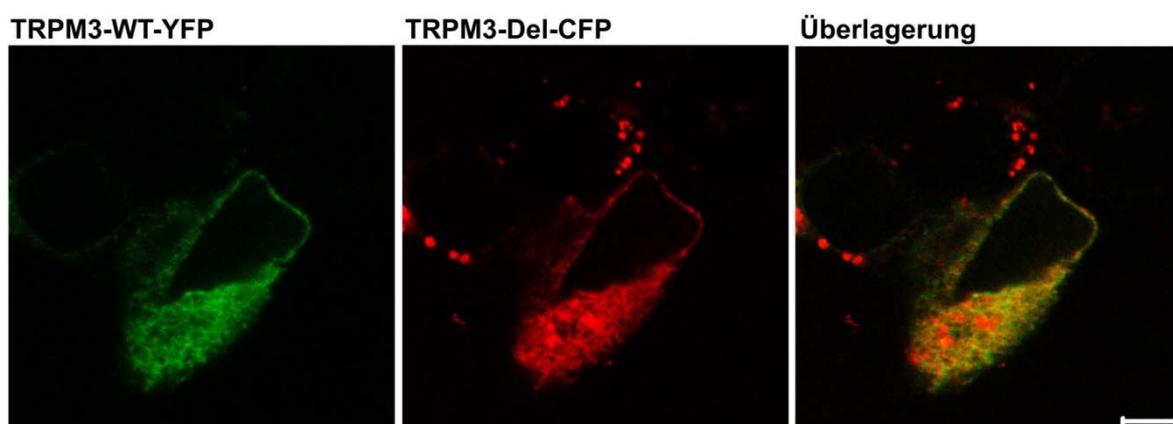
Zunächst wurde TRPM3-Del hinsichtlich seiner subzellulären Verteilung im heterologen Expressionssystem untersucht und mit der Lokalisation des Wildtyp-TRPM3 (TRPM3-WT) verglichen. Für die Lokalisationsstudien wurden die vorhandenen C-terminalen YFP-Fluoreszenzanteile genutzt, die in Calcium-Imaging Versuchen der Identifikation transfizierter Zellen dienen. Die Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in HEK293 Zellen eingebracht. Die Expression beider TRPM3-YFP-Proteine wurde nachfolgend mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops untersucht (Abb. 4-18.). Die Aufnahmen der Fluoreszenzen beider mit YFP-fusionierten Konstrukte zeigten, dass die jeweils gebildeten TRPM3-Proteine nicht ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert waren, sondern primär deutliche Anteile in intrazellulären Kompartimenten detektierbar waren. Zusätzlich waren jeweils vesikelartige intensiv gefärbte Strukturen erkennbar.



**Abb. 4-18. Lokalisation von TRPM3-Wildtyp und TRPM3-Deletionsmutante in HEK293 Zellen.** Dargestellt sind licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C-terminalen YFP-Konstrukten von TRPM3-WT und TRPM3-Del 72 h nach Transfektion in HEK293 Zellen.

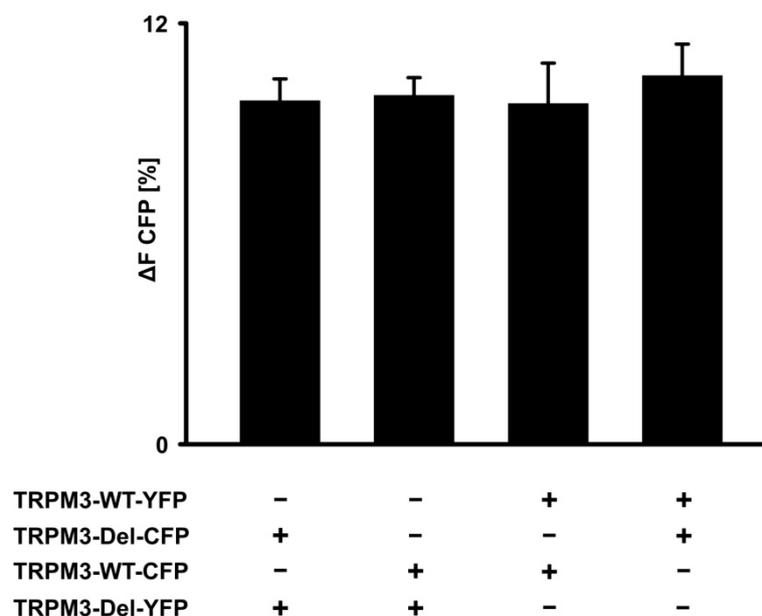
### 4.3.2 Bildung von Heteromeren zwischen TRPM3-Wildtyp und -Deletionsmutante

Für TRP-Kanäle gibt es experimentelle Hinweise, dass sie funktionelle Tetramere durch Homo- oder Heteromultimerisation bilden (Hofmann *et al.*, 2002), deshalb wurde im Folgenden überprüft, ob es auch zwischen TRPM3-WT und TRPM3-Del zur Bildung von Heteromeren kommen kann. Die FRET-Technik eignet sich um Proteininteraktionen *in vivo* nachzuweisen. Eine homomere sowie eine heteromere Interaktion zwischen zwei Spleißvarianten von TRPM3 (Grimm, 2004) sowie eine Homo- und Heteromerisierung von TRPM6 und TRPM7 konnte bereits gezeigt werden (Chubanov *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Um eine mögliche Interaktion von TRPM3-Wildtyp und TRPM3-Deletionsmutante zu untersuchen, wurde die Möglichkeit sowohl einer Homo- als auch einer Heteromultimerbildung von beiden Proteinen nach Kotransfektion in HEK293 Zellen mittels FRET-Messungen analysiert. Hierfür wurden HEK293 Zellen mit TRPM3-WT-YFP-Konstrukten sowie CFP-fusionierten TRPM3-Del-Konstrukten im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Der Nachweis einer Kolo-kalisation der gebildeten Proteine erfolgte mittels Laser-Scanning-Mikroskopie. In den Koexpressionsstudien konnte für TRPM3-WT und TRPM3-Del gezeigt werden, dass beide Proteine in identischen Kompartimenten vorlagen (siehe Abb. 4-19.). Zusätzlich zeigte sich für das CFP-Fusionskonstrukt von TRPM3-Del eine im Vergleich zu den Wildtyp-YFP-Konstrukten deutlich stärkere Expression und Akkumulation in vesikelartigen Strukturen. Dieser Aspekt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, da für die Funktion von TRPM3 die plasmamembranäre Lokalisation im Vordergrund steht.



**Abb. 4-19. Bildung von TRPM3-Multimeren in HEK293 Zellen.** Gezeigt sind Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen der Kolo-kalisation von TRPM3-WT-YFP und TRPM3-Del-CFP in HEK293 Zellen nach Kotransfektion im Verhältnis 1:1. Der Balken entspricht einer Größe von 5 µm.

Um direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen porenbildenden Kanaluntereinheiten in lebenden Zellen aufzuzeigen, wurden anschließend die relativen Nähen der koexprimierten TRPM3-Konstrukte, die an ihren C-Termini mit CFP bzw. YFP fusioniert waren durch FRET-Analyse bestimmt. Das quantitative FRET-Signal erfolgte unter statischen Bedingungen durch Messung des Anstiegs der Donoremission während des selektiven Bleichens (*photobleach*) des Akzeptorfluorophors YFP bei 512 nm. Die Wiederherstellung der Donoremission, welche eine Messung der FRET-Effizienz ermöglicht, wurde bei 480 nm aufgezeigt und als prozentualer Anteil der CFP-Emission nach dem Bleichen der Akzeptorfluoreszenz angegeben. Die FRET-Effizienzen der Homo- und Heteromultimerbildung beider fluoreszierender TRPM3-Varianten lagen zwischen 9 % und 11 %, FRET-Effizienzen von weniger als 2 % wurden als nicht signifikant gewertet (Hofmann *et al.*, 2002). D.h. bei Koexpression von TRPM3-WT und TRPM3-Del in HEK293 Zellen werden heteromultimere Kanalkomplexe gebildet (siehe Abb. 4-20).



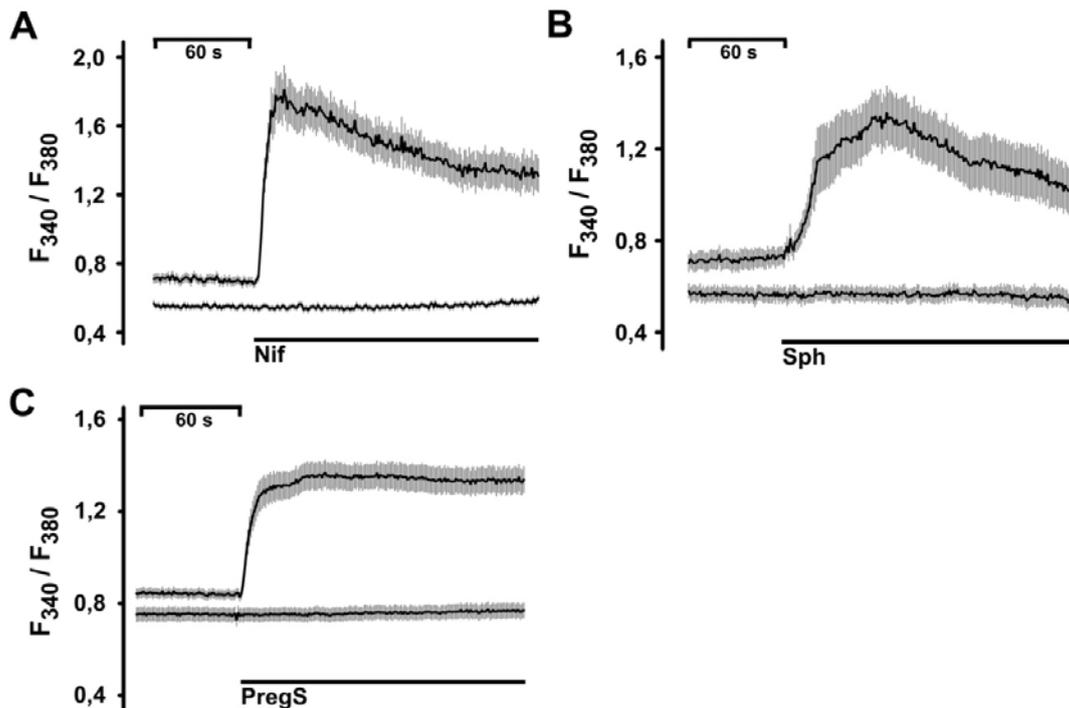
**Abb. 4-20. Bildung von TRPM3-Homo- und Heteromultimeren in HEK293 Zellen.** Gezeigt sind die FRET-Effizienzen als prozentuale Anstiege der CFP-Fluoreszenzen nach dem selektiven Bleichen (*acceptor bleach*) der jeweiligen YFP-Fluoreszenzen des TRPM3-Wildtyps und der TRPM3-Deletionsmutante. Aufgetragen sind die Mittelwerte ( $\Delta F_{\text{CFP}} \pm \text{SEM}$  (%)) von mindestens drei unabhängigen Kotransfektionsexperimenten, verschiedener in HEK293 Zellen koexprimierter Kombinationen von TRPM3-Wildtyp und deletiertem TRPM3-Protein fusioniert mit YFP oder CFP.

Für TRPM3-Wildtyp und TRPM3-Deletionsmutante konnte durch Kollaborationsstudien mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie und FRET-Analyse eine Proteininteraktion nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte die funktionelle Analyse der TRPM3-Deletionsmutante durch fluorometrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-AM.

### 4.3.3 Funktionelle Analyse der TRPM3-Deletionsmutante

Für eine funktionelle Analyse der TRPM3-Deletionsmutante wurde das Konstrukt als C-terminales YFP-Fusionsprotein in HEK293 Zellen exprimiert. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit Fura-2-AM in Standard Calcium-Messpuffer beladen und Calcium-Imaging Messungen durchgeführt. Die Aktivierbarkeit der TRPM3-Kanäle wurde durch Applikation der selektiven TRPM3-Aktivatoren Nifedipin, Pregnenolonsulfat (Wagner *et al.*, 2008) und *D-Erythro*-Sphingosin (Grimm *et al.*, 2005) untersucht. Nach Applikation von Nifedipin kam es zu einer direkten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei der TRPM3-WT-Variante, nicht jedoch bei der TRPM3-Deletionsmutante (siehe Abb. 4-21. A). Vergleichbare Aktivierungsergebnisse wurden durch Zugabe von Pregnenolonsulfat (siehe Abb. 4-21. B) und *D-Erythro*-Sphingosin (siehe Abb. 4-21. C) erhalten. Auch hier zeigten die Applikationen der Stimuli eine Aktivierbarkeit des TRPM3-WT-Proteins, während die exprimierte TRPM3-Deletionsmutante keine Aktivierung durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zeigte (siehe Abb. 4-21. A). Die geringere intrazelluläre Konzentration an basalem Calcium wies außerdem auf eine signifikant reduzierte Basalaktivität der Deletionsmutante hin und lässt vermuten, dass die Aktivität des konstitutiv aktiven Ionenkanals stark beeinträchtigt bzw. komplett inhibiert ist.



**Abb. 4-21.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten in TRPM3-WT und -Deletionsmutante exprimierenden HEK293 Zellen nach Applikation TRPM3-spezifischer Aktivatoren. Gezeigt sind die Mittelwerte  $F_{340}/F_{380} \pm \text{SEM}$  von repräsentativen Einzelexperimenten einer fluorometrischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung mit je 20 - 30 Einzelzellen nach Aktivierung durch 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin (Nif; A), 20  $\mu\text{M}$  D-Erythro-Sphingosin (Sph; B) und 35  $\mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat (PregS; C). Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Beispiel.

Die Charakterisierung der Deletionsmutante zeigte, dass das TRPM3-Kanalprotein, das in der *Knockout*-Mauslinie exprimiert wird, inaktiv ist und keine Kanalfunktion mehr vermitteln kann. Da in TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren ein funktionell inaktives Protein exprimiert wird, konnte die TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie als funktioneller *Knockout* charakterisiert werden. Dies erlaubt es in zukünftigen Versuchen mit TRPM3<sup>+/+</sup>- und TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren die physiologische und pathophysiologische Rolle des TRPM3 zu charakterisieren.

Neben der genetischen Inaktivierung zur Charakterisierung von TRPM3, ist es möglich seine physiologische und pathophysiologische Rolle in endogen TRPM3-exprimierenden Zellsystemen mit Hilfe kleiner inhibierender Moleküle zu untersuchen.

#### 4.4 Identifizierung eines selektiven TRPM3-Kanalblockers

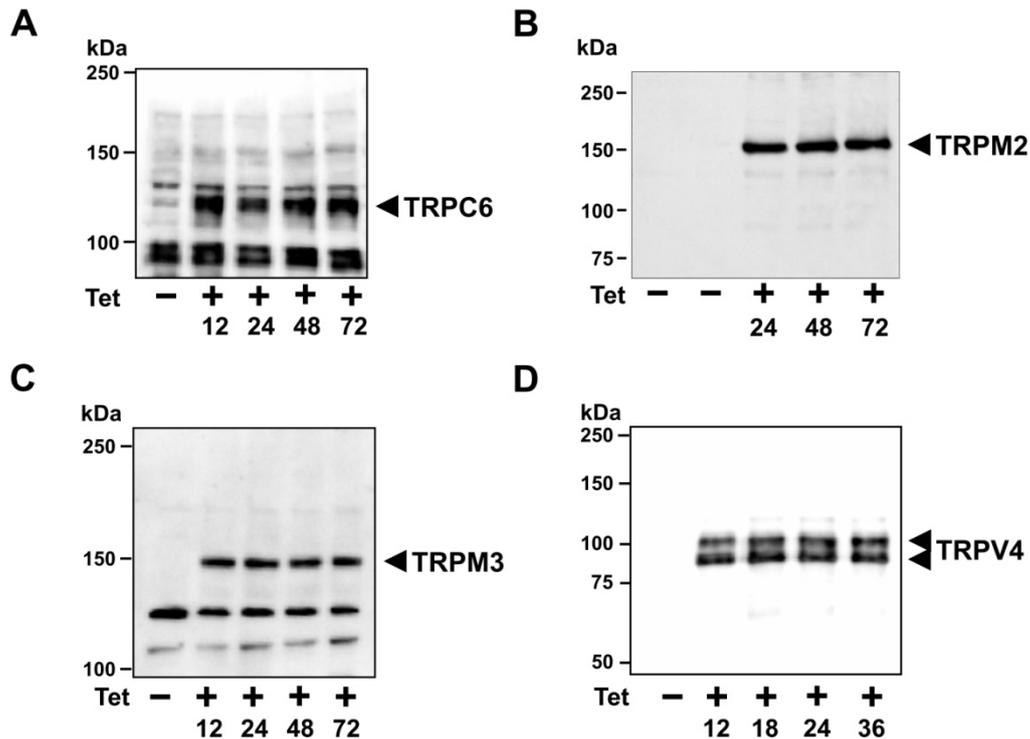
Neben einer Vielzahl bekannter TRPM3-spezifischer Aktivatoren stand zu Beginn meiner Arbeit kein adäquates pharmakologisches Werkzeug für die Hemmung von TRPM3 zur Verfügung. Deshalb untersuchten wir verschiedene Substanzklassen hinsichtlich ihrer TRPM3-blockierenden Eigenschaft.

#### 4.4.1 Biochemische und funktionelle Charakterisierung von stabil-TRP-Kanal-exprimierenden Zelllinien zur Identifikation eines selektiven Blockers

Um den inhibitorischen Effekt von unterschiedlichen Substanzklassen auf verschiedene TRP-Kanäle zu untersuchen, wurden zunächst Tetrazyklin-induzierbare, stabile Zelllinien generiert, die TRP-Kanäle von drei unterschiedlichen TRP-Kanalsubfamilien exprimierten, TRPC6, TRPM2, TRPM3 und TRPV4. Die generierten, stabilen Zelllinien wurden anschließend biochemisch und funktionell charakterisiert.

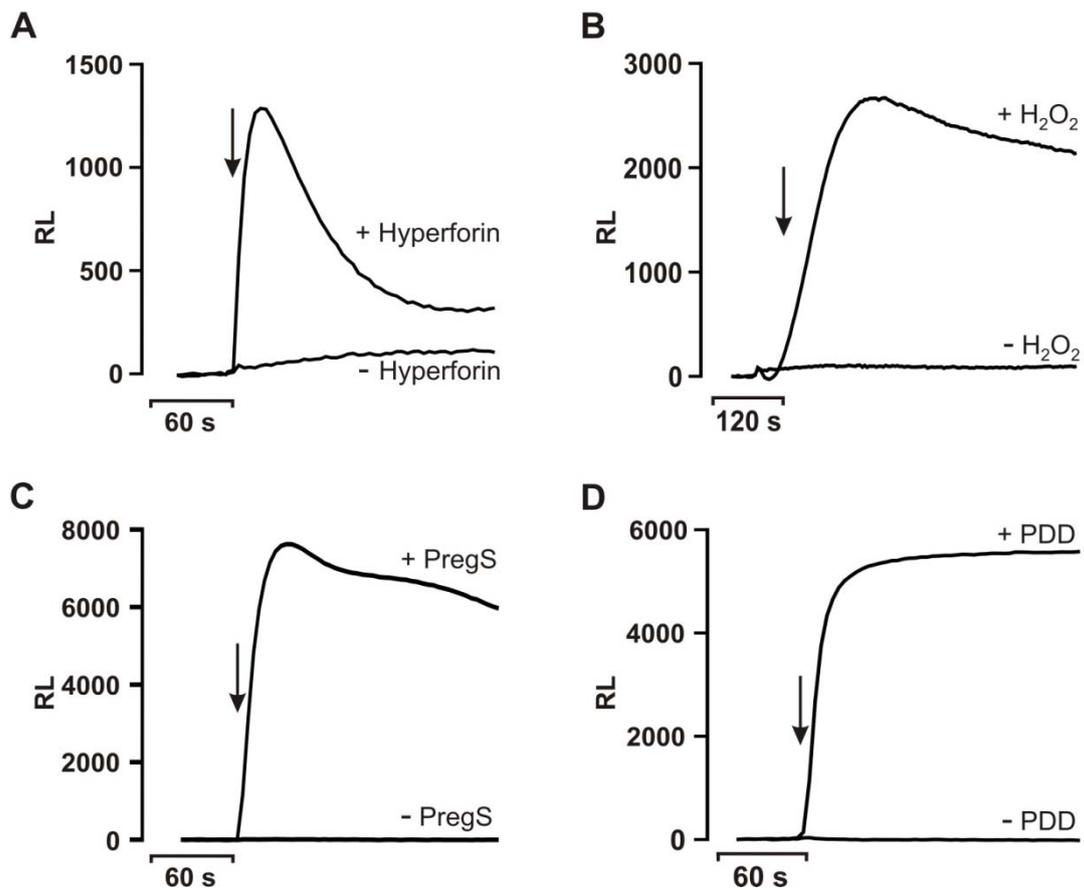
Wie die Abb. 4-21. zeigt, führt die permanente Expression von konstitutiv aktiven TRP-Kanälen zu einem Anstieg der basalen intrazellulären Calciumkonzentration. Da eine konstitutive TRP-Kanalaktivität über apoptotische und sekundäre, nekrotische Prozesse zum  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zelltod führen kann (Dadon & Minke, 2010), kamen bei der Herstellung stabiler Linien nur induzierbare Systeme in Betracht. Die Tetrazyklin-induzierte Expression der TRP-Isoformen wurde durch Western Blot Analysen charakterisiert (siehe Abb. 4-22.). Da die Zeiten für die Proteinexpression der einzelnen TRP-Kanäle im heterologen Expressionssystem variieren, wurden Membranlysate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tetrazyklingabe hergestellt und analysiert. In den Membranlysaten konnte mit korrespondierenden TRP-Isoform-spezifischen Antikörpern der jeweils exprimierte TRP-Kanal nachgewiesen werden. Die Generierung und Charakterisierung der verwendeten Antikörper, die gegen TRPM2, TRPM3 und TRPV4 gerichtet sind, wurde bereits beschrieben (Grimm *et al.*, 2003; Kraft *et al.*, 2006; Reiter *et al.*, 2006). Mit dem TRPV4-spezifischen Antikörper ist sowohl das glykosylierte (110 kDa) als auch das unglykosylierte (98 kDa) TRPV4-Protein (Xu *et al.*, 2006b) detektierbar (siehe Abb. 4-22. D). Die optimalen Expressionslevel von TRPC6, TRPM2, TRPM3 bzw. TRPV4 wurden 72, 24, 72 und 24 h nach entsprechender Tetrazyklininduktion der Proteinexpression erreicht.

Nachdem der Nachweis der Proteinexpression der verschiedenen TRP-Isoformen nach Induktion mit Tetrazyklin im heterologen Expressionssystem erfolgte, wurde die Funktionalität der stabil exprimierten TRP-Kanäle überprüft.



**Abb. 4-22. Nachweis stabil exprimierter TRP-Kanäle in HEK293 Zellen.** Für Western Blot Analysen der Tetrazyklin-induzierbaren Expression von TRP-Kanälen wurden Membranproteine von Zelllinien extrahiert, die stabil TRPC6 (A), TRPM2 (B), TRPM3 (C) oder TRPV4 (D) exprimieren. Gezeigt sind die biochemischen Analysen der Proteinexpressionen der einzelnen TRP-Kanäle durch Visualisierung mittels korrespondierender spezifischer Antikörper gegen TRPC6, TRPM2, TRPM3 bzw. TRPV4.

Die Zellen wurden mit dem Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 beladen und die Fluo-4-abhängige Fluoreszenz in An- und Abwesenheit des entsprechenden spezifischen Stimulus gemessen. Um die Tetrazyklin-abhängige funktionelle Proteinexpression zu untersuchen, wurde Hyperforin (10  $\mu$ M) für TRPC6 (siehe Abb. 4-23. A), Wasserstoffperoxid (5 mM) für TRPM2 (siehe Abb. 4-23. B), Pregnenolonsulfat (35  $\mu$ M) für TRPM3 (siehe Abb. 4-23. C) und 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoat (5  $\mu$ M) als selektiver Aktivator für TRPV4 (siehe Abb. 4-23. D) verwendet (Hara *et al.*, 2002; Leuner *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2002). Nach anfänglichen Unterschieden in der Qualität der Signale zwischen den verschiedenen Zelllinien konnte durch Veränderung der Expressionszeiten eine einheitliche reproduzierbare Qualität erreicht werden. Die Messungen erfolgten 72, 24, 72 und 24 h nach Tetrazyklininduktion von TRPC6, TRPM2, TRPM3 bzw. TRPV4.



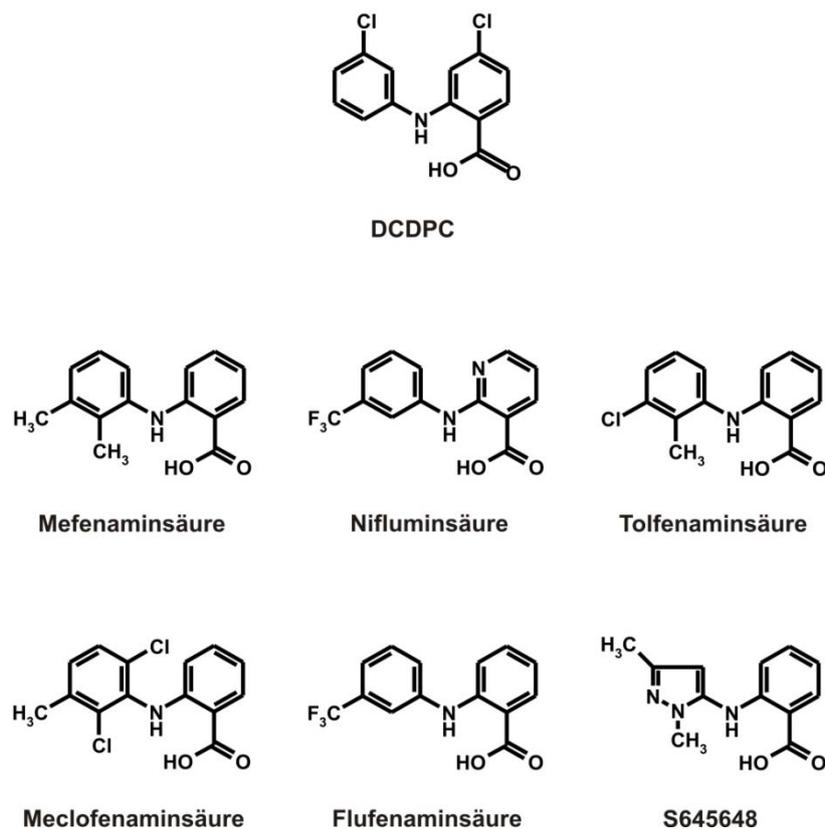
**Abb. 4-23. Funktionelle Charakterisierung von Tetrazyklin-induzierbaren stabil Transient Receptor Potential (TRP) Kanal exprimierenden HEK293 Zelllinien.** Nach Tetrazyklin- (2,5 mg/ml) induzierter TRP-Expression wurden die Zellen mit Fluo-4 für das Calcium-Imaging beladen. Die Fluo-4-abhängige Fluoreszenz wurde in An- und Abwesenheit des jeweiligen spezifischen Stimulus gemessen. TRPC6-exprimierende Zellen wurden mit Hyperforin (10  $\mu$ M), TRPM2-exprimierende Zellen mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 mM), TRPM3-exprimierende Zellen mit Pregnenolonsulfat (PregS, 35  $\mu$ M) und TRPV4-exprimierende Zellen mit 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoat (PDD, 5  $\mu$ M) stimuliert.

#### 4.4.2 Effekte von Fenamaten auf TRPM3 und andere Mitglieder der TRP-Kanalfamilie

Gegenwärtig stehen nur wenige größtenteils nicht-selektive Blocker zur pharmakologischen Modulation von TRP-Kanälen zur Verfügung. Einige dieser inhibierenden Substanzen, die als pharmakologische Werkzeuge im Einsatz sind, werden für spezifische TRP-Kanäle als selektiv dargestellt, obgleich eine Selektivität im Hinblick auf andere TRP-Kanäle bislang nicht validiert wurde. Die Verwendung dieser Blocker geht mit dem Risiko einher, dass eine Selektivität nicht sichergestellt ist und beobachtete Effekte möglicherweise durch Modulation anderer TRP-Kanäle vermittelt werden. Um einen neuen synthetischen TRPM3-selektiven Blocker zu identifizieren, wurden in einem ersten Satz von Experimenten verschiedene Substanzklassen, deren Kernstrukturen vielversprechend schienen, bezüglich ihrer

blockierenden Eigenschaften auf TRPM3 und weiterer TRP-Kanäle, die die Porenregionen von drei verschiedenen TRP-Unterfamilien (TRPC6, TRPM2, TRPM3 und TRPV4) repräsentieren als Selektivitätskontrollen getestet. Hierzu wurden zunächst u.a. Substanzen wie 1- $\beta$ [3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl-1H-Imidazolhydrochlorid (SK&F 96365), 2-Aminoethoxydiphenylborat (Bootman *et al.*, 2002), N-(p-Amylzinnamoyl)anthranilsäure (Harteneck *et al.*, 2007) und Clotrimazol analysiert, chemische Verbindungen für die bereits eine modulierende Wirkung beschrieben wurde. Die erhaltenen Ergebnisse dieser initialen Experimente zeigten jedoch, dass Clotrimazol, SK&F 96365, ACA und 2-APB die hier untersuchten TRP-Kanäle mit vergleichbarer Wirksamkeit blockieren und somit als übergreifende TRP-Kanalblocker klassifiziert werden können.

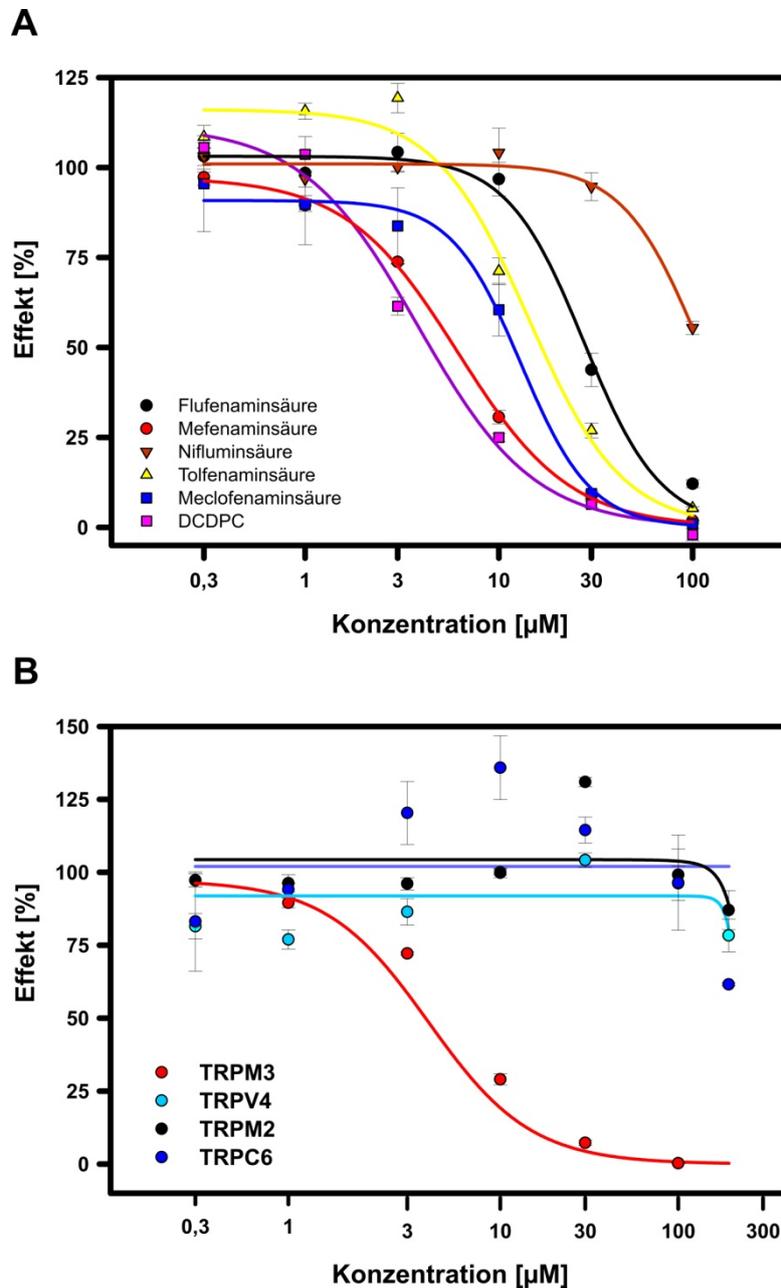
Da das Fenamat Flufenaminsäure zudem bereits als nicht-selektiver TRP-Kanalblocker beschrieben wurde (Tesfai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003b; Guinamard *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Guilbert *et al.*, 2009), stellte sich daraufhin die Frage, ob möglicherweise in der Substanzklasse der Fenamate ein TRPM3-selektiver Blocker identifizierbar sein könnte. Hierzu wurden die Fenamate Flufenaminsäure, Nifluminsäure, S645648, DCDPC, Meclofenaminsäure, Tolfenaminsäure und Mefenaminsäure auf ihre blockierenden Eigenschaften auf verschiedene TRP-Kanäle untersucht. Die Strukturformeln der untersuchten Fenamate sind in Abb. 4-24. dargestellt.



**Abb. 4-24. Strukturen der getesteten Fenamate.** Flufenaminsäure (N-[3-Trifluoromethyl]-phenyl]anthranilsäure), Nifluminsäure (2-{{3-Trifluoromethyl}-phenyl}amino}nikotinsäure), S645648 (N-(1,3-Dimethyl-5-Pyrazolin)anthranilsäure), DCDPC (3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-carboxylsäure), Meclofenaminsäure (N-(2,6-Dichloro-3-methylphenyl)anthranilsäure), Tolfenaminsäure (N-(2-Methyl-3-chlorophenyl)anthranilsäure) und Mefenaminsäure (2-(2,3-dimethylphenyl)anthranilsäure).

Für die Untersuchung quantitativer Effekte eines neuen selektiven Blockers von TRP-Kanälen wurden Konzentrationswirkungskurven verschiedener Fenamate hinsichtlich eines blockierenden Effekts auf die untersuchten TRP-Kanäle erstellt (siehe Abb. 4-25.). Hierzu wurden TRPC6-, TRPM2-, TRPM3- bzw. TRPV4-exprimierende, Fluo-4-beladene HEK293 Zellen mit ihren spezifischen Aktivatoren Hyperforin, Wasserstoffperoxid, Pregnenolonsulfat bzw. 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoat nach Applikation des Fenamats stimuliert. In Abb. 4-25. A sind die aus den Einzelversuchen abgeleiteten Konzentrationswirkungskurven in Anwesenheit von Flufenaminsäure, Nifluminsäure, DCDPC, Meclofenaminsäure, Tolfenaminsäure und Mefenaminsäure für TRPM3 dargestellt. Alle getesteten Fenamate sind in der Lage TRPM3 Konzentrationsabhängig zu inhibieren (siehe Abb. 4-25. A). Entsprechende Abbildungen wurden auch für TRPC6, TRPM2 sowie TRPV4 erstellt. Bei der Darstellung der Konzentrationswirkungskurven des Effektes eines Wirkstoffs hinsichtlich der untersuchten TRP-Kanäle fiel auf, dass Mefenaminsäure nur TRPM3 blockiert (siehe Abb. 4-25. B). Mefenaminsäure stellt einen TRPM3-selektiven Blocker dar, wobei die halbmaximale Inhibition (IC<sub>50</sub>) bereits bei einer Konzentration von 6,6  $\mu$ M zu beobachten ist. Die anderen

TRP-Kanäle werden erst ab einer Konzentration größer 300  $\mu\text{M}$  moduliert. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten je TRP-Kanal und Fenamat gemittelt und sind in Tabelle 4-1. dargestellt.



**Abb. 4-25. Konzentrationswirkungskurven verschiedener Fenamate an TRP-Kanälen.** (A) Gezeigt ist die Wirkung verschiedener Fenamate (Flufenaminsäure, Nifluminsäure, DCDPC, Meclofenaminsäure, Tolfenaminsäure und Mefenaminsäure) in einem Konzentrationsbereich von 0,3 - 100  $\mu\text{M}$  auf den Calcium-Einstrom von TRPM3-stabil exprimierender und Fluo-4-beladener HEK293 Zellen nach Zugabe von Pregnenolonsulfat (35  $\mu\text{M}$ ). Abgebildet sind die Konzentrationswirkungskurven eines repräsentativen FLIPR<sup>Tetra</sup>-Experiments von n = 3 Experimenten mit Quadruplikaten je eingesetzter Konzentration. (B) Gezeigt ist der Effekt von Mefenaminsäure auf den Calciumeinstrom in Fluo-4-beladenen TRPC6-, TRPM2-, TRPM3-, bzw. TRPV4-stabil exprimierenden HEK293 Zellen nach Zugabe von Hyperforin (10  $\mu\text{M}$ ), Wasserstoffperoxid (5 mM), Pregnenolonsulfat (35  $\mu\text{M}$ ) bzw. 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didekansäureester (5  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt ist ein repräsentatives FLIPR<sup>Tetra</sup>-Experiment von n = 3 Experimenten mit Quadruplikaten je verwendetem TRP-Kanal.

**Tabelle 4-1. Inhibitorischer Effekt (IC<sub>50</sub>-Werte) der getesteten Fenamate auf verschiedene Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle.**

	TRPC6	TRPM2	TRPM3	TRPV4
DCDPC	16,4 ± 3,1 µM	31,1 ± 3,4 µM	7,5 ± 4,7 µM	8,6 ± 1,8 µM
Flufenaminsäure	7,1 ± 7,2 µM	155,1 ± 50,6 µM	33,1 ± 8,3 µM	40,7 ± 10,3 µM
Nifluminsäure	40,2 ± 20,1 µM	> 300 µM	123,5 ± 24,3 µM	84,4 ± 11,9 µM
Mefenaminsäure	> 300 µM	> 300 µM	6,6 ± 1,8 µM	> 300 µM
Meclofenaminsäure	37,5 ± 14,4 µM	75,8 ± 33,6 µM	13,3 ± 3,5 µM	40,7 ± 10,2 µM
S645648	>300 µM	> 300 µM	> 300 µM	> 300 µM
Tolfenaminsäure	12,3 ± 4,8 µM	96,1 ± 10,8 µM	11,1 ± 2,7 µM	23,9 ± 7,1 µM

Basierend auf den IC<sub>50</sub>-Werten der Tabelle 4-1. konnten Wirksamkeitsreihenfolgen bezogen auf den jeweils untersuchten TRP-Kanal (siehe Tabelle 4-2.) bzw. das untersuchte Fenamat (siehe Tabelle 4-3.) erstellt werden.

**Tabelle 4-2. Reihenfolge der Fenamate in Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit verschiedene Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle zu blocken.**

TRPC6	TOL ~ DCDPC ~ FLU > MEC ~ NIF > S645648, <b>MEF</b>
TRPM2	DCDPC > MEC > TOL > FLU > NIF, S645648, <b>MEF</b>
TRPM3	<b>MEF</b> > DCDPC > TOL ~ MEC > FLU > NIF > S645648
TRPV4	DCDPC > TOL > FLU, MEC > NIF > S645648, <b>MEF</b>

Interessanterweise führte die Substanz S645648, eine Dimethyl-pyrazolin Anthranilsäure bei keinem der verwendeten TRP-Kanäle zu einem erfolgreichen Block und wurde bei weiterführenden Experimenten nicht berücksichtigt. Die Nifluminsäure zeigte eine geringere Wirksamkeit als Flufenaminsäure bei der Inhibition der in dieser Arbeit analysierten TRP-Kanäle. Die Mono- und Dichloro-methyl-phenyl Anthranilsäure-Derivate Meclofenaminsäure und Tolfenaminsäure sowie das Mono-chloro-phenyl-chloro-Anthranilsäure-Derivat DCDPC zeigten sogar noch eine viel höhere Wirksamkeit bei der Inhibition der untersuchten TRP-Kanäle als Flufenaminsäure, mit Ausnahme von TRPC6, obwohl Flufenaminsäure bereits bei der Modulation von unterschiedlichen TRP-Kanälen Anwendung findet (siehe Tabelle 4-2.). Meclofenaminsäure und Tolfenaminsäure zeigten die gleiche Rangfolge in der Wirksamkeit der Inhibition bei allen untersuchten TRP-Kanälen, während DCDPC TRPV4 potenter als TRPC6 blockierte (siehe Tabelle 4-3.).

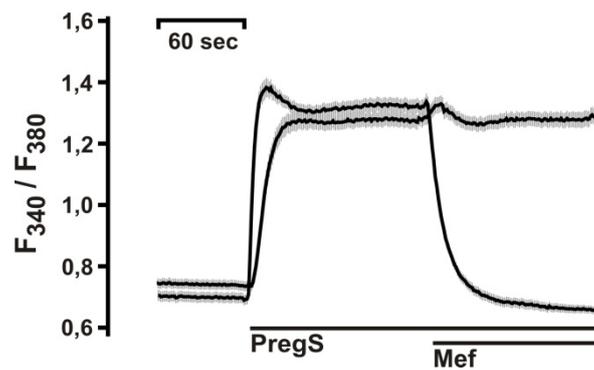
**Tabelle 4-3. Rangfolge untersuchter Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle, die in Abhängigkeit vom jeweiligen Fenamat am wirksamsten blockiert wurden.**

DCDPC	TRPM3 ~ TRPV4 > TRPC6 > TRPM2
Flufenaminsäure	TRPC6 > TRPM3 > TRPV4 > TRPM2
Nifluminsäure	TRPC6 > TRPV4 > TRPM3 > TRPM2
Mefenaminsäure	TRPM3 >> TRPV4, TRPC6, TRPM2
Meclofenaminsäure	TRPM3 > TRPC6 ~ TRPV4 > TRPM2
Tolfenaminsäure	TRPM3 ~ TRPC6 > TRPV4 > TRPM2

Zusammenfassend zeigte sich, dass DCDPC mit den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten in einem Bereich von 7,5-31  $\mu$ M der wirksamste, nicht-selektive TRP-Kanal-Blocker, bei den in dieser Untersuchung verwendeten TRP-Kanälen ist. Im Gegensatz dazu zeigte Mefenaminsäure eine herausragende Selektivität für TRPM3 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 6,6  $\mu$ M, der zwei Größenordnungen geringer ist als die Konzentrationen, bei der ebenfalls bedeutende inhibitorische Effekte auf weitere getestete TRP-Kanäle zu detektieren sind. Diese besondere Selektivität von Mefenaminsäure wurde anschließend näher in TRPM3-exprimierenden Zellen charakterisiert.

#### 4.4.3 Charakterisierung von Mefenaminsäure als selektiver TRPM3-Kanalblocker mit Hilfe der fluorometrischen Einzelzell-Calcium-Messung

Um die spezifische und selektive Inhibition der TRPM3-Aktivität durch Mefenaminsäure zu untersuchen, wurden Einzelzell-Calcium-Imaging-Messungen durchgeführt. Während bei den Fluo-4-basierten FLIPR-Imaging Experimenten die Inhibitoren vor Zugabe der Aktivatoren appliziert wurden, wurde in den anschließenden Einzelzell-Calcium-Messungen untersucht, ob die Reihenfolge der Zugabe von Aktivatoren und Inhibitoren einen Einfluß auf die blockierende Wirkung von Mefenaminsäure hat. Die Zugabe von Pregnenolonsulfat (35  $\mu$ M) führte zu einer raschen und anhaltenden Zunahme von  $[Ca^{2+}]_i$  in mit TRPM3-cDNA transient transfizierten HEK293 Zellen. Die anschließende Zugabe von Mefenaminsäure in Anwesenheit des Aktivators, bei einer maximalen, aktiven Konzentration von 30  $\mu$ M reduzierte schnell und komplett die Zunahme des  $[Ca^{2+}]_i$  auf den Ausgangswert (siehe Abb. 4-26.). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Reihenfolge der Applikation der Substanzen keinen Einfluss auf die blockierende Aktivität von Mefenaminsäure hat.



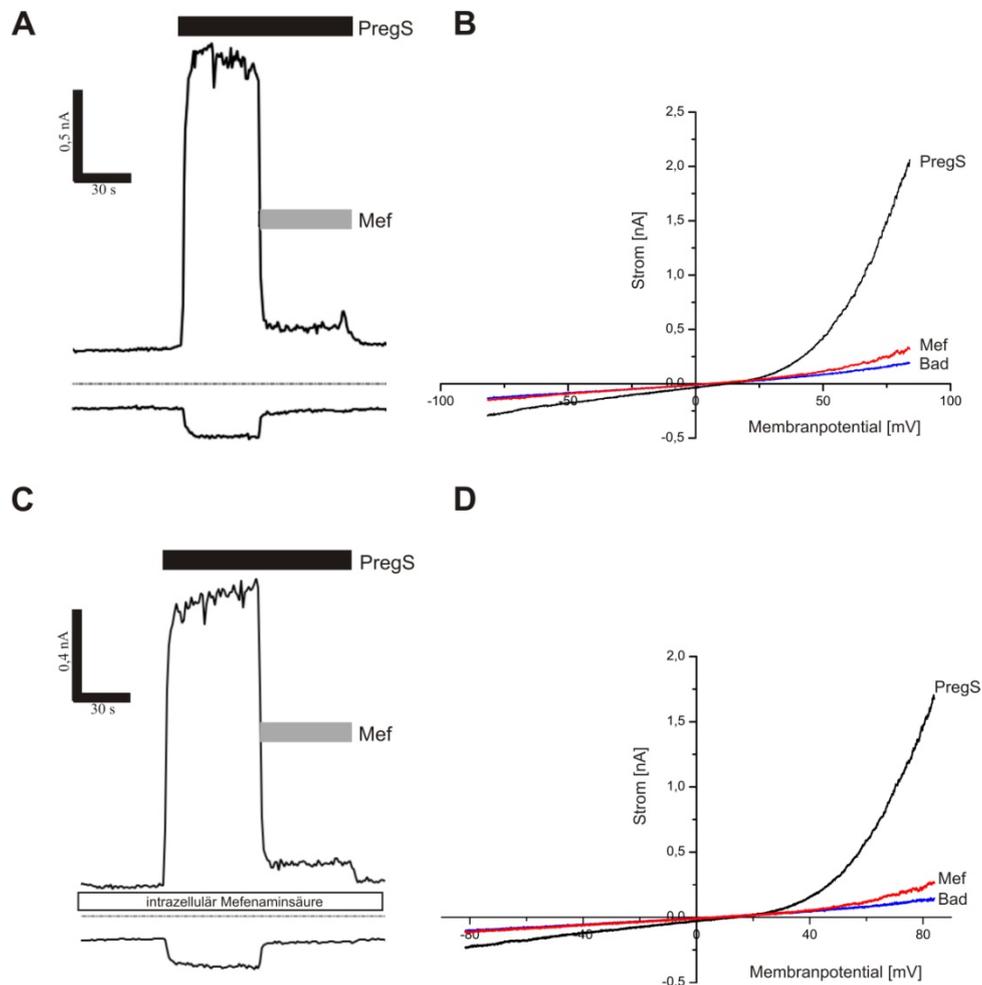
**Abb. 4-26. Inhibition der  $[Ca^{2+}]_i$  in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen.** Fluorometrische Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  von Fura-2-beladenen transient transfizierten TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen nach Stimulation mit  $35 \mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat und Applikation von Mefenaminsäure ( $30 \mu\text{M}$ ) während der nachfolgenden Plateauphase. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit mindestens 20 Zellen.

Um die Inhibition von TRPM3 durch Mefenaminsäure weiter zu charakterisieren, erfolgten anschließend Patch-Clamp Aufzeichnungen der Ionenströme in der Ganz-Zell-Konfiguration. Diese Herangehensweise erlaubt eine Aufnahme der Aktivitäten aller in der Plasmamembran enthaltenen Ionenkanäle durch schmale Glaspipetten. Nach Zerstörung eines Membranflecks unter kurzzeitigem Anlegen eines Pipettenunterdrucks mittels Patch-Pipette erhält man einen direkten elektrischen Zugang und kann die ganze Zellmembran auf das angelegte Potential der Spannungsklemme bringen.

#### 4.4.4 Charakterisierung von Mefenaminsäure als selektiven TRPM3-Kanalblocker mit Hilfe von Ganz-Zell-Aufnahmen

In den von Isabelle Straub durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten wurden mit Hilfe der Patch-Clamp Technik Ganz-Zell-Stromableitungen durchgeführt. Nach Applikation von Pregnenolonsulfat kam es unmittelbar zu einer Zunahme des TRPM3-vermittelten Stroms (siehe Abb. 4-27. A). Nach Zugabe von Mefenaminsäure wurden die Ströme vollständig inhibiert. Die Strom-Spannungs-Beziehungen zeigten, dass es unter Mefenaminsäure zur vollständigen Inhibition des Einwärtsstroms kommt, allerdings ein geringer Auswärtsstrom messbar bleibt (siehe Abb. 4-27. B). Mefenaminsäure ist eine schwache Säure mit einem  $\text{pK}_a$ -Wert von 4,2. Infolgedessen liegt es bei einem physiologischem pH-Wert in seiner ionischen Form vor und kann so die lipophile Barriere der Plasmamembran nicht passieren. Um auszuschließen, dass Mefenaminsäure seine hemmende Wirkung durch intrazelluläre Interaktion mit dem TRPM3-Kanal vermittelt, wurden Ganz-Zell-Aufnahmen durchgeführt, bei

denen sich die Mefenaminsäure in der Intrazellulärlösung und somit in der Patch-Pipette befand (siehe Abb. 4-27. C und D).



**Abb. 4-27. Patch-Clamp Analyse von transient transfizierten TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen.** Extrazelluläre Applikation von Mefenaminsäure inhibiert TRPM3-vermittelte Ionenströme in transfizierten HEK293 Zellen. (A) Gezeigt ist repräsentativ ein Kationenstrom durch TRPM3-Kanäle bei Membranpotentialen von  $-80$  mV (untere Spur) und  $+80$  mV (obere Spur) während der Applikation von Pregnenolonsulfat ( $35 \mu\text{M}$ ), einem TRPM3-spezifischen Aktivator sowie die Inhibition des Stroms nach Zugabe von Mefenaminsäure ( $25 \mu\text{M}$ ). (B) Stromspannungskurven, der in Abbildung A gezeigten Experimente. Mefenaminsäure inhibiert sowohl den Einwärts- als auch den Auswärtsstrom, jedoch ist ein geringer Anteil des auswärtsgerichteten Stroms nicht durch Mefenaminsäure inhibierbar. (C) Ganz-Zell-Aufnahmen der TRPM3-vermittelten Kationenströme von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen mit den gleichen Konzentrationen von Aktivator und Inhibitor wie in Abbildung A, allerdings wurde Mefenaminsäure ( $30 \mu\text{M}$ ) über die Intrazellulärlösung der Patch-Pipette während der gesamten Messung zugeführt. (D) Strom-Spannungskurven der in Abbildung C gezeigten Experimente. Die intrazellulär applizierte Mefenaminsäure hat keinen Einfluss auf den Pregnenolonsulfat-induzierten Strom (mit freundlicher Genehmigung von Isabelle Straub).

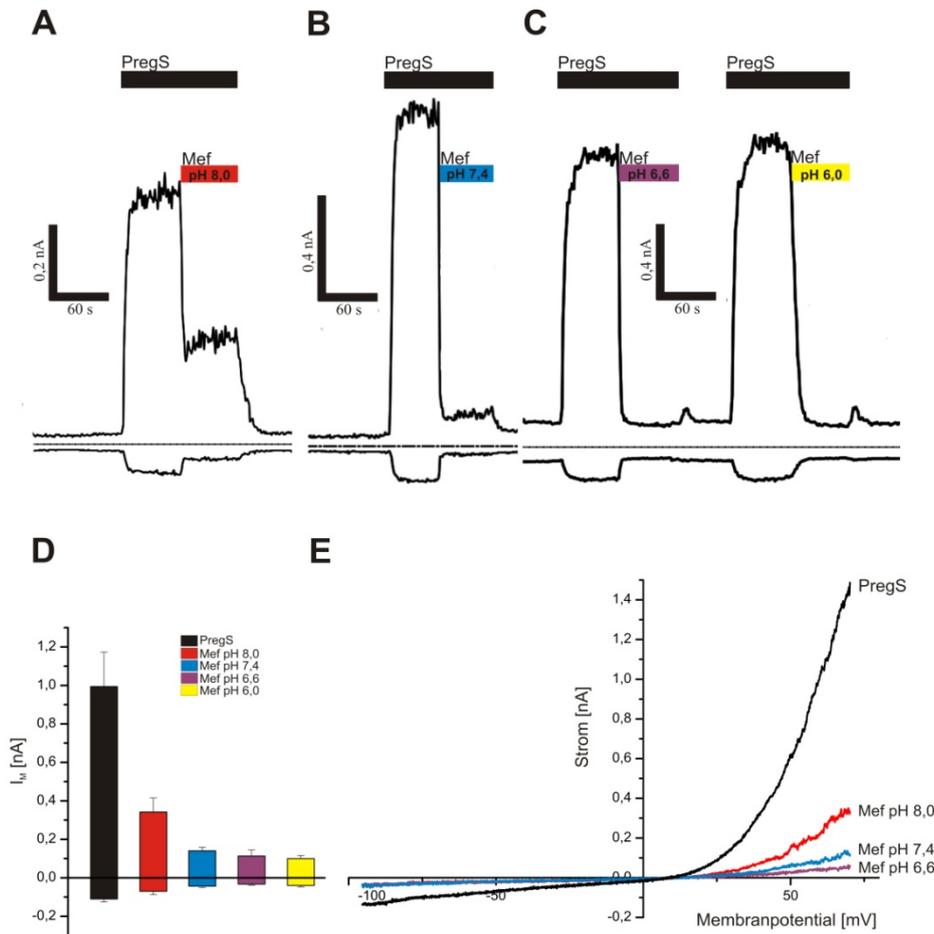
Trotz intrazellulärer Anwesenheit von Mefenaminsäure bereits vor der Applikation des Pregnenolonsulfats konnte mit Pregnenolonsulfat sowohl ein Einwärts- als auch ein Auswärtsstrom induziert werden (siehe Abb. 4-27. C). Erst die extrazelluläre Zugabe von Mefenaminsäure führte zu einer Inhibition der Kationenströme, wobei ein kleiner Auswärtsstrom noch detektierbar war. Um die Frage zu klären, ob der blockierende Effekt

von Mefenaminsäure eine pH-Abhängigkeit aufweist, wurden die Eigenschaften der Mefenaminsäure bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

#### 4.4.5 pH-Abhängigkeit der Inhibition von Mefenaminsäure

Nachdem ausgeschlossen wurde, dass die Pregnenolonsulfat-abhängige TRPM3-Aktivierung durch den extrazellulären pH-Wert beeinflussbar ist, wurde getestet, ob die modulierende Aktivität von Mefenaminsäure, wie bei anderen organischen Säuren, pH-abhängig ist. Hierzu wurde der hemmende Effekt von Mefenaminsäure auf Pregnenolonsulfat-stimulierte Einwärts- und Auswärtsströme unter verschiedenen extrazellulären pH-Bedingungen in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen untersucht (siehe Abb. 4-28.). Die Messung in Abb. 4-28 B. wurde bei einem konstanten pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Wiederum wurde in diesem Versuchsaufbau eine komplette Inhibition des Einwärtsstroms durch Mefenaminsäure erreicht, wohingegen ein kleiner Mefenaminsäure-insensitiver Auswärtsstrom messbar blieb. Im Gegensatz dazu fand bei einem pH von 8,0 keine komplette Hemmung des einwärtsgerichteten Stroms statt und auch die Restamplitude des auswärtsgerichteten Stroms fiel bei einem pH von 8,0 verglichen zu pH 7,4 größer aus (siehe Abb. 4-28. A und B). Interessanterweise wurde bei pH-Werten von 6,6 und 6,0 der gesamte Auswärts- und Einwärtsstrom inhibiert (siehe Abb. 4-28. C). Die Experimente zeigen eine deutliche pH-Abhängigkeit der modulierenden Wirkung von Mefenaminsäure (siehe Abb. 4-28. D und E).

Zudem ist aus diesen Versuchen ersichtlich, dass der Block von TRPM3 durch Mefenaminsäure reversibel ist, da nach dem Auswaschen der Mefenaminsäure eine erneute Zugabe von Pregnenolonsulfat einen Strom mit identischer Amplitude erzeugt, die erneut durch Mefenaminsäure geblockt werden kann (siehe Abb. 4-28. C).



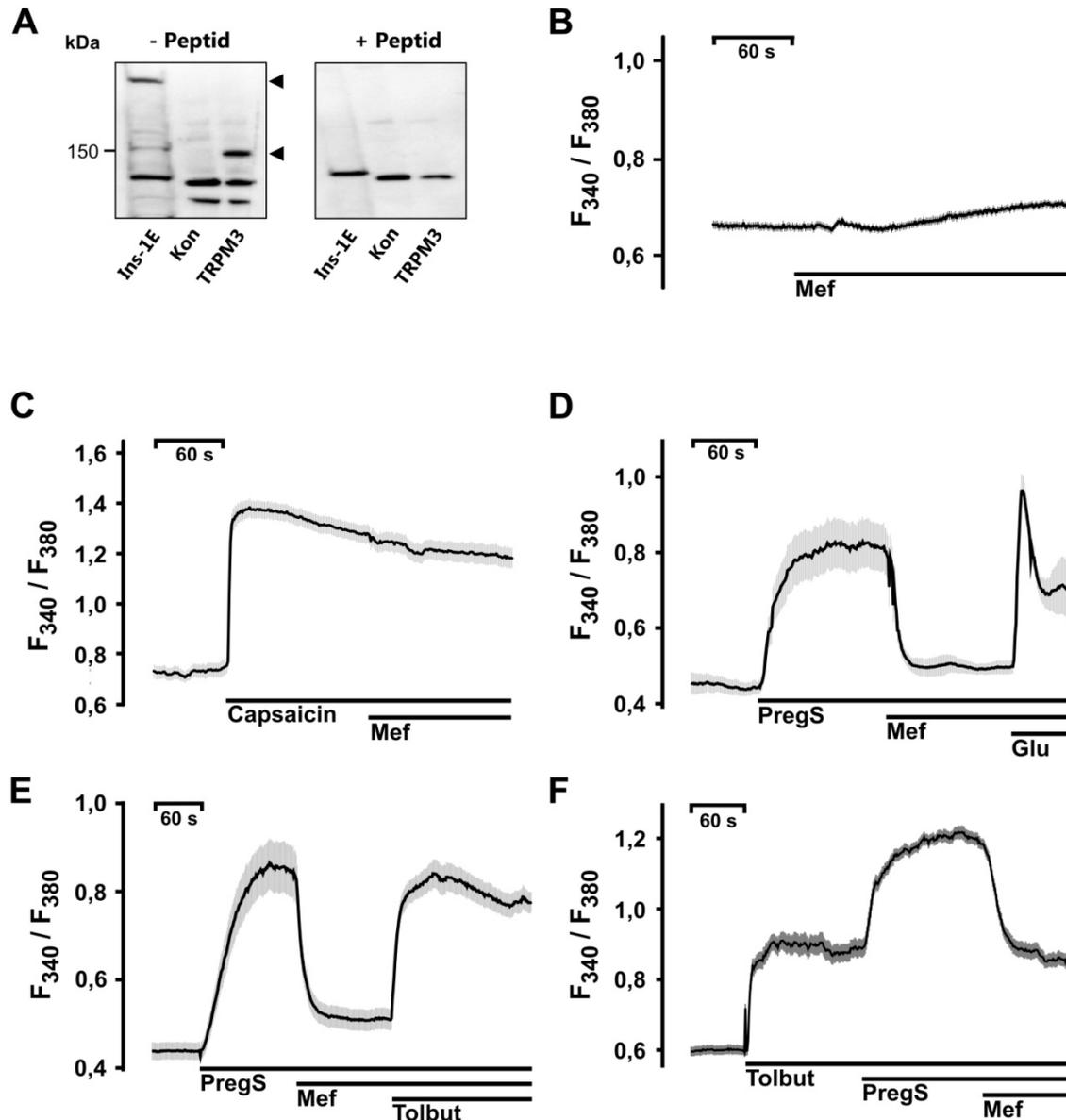
**Abb. 4-28. pH-Abhängigkeit von Mefenaminsäure auf die Inhibition TRPM3-vermittelter Ströme.** Gezeigt sind die TRPM3-vermittelten Ströme gemessen bei Membranpotentialen von -80 mV (untere Spur) und +80 mV (obere Spur). Die pH-Werte der extrazellulären Lösungen lagen bei 8,0 (A), 7,4 (B) und 6,6 bzw. 6,0 (C). (D) Statistische Analyse der bei den pH-Werten pH 8,0 (n = 9), pH 7,4 (n = 19), pH 6,6 (n = 10) und pH 6,0 (n = 9) durchgeführten Experimente. (E) Stromspannungsbeziehungen der Experimente, die in Abbildungen A-D gezeigt sind. Die Einwärtsströme wurden beinahe komplett inhibiert, die inhibitorische Wirkung auf die Auswärtsströme war abhängig von den pH-Werten (mit freundlicher Genehmigung von Isabelle Straub).

#### 4.4.6 Effekte von Mefenaminsäure als selektiver TRPM3-Blocker auf Insulin-sezernierende Zellen

Aufgrund der Charakterisierung von TRPM3 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen als Steroidrezeptor und umstrittenen Befunden, dass Fenamate die Insulinsekretion beeinflussen, untersuchten wir, ob Mefenaminsäure einen Einfluss auf die Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen hat. Hierzu wurde die Proteinexpression von TRPM3 in der Insulin-sezernierenden Zelllinie INS-1E mittels Western Blot Analyse analysiert (siehe Abb. 4-29. A). Der verwendete TRPM3-spezifische Antikörper (Grimm *et al.*, 2003) detektierte zwei Proteinbanden. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch die fehlende Immunreaktion mit dem immunogenen Peptid gezeigt und gibt darüber hinaus Hinweise auf die Expression von

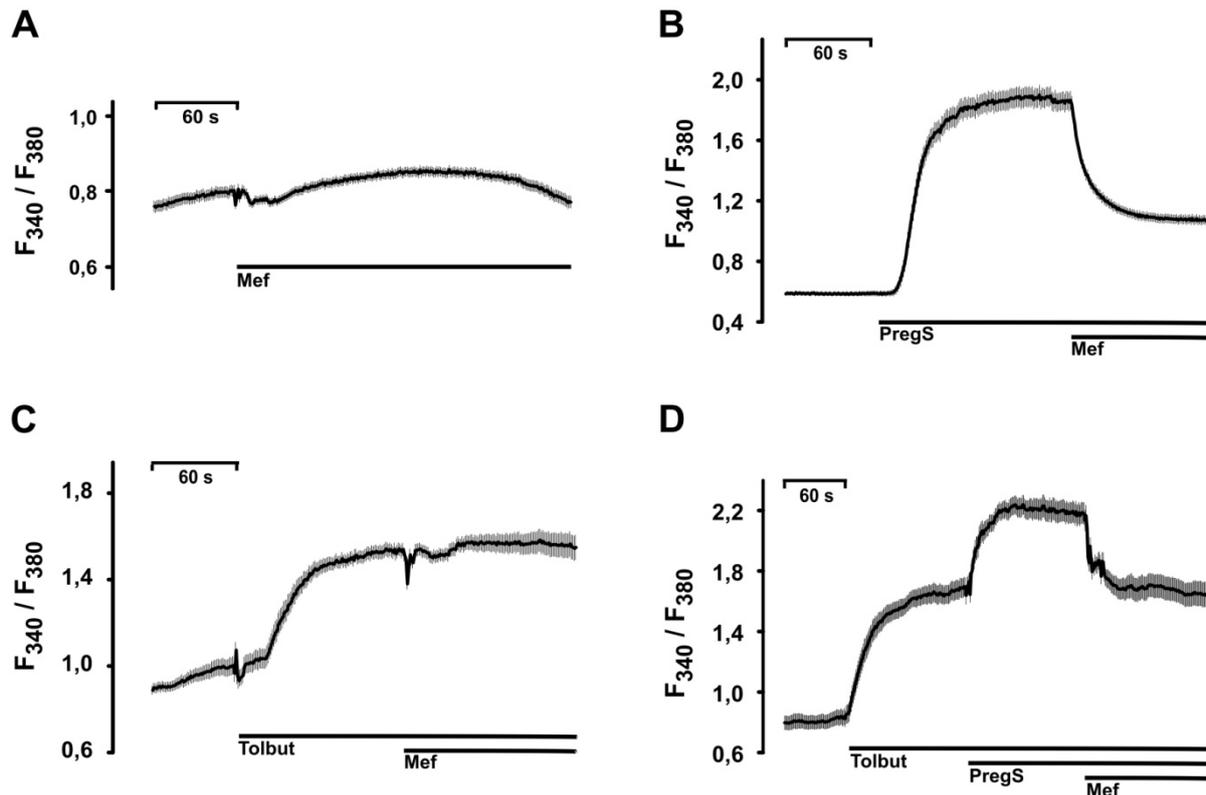
TRPM3-Spleißvarianten mit unterschiedlichen C-terminalen Sequenzen mit korrespondierenden Proteingrößen von 150 kDa bzw. 220 kDa (Hoffmann *et al.*, 2010).

Bei der weiterergelenden funktionellen Analyse der INS-1E Zellen wurde getestet, ob Mefenaminsäure die intrazelluläre Calciumkonzentration in Fura-2-beladenen INS-1E Zellen (siehe Abb. 4-29.) beeinflusst. Die alleinige Applikation von Mefenaminsäure zeigte in Calcium-Imaging Experimenten keinen Effekt auf Ins-1E Zellen (siehe Abb. 4-29. B). Um zu überprüfen, ob TRPV1, ein Modulator der Glukosehomeostase (Razavi *et al.*, 2006), funktionell in INS-1E Zellen exprimiert wird, wurde der Effekt von Capsaicin, einem TRPV1-selektiven Aktivator, in maximaler effektiver Konzentration von 100 nM an der Zelllinie untersucht. Die Applikation von Capsaicin vermittelte eine rasche und starke Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration, die gegenüber Mefenaminsäure (30 µM) insensitiv war (siehe Abb. 4-29. C). Neben der Funktionsfähigkeit der Zellen zeigten diese Experimente, dass ein weiterer Vertreter der TRPV-Subfamilie keine Modulation durch Mefenaminsäure in der eingesetzten Konzentration erfährt. Die Applikation von 35 µM Pregnenolonsulfat führte zu einer sofortigen und anhaltenden Aktivierung (siehe Abb. 4-29. D). Diese Pregnenolonsulfat-induzierte Calciumantwort wurde nach Zugabe von 30 µM Mefenaminsäure nahezu komplett blockiert. Im Gegensatz dazu wurde eine durch Applikation von 20 mM Glukose-induzierte Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht durch 30 µM Mefenaminsäure inhibiert. Mefenaminsäure zeigt keinen Einfluss auf eine Glukose-induzierte Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  in INS-1E Zellen (siehe Abb. 4-29. D). Ausserdem wurde überprüft, ob der Mefenaminsäureeffekt über spannungsabhängige Calciumkanäle vermittelt wird. Um diesen Signalweg auszulösen wurde Tolbutamid (100 µM) appliziert, das eine Inhibition von ATP-abhängigen Kaliumkanälen bedingt und zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Dieses Ereignis resultierte in der Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und vermittelte eine schnelle und starke Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in Anwesenheit von Mefenaminsäure (siehe Abb. 4-29. E). Die zusätzliche Gabe von Pregnenolonsulfat steigerte die  $[Ca^{2+}]_i$  nochmals. Eine anschließende Zugabe von Mefenaminsäure reduzierte das Fluoreszenzsignal wieder auf Höhe der Tolbutamidaktivierung (siehe Abb. 4-29. F).



**Abb. 4-29. Effekte von Mefenaminsäure auf pankreatische  $\beta$ -Zellen.** (A) Western Blot Analyse von Membranextrakten der INS-1E Zellen, HEK293 Kontrollzellen (Kon) und TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (TRPM3). Der anti-TRPM3 Antikörper detektiert zwei spezifische Banden bei ungefähr 150 kDa und 220 kDa (Blot, - Peptid) in INS-1E Zellen. In Gegenwart des immunogenen Peptids waren die TRPM3-spezifische Signale unterdrückt (Blot, + Peptid). Das zusätzliche Signal bei ungefähr 120 kDa konnte durch das immunogene Peptid nicht verdrängt werden. (B-F) Fluorometrische Messungen der Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  dargestellt als Fluoreszenzratio  $F_{340}/F_{380}$  von Fura-2-beladenen INS-1E Zellen. (B) Die  $[Ca^{2+}]_i$  bleibt durch Zugabe von Mefenaminsäure (Mef) unbeeinflusst. (C) Applikation von Capsaicin (100 nM) führt zu einem deutlichen Anstieg der Calciumkonzentration, der durch Mefenaminsäure nicht beeinträchtigt wird. (D) INS-1E Zellen nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat (35  $\mu$ M) und Block mit Mefenaminsäure (30  $\mu$ M). Ein zusätzlicher Stimulus mit 20 mM Glukose (Glu) in Anwesenheit von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 30  $\mu$ M Mefenaminsäure erzeugt einen erneuten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. (E) Mefenaminsäure zeigt keinen Effekt auf spannungsabhängige Calciumkanäle, die nach dem Block Pregnenolonsulfat- (35  $\mu$ M) stimulierter INS-1E Zellen durch 100  $\mu$ M Tolbutamid (Tolbut) aktiviert wurden. (F) Applikation von Tolbutamid (100  $\mu$ M) führt zu einer Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  in INS-1E Zellen, diese wird durch Zugabe von Pregnenolonsulfat (35  $\mu$ M) gesteigert und durch Mefenaminsäure (30  $\mu$ M) wieder aufgehoben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von je einem repräsentativen Experiment von mindestens vier unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 20 Zellen.

Da eine Immortalisierung bei permanenten Zelllinien eine Änderung einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. den Metabolismus zur Folge haben kann, wurden primäre murine pankreatische  $\beta$ -Zellen isoliert und anschließend mittels Calcium-Imaging untersucht, um die erhaltenen Ergebnisse mit der immortalisierten INS-1E Zelllinie zu vergleichen. Die mit Fura-2-beladenen, murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen durchgeführten Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse (siehe Abb. 4-30.). Sowohl Pregnenolonsulfat (siehe Abb. 4-30. B) als auch Tolbutamid (siehe Abb. 4-30. C) induzierten einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentrationen, wobei nur der Pregnenolonsulfat-induzierte Anstieg Mefenaminsäure-sensitiv war. Ferner stützte die aufeinanderfolgende Applikation von Tolbutamid, Pregnenolonsulfat und Mefenaminsäure die Hypothese, dass es sich um zwei voneinander unabhängig agierende Calciumeinstrommechanismen handelte (siehe Abb. 4-30. D). Die Applikation von Tolbutamid und Pregnenolonsulfat resultierte in einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in zwei Stufen. Die anschließende Zugabe von Mefenaminsäure inhibierte ausschließlich den Pregnenolonsulfat-induzierten Anteil.

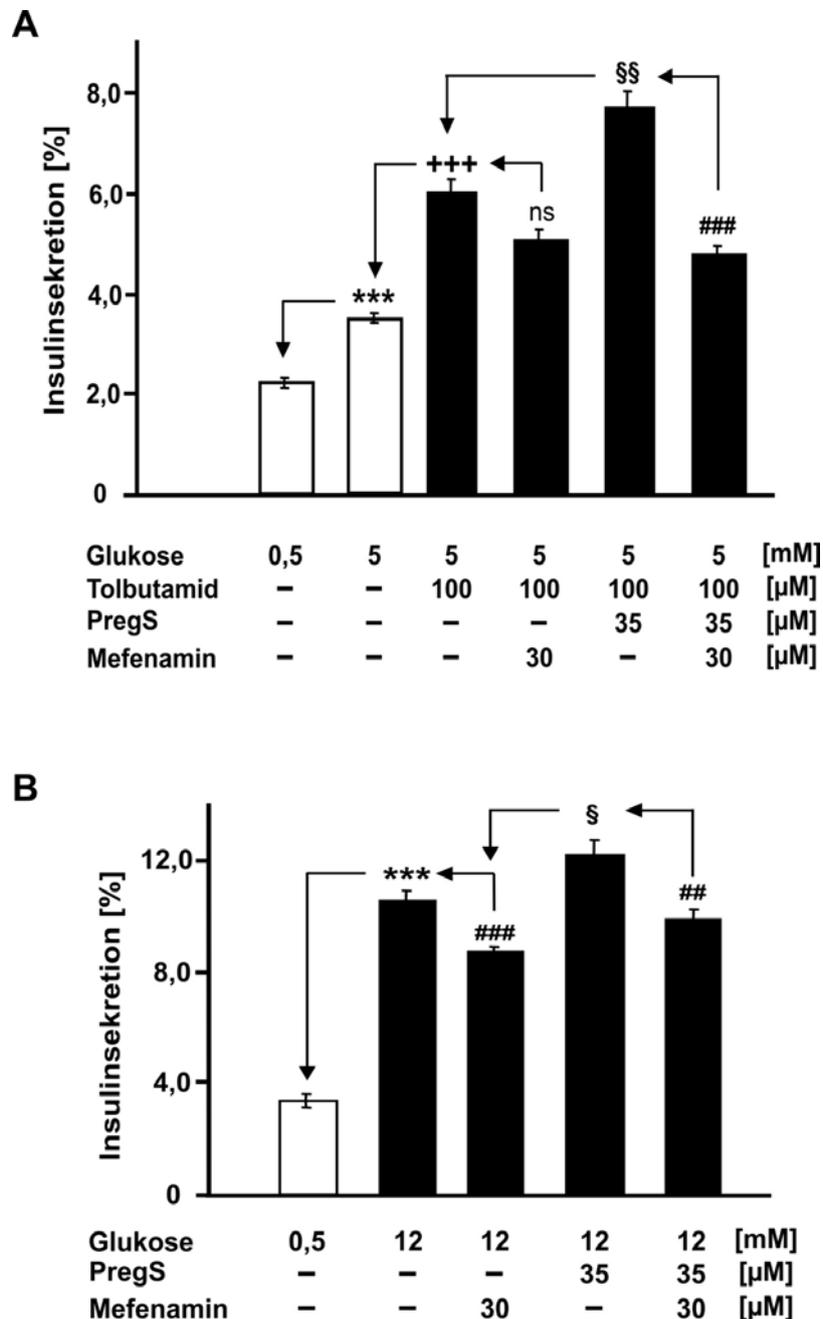


**Abb. 4-30.** Effekt der Mefenaminsäure auf primär kultivierte murine pankreatische  $\beta$ -Zellen. Gezeigt sind Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  dargestellt durch die Fluoreszenzratio  $F_{340}/F_{380}$  von Fura-2-beladenen primären murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen. (A) Die Zugabe von Mefenaminsäure (Mef) zeigt keinen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$ . (B) Messungen von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit  $35 \mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat und Block mit  $30 \mu\text{M}$  Mefenaminsäure. (C) Mefenaminsäure hat keinen Effekt auf einen durch  $100 \mu\text{M}$  Tolbutamid vermittelten Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels. (D) Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  Tolbutamid führt zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ . Dieser Effekt wurde durch Hinzufügen von  $35 \mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat erhöht, der durch anschließende Applikation von Mefenaminsäure aufgehoben wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $F_{340}/F_{380} \pm \text{SEM}$  für jeden Datenpunkt aus jeder Versuchsbedingung mit einem repräsentativen Einzelexperiment einer fluorometrischen  $[Ca^{2+}]_i$ -Messung mit je mindestens 20 Zellen.

Neben der eindeutigen Wirkung einer TRPM3-Aktivierung auf den Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in Insulin-sezernierende INS-1E Zellen und murine pankreatische  $\beta$ -Zellen, hat die TRPM3-Aktivierung auch modulierende, synergistische Effekte auf die Insulinsekretion (Wagner *et al.*, 2008).

Um zu untersuchen, ob der Mefenaminsäureeffekt die physiologische Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen beeinflusst, wurde diese in INS-1E Zellen gemessen. Eine Applikation von Pregnenolonsulfat ( $35 \mu\text{M}$ ) erhöhte die Insulinsekretion signifikant sowohl in Anwesenheit von Tolbutamid ( $100 \mu\text{M}$ ), also bei geschlossenen ATP-abhängigen Kaliumkanälen, als auch in Anwesenheit von  $12 \text{ mM}$  Glukose (siehe Abb. 4-31. A und B). Mefenaminsäure ( $30 \mu\text{M}$ ) hebt die Pregnenolonsulfat-stimulierte Insulinsekretion auf, hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die Tolbutamid-vermittelte Insulinsekretion und vermindert nur unwesentlich die Glukose-induzierte Insulinsekretion. Diese Daten zeigen,

dass Mefenaminsäure selektiv die TRPM3-induzierte Modulation der Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Maus inhibiert.



**Abb. 4-31. Einfluss von Mefenaminsäure auf die Pregnenolonsulfat-vermittelte Insulinsekretion in INS-1E Zellen.** Die Pregnenolonsulfat-vermittelte Insulinsekretion wird durch Mefenaminsäure inhibiert. Die Testsubstanzen wurden wie in der Abbildung beschrieben zugegeben. (A) Effekt von Pregnenolonsulfat und Mefenaminsäure in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Tolbutamid auf die basale Insulinsekretion. (B) Gezeigt ist der Einfluss von Pregnenolonsulfat und Mefenaminsäure auf die Insulinsekretion induziert durch Applikation von 12 mM Glukose (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Susanne Ullrich). Die angegebenen Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei unabhängigen Experimenten \*\*\*  $P < 0,001$ -0,5 mM Glukose; +++  $P < 0,001$ -5 mM Glukose; ##  $P < 0,005$  und ###  $P < 0,001$  für entsprechende Bedingungen ohne Mefenaminsäure; §  $P < 0,05$  und §§  $P < 0,005$  für entsprechende Bedingungen ohne Pregnenolonsulfat; ns - nicht signifikant.

## 5 Diskussion

### *Expression von TRPM1*

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung der TRPM1-*Knockout*-Mauslinie das TRPM1-Protein im Gehirn und im Pankreas in Mäusen nachgewiesen. Dieser Befund stimmt mit den publizierten Ergebnissen überein, die eine Transkription von TRPM1-mRNA im Gehirn (Fonfria *et al.*, 2006) zeigten. Daneben wurde TRPM1 in Melanozyten (Duncan *et al.*, 1998), der Retina (Morgans *et al.*, 2009) und Bipolarzellen (Kim *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2008b; Nakajima *et al.*, 2009) detektiert. Die Expression von TRPM1 im Pankreas konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen weiter aufgeklärt werden. Durch Nachweis einer Kolo-kalisation mit Insulin konnte gezeigt werden, dass TRPM1 in Insulin-sezernierenden Inseln des Pankreas exprimiert wird. Somit konnte zusätzlich zu TRPM3 mit TRPM1 ein weiterer Vertreter unter diversen TRP-Kanalproteinen in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen identifiziert werden (Cheng *et al.*, 2007; Jacobson & Philipson, 2007), die teilweise auch zur Insulinsekretion beitragen können (Wagner *et al.*, 2008; Liman, 2010; Colsoul *et al.*, 2011).

### *TRPM1-Protein in Melanozyten*

Die Rolle von TRPM1 in humanen Melanozyten wird kontrovers diskutiert. So wird für TRPM1 u.a. eine Funktion bei der Melaninsynthese vermutet (Devi *et al.*, 2009). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen TRPM1 und der Melaninsynthese in verschiedenen Melanozyten-Zelllinien untersucht.

Für TRPM1 wurde beschrieben, dass verschiedene TRPM1-mRNA-Transkripte konstitutiv in pigmentierten Melanomazellen exprimiert werden. Diese werden auf transkriptionaler Ebene und über mRNA-Prozessing reguliert. Durch Inkubation mit der Differenzierungs-induzierenden Substanz Hexamethylenbisacetamid (HMBA) konnte der mRNA-Level von TRPM1 in pigmentierten metastasierenden humanen Melanomazellen erhöht werden (Fang & Setaluri, 2000). Diese Hochregulation ist mit Wachstumsinhibition und Steigerung der Melaninpigmentierung assoziiert (Fang & Setaluri, 2000). In kultivierten humanen Melanozyten konnte gezeigt werden, dass Melanin die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase beeinflusst, indem intrazelluläres Calcium in die Melanosomen abgegeben wird. Dabei hängt die Kapazität und der Beitrag zur Erhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase von der Stärke der Pigmentierung der Melanozyten ab (Hoogduijn *et al.*, 2003). Auch eine Schutzfunktion von dem potenten

Ca<sup>2+</sup>-Chelator Melanin gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Erhöhungen, die DNA-Strangbrüche vermitteln, wurde in der Studie bestätigt (Hoogduijn *et al.*, 2004).

So wurde für den TRPM1-Kanal von Devi *et al.* postuliert, dass er eine Rolle in der Proliferation und der Differenzierung von Melanozyten durch die Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Homeostase einnimmt, da eine ähnliche Rolle für TRP-Kanäle bei der Kontrolle der Zellproliferation (Clapham, 2003; Montell, 2005) in weiteren Publikationen gezeigt wurde. So scheint es möglich, dass eine TRPM1-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Homeostase eine Rolle bei der Regulierung der Melanogenese spielt (Devi *et al.*, 2009). Zudem zeigte ein shRNA-vermittelter *Knockdown* von TRPM1 eine Abnahme der Melanin-Akkumulation in Melanozyten und eine Reduzierung der Tyrosinase-Aktivität. Ferner gibt es Hinweise für eine p53-vermittelte transkriptionale Regulation einer TRPM1-Expression induziert durch UVB-Strahlung (Devi *et al.*, 2009), die eine gesteigerte Melaninsynthese durch Aktivierung der Tyrosinase initiiert.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen konnte in allen in diesem Projekt analysierten humanen Melanozyten-Zelllinien das TRPM1-Protein mit einer postulierten Größe von 180 kDa nachgewiesen werden (Duncan *et al.*, 1998; Fang & Setaluri, 2000). Im Gegensatz zu den von Fang *et al.* erhaltenen Ergebnissen aus mRNA-Analysen, konnte in dieser Arbeit eine HMBA-induzierte Hochregulierung von TRPM1 auf Proteinebene mittels Western Blot Analysen in den untersuchten Melanozyten-Zelllinien nicht bestätigt werden.

Die hier generierten Daten einer Erhöhung der Melaninproduktion nach Behandlung der untersuchten Melanin-produzierenden Zelllinien SK-Mel 19, SK-Mel23 und Sk-Mel28, mit Ammoniumchlorid und Tyrosin bestätigten die bereits publizierten Ergebnisse (Hoogduijn *et al.*, 2003). Keine Steigerung der Melaninsynthese war in den Melanin-defizienten Melanozyten-Zelllinien A-375 und M186 nachweisbar. Eine Steigerung der Melaninsynthese in den Melanin-produzierenden Melanozyten durch Inkubation mit Ammoniumchlorid und Tyrosin zeigte mit Ausnahme von SK-Mel23 Zellen keinen Effekt auf die TRPM1-Expression im Vergleich zu entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Da die mit dem TRPM1-spezifischen Antikörper detektierten Banden vergleichbare Bandenintensität aufwiesen. In SK-Mel23 Zellen wurde eine Reduktion der TRPM1-Proteinexpression detektiert. Somit scheint das TRPM1-Protein in den untersuchten Zelllinien nicht an der Melanogenese beteiligt zu sein. Dieses Ergebnis wird durch eine Arbeit gestützt, die in Kollokalisationsstudien mittels Doppelfärbung keine Koexpression von TRPM1 und den Melanosomen zeigen konnten (Oancea *et al.*, 2009). Es wird jedoch eine indirekte Modulation der Melanosomenfunktion durch TRPM1 diskutiert (Patel & Docampo, 2009). Die Abnahme

von TRPM1 in SK-Mel23 Zellen bei Behandlung mit Ammoniumchlorid und Tyrosin steht im Kontrast zu den weiteren hier untersuchten Melanin-bildenden Zelllinien, in denen keine Wirkung auf TRPM1 detektierbar war. Möglicherweise unterscheiden sich die immortalisierten permanenten Zelllinien in ihrem Metabolismus.

#### *TRPM1 bei der Immunabwehr*

Le Poole *et al.* (1993a) bestätigten eine Ausstattung der Melanozyten mit der phagozytotischen Maschinerie für ein Antigen-Prozessing. Zudem produzieren Melanozyten NO als Reaktion auf Lipopolysaccharid-Stimulation (Tsatmali *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde durch mRNA-Studien, Western Blot Analysen und Durchflußzytometrie eine Expression von TLR-4 in Melanozyten der humanen Epidermis nachgewiesen (Ahn *et al.*, 2008), der eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort durch Erkennung von Pathogenen spielt. Diese Indizien lassen auf eine Rolle der Melanozyten bei der Immunabwehr in der Haut schließen. Ahn *et al.* untersuchten den Effekt von gramnegativen Bakterien-abgeleitetes Lipopolysaccharid auf die Melaninproduktion und den TLR-4-Rezeptor (Ahn *et al.*, 2008). Dabei konnte die Arbeitsgruppe eine Hochregulierung des TLR-4-Rezeptors in Melanozyten und einen dadurch vermittelten Anstieg der Melaninsynthese zeigen. Dabei erfolgt den Untersuchungen von Lin *et al.* zur Folge der molekulare Mechanismus der gesteigerten TLR-4-Expression durch transkriptionale Kontrolle des TLR-4-Gens, da die LPS-induzierte Hochregulierung der TLR-4-Expression in humanen glatten Aorten-Muskelzellen durch Stabilisierung der TLR-4-mRNA einhergeht (Lin *et al.*, 2006).

Obwohl eine Expression von TLR-4 in den hier verwendeten Melanozyten-Zelllinien nachgewiesen und damit ein Teil der Ergebnisse von Ahn *et al.* bestätigt werden konnte, stehen weitere im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten nicht mit den publizierten überein. In meiner Arbeit konnte keine LPS-induzierte Erhöhung der Proteinexpression des TLR-4-Rezeptors und keine Steigerung der Melaninsynthese in den analysierten Melanin-produzierenden Melanozytenlinien SK-Mel19, SK-Mel23 und SK-Mel28 nachgewiesen werden. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Immortalisierung dieser Zelllinien zum Verlust der Fähigkeit der Stabilisierung der TLR-4-mRNA und damit zu einem Verlust der TLR4-vermittelten Immunabwehr führte.

### *TRPM2 in Melanozyten*

Eine Expression von TRPM2-Transkripten konnte durch Expressionsanalysen mittels quantitativer PCR in verschiedenen Melanozyten- und Melanoma Zelllinien beschrieben werden (Orfanelli *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene in den hier untersuchten Melanozyten-Zelllinien mittels Western Blot Analysen bestätigt werden. Für TRPM2 wird beschrieben, dass es in lysosomalen Strukturen exprimiert wird (Lange *et al.*, 2009). Da die in Melanozyten gebildeten Melanosomen lysosomalen Strukturen gleichen, könnte TRPM2 an der Melaninsynthese beteiligt sein. Hierzu wurde untersucht, ob eine Regulation der TRPM2-Expression parallel zur Melaninsynthese nachweisbar war.

Im Gegensatz zu TRPM1 führte ein durch Ammoniumchlorid/Tyrosin-Behandlung-induzierter Anstieg der Melaninsynthese zu einer *Down*-Regulation der Proteinexpression von TRPM2 in den Melanin-produzierenden Melanozyten-Zelllinien SK-Mel19, SK-Mel23 und SK-Mel28. Entgegen den Erwartungen konnte in der Melanin-defizienten Zelllinie M186 ebenfalls ein *Knockdown* von TRPM2 detektiert werden, während die Melanin-defizienten Zelllinie A-375 keinen Effekt auf die TRPM2-Expression zeigte. Diese Ergebnisse deuten auf eine parallele Regulation der Melaninsynthese und der TRPM2-Expression. Aufgrund des nachgewiesenen *Knockdowns* von TRPM2 in M186 Zellen scheint der Mechanismus der parallelen Regulation von TRPM2 und Melanin mit einer weiteren noch unbekanntem Komponente gekoppelt zu sein.

Eine Inkubation der verwendeten Melanozytenlinien mit LPS für 96 h zeigte keinen Effekt auf die TRPM2-Expression. Die mittels Western Blot Analyse und TRPM2-spezifischen Antikörper erzielten Resultate zeigten vergleichbare Bandenintensitäten zwischen den einzelnen untersuchten Melanozyten-Zelllinien und den entsprechend unbehandelten Kontrollen. Bei Untersuchungen der Wirkung von LPS auf TRPM2 in an der Immunabwehr beteiligten Monozyten konnten Wehrhahn *et al.* zeigen, dass LPS einen starken Anstieg der TRPM2-Expression vermittelt, TRPM2-vermittelte Ströme hochreguliert waren und LPS-induzierte Anstiege der Calciumkonzentration in Monozyten nachweisbar waren (Wehrhahn *et al.*, 2010).

### *Expression von TRPM3*

TRPM3 ist ein Mitglied der Unterfamilie der Melastatin-ähnlichen TRP-Kanalproteine und bildet einen nicht-selektiven Kationenkanal. Das TRPM3-Protein wird in einer Vielzahl neuronaler und nicht neuronaler Gewebe exprimiert (Oberwinkler & Philipp, 2007),

inklusive dem Gesamtpankreas (Grimm *et al.*, 2003; Fonfria *et al.*, 2006) und in murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Wagner *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Expressionsanalyse von TRPM3 auf Proteinebene mit einem TRPM3-spezifischen Antikörper der TRPM3-Kanal im murinen Gehirn, der Lunge, dem Pankreas, der Milz und dem Herzen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Nachweis geführt, dass TRPM3 in Insulin-sezernierenden pankreatischen  $\beta$ -Zellen und in der Insulinoma-Zelllinie INS-1E exprimiert wird. Dieses Resultat bestätigte die bereits publizierten Daten hinsichtlich der TRPM3-Expression.

#### *Charakterisierung der TRPM3-Knockout-Mauslinie*

Aufgrund des überraschenden Nachweises von TRPM3 in der von Lexicon Pharmaceutical Incorporated generierten TRPM3<sup>-/-</sup>-Mauslinie auf Proteinebene erfolgte eine Analyse der Tiere.

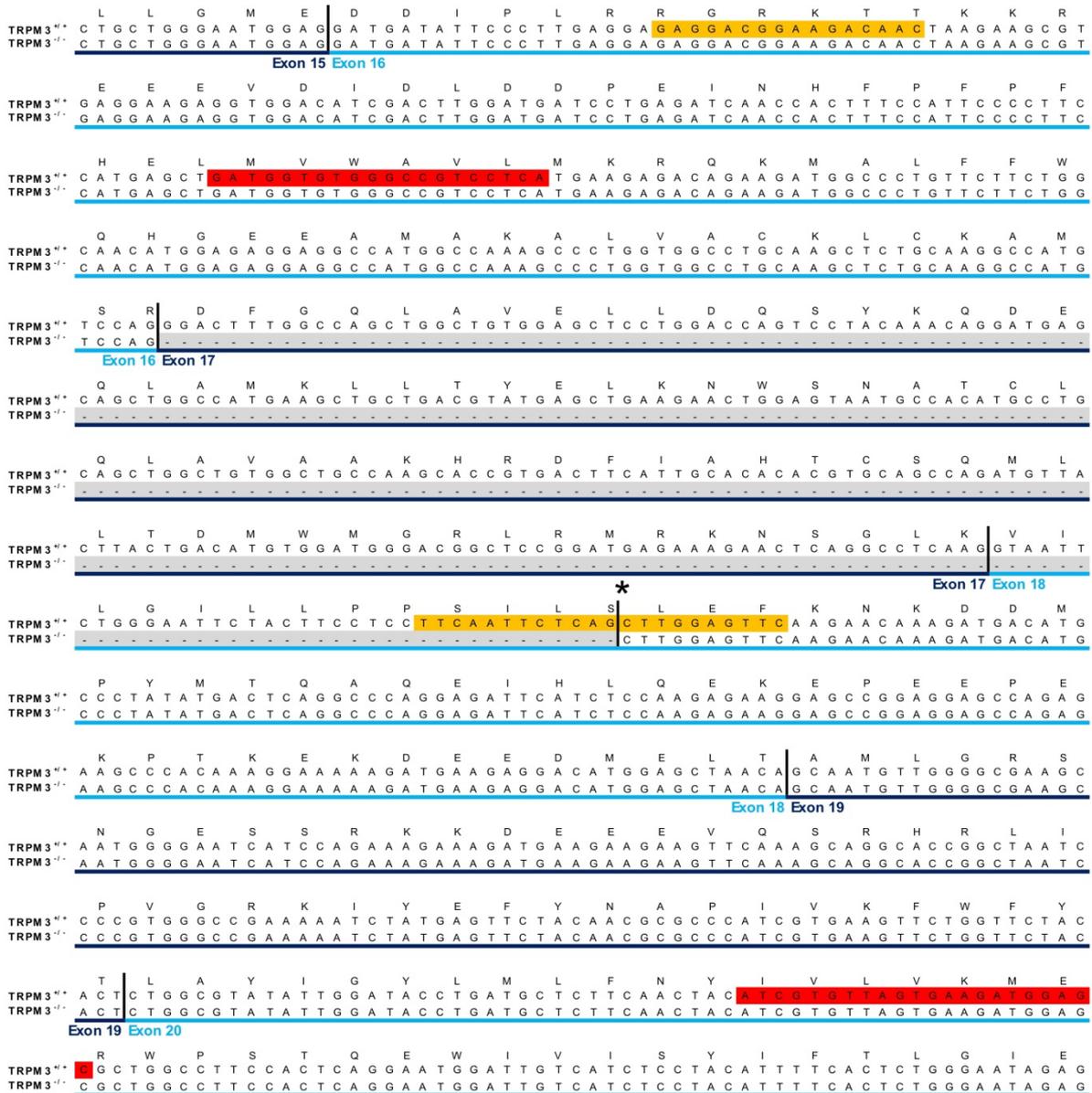
Zur Charakterisierung der TRPM3-Knockout-Mauslinie mittels RT-PCR wurde das in einer Publikation von Vriens *et al.* (2011) verwendete Oligonukleotidpaar P4 & P5 und zur Validierung ein weiteres Primerpaar (NSKRT 1356 & 1357), das einen größeren Bereich im TRPM3-Gen abdeckte (siehe Abb. 5-1.) verwendet.

Die Sequenzanalyse der durch RT-PCR generierten PCR-Fragmente zeigte in unseren Versuchen, dass TRPM3<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu TRPM3<sup>+/+</sup>-Tieren eine um 229 bp verkürzte mRNA bei dem von Vriens *et al.* verwendeten Primerpaar P4 & P5 bildeten. Diese sollte in einer postulierten Verschiebung des Leserahmens resultieren und somit zu der Transkription einer *Nonsense*-mRNA führen. Dieser Befund stand im Widerspruch zu den von Vriens *et al.* veröffentlichten Ergebnissen, die kein spezifisches Produkt in ihren RT-PCRs amplifizieren konnten, obwohl ihre mRNA-Analysen gleichfalls mit den von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated generierten TRPM3-Knockout-Tieren durchgeführt wurden.

Im Gegensatz dazu konnte mit dem in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Primerpaar NSKRT 1356 & 1357 zur Analyse von Exon 17 in den RT-PCRs ein um 267 bp verkürztes spezifisches DNA-Fragment amplifiziert werden. Unsere Daten aus den Sequenzvergleichen lassen den Schluss zu, dass es durch die *Knockout*-Strategie zur Generierung einer *Nonsense*-mRNA durch Entfernen von 229 bp und einer mRNA, die zur Translation eines um 89 AS verkürzten Proteins führt, kommt.

Das um 89 AS verkürzte TRPM3-Protein konnte in TRPM3-exprimierenden Geweben von TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Western Blot Verfahren detektiert werden, da das vom TRPM3-spezifischen Antikörper erkannte Epitop des TRPM3-Proteins kurz nach der Deletion im N-terminalen Bereich zwischen der 1. und 2. Transmembrandomäne liegt. Die Deletion umfasst die Aminosäuren 699 - 788 und betrifft die vollständige Transmembrandomäne 1, die scheinbar zu keiner Veränderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der verkürzten TRPM3-Variante führte. Durch die Deletion von 89 AS kommt es zu einem Laufunterschied im SDS-PAGE zwischen dem TRPM3-Wildtyp und der TRPM3-Deletionsmutante, der jedoch unter den limitierenden Parametern der Proteingelektrophorese bei den Proteinen mit molekularen Größen von 154 kDa (TRPM3-WT) bzw. 144 kDa (TRPM3-Del) nicht zu detektieren war.

Die Tatsache, dass es bei der TRPM3<sup>-/-</sup>-Maus trotz der eindeutigen *Knockout*-Strategie zur Translation eines um 89 AS verkürzten Proteins kommt, ist sehr erstaunlich. Denn um die Translation des Proteins zu erreichen, musste die prä-mRNA komplett anders prozessiert werden. Eine utilitaristische Interpretation der Ergebnisse läßt vermuten, dass das Protein von einer essentiellen Bedeutung für die Physiologie ist, die wir bisher nicht erkannt haben.



**Abb. 5-1. Schematische Darstellung der Positionen der verwendeten Oligonukleotide im TRPM3-Gen.** Zum Nachweis der Deletion im TRPM3-Gen wurden unterschiedliche Oligonukleotidpaare, die in unterschiedlichen Exons positioniert waren, verwendet. Orange dargestellt ist das von Vriens *et al.* (2011) verwendete Oligonukleotidpaar P4 & P5, rot dargestellt ist das selbst ausgewählte Primerpaar NSKRT 1356 & 1357. Ein horizontaler Strich in der Sequenz entspricht einer deletierten Nukleinbase. Ein vertikaler Strich zeigt den üblicherweise genutzten Exon/Exon-Übergang. \* stellt eine veränderte Spleißstelle dar.

*Funktionelle Analyse der TRPM3-Deletionsmutante*

Die hier präsentierten Ergebnisse belegen, dass durch alternatives Spleißen ein verkürztes TRPM3-Protein generiert wird. Das TRPM3-Gen kodiert durch alternatives Spleißen für eine große Anzahl verschiedener TRPM3-Isoformen, die sich hinsichtlich Ionenselektivität und biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden (Grimm *et al.*, 2005; Oberwinkler *et al.*, 2005).

Anhand der hier durchgeführten Sequenzanalyse wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated durchgeführten *Knockout*-Strategie und der dabei angegebenen Größe der Deletion in Exon 17 von TRPM3<sup>-/-</sup>-Tieren und den hier erhaltenen Ergebnissen festgestellt. Es konnte eine *In-Frame*-Deletion von 267 bp im TRPM3-Gen identifiziert werden, die möglicherweise funktionelle Unterschiede aufweist. Durch funktionelle Analysen von TRPM3 (TRPM3-WT) und der durch *in vitro*-Mutagenese generierten um 267 bp verkürzten Deletionsmutante von TRPM3 (TRPM3-Del) wurden Unterschiede untersucht. Die Analyse erfolgte durch fluorometrische Messung der Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die deletierte TRPM3-Variante im Vergleich zu TRPM3 eine geringere Basalaktivität aufweist, was dafür spricht, dass das TRPM3-Del-Protein nicht konstitutiv aktiv bzw. komplett inaktiv ist. Für TRPM1, TRPM7 und TRPM3 wurden bereits Spontan-Aktivitäten beschrieben, die durch die unspezifischen Kationenkanal-Blocker, den trivalenten Kationen Gd<sup>3+</sup> und La<sup>3+</sup> (Xu *et al.*, 2001; Runnels *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2003) sowie 2-Aminoethoxydiphenylburat blockierbar waren (Grimm *et al.*, 2003; Hermosura *et al.*, 2002). Darüber hinaus war die TRPM3-Deletionsmutante durch die verschiedenen bekannten selektiven TRPM3-Aktivatoren wie D-Erythro-Sphingosin (Grimm *et al.*, 2003), Nifedipin und Pregnenolonsulfat (Wagner *et al.*, 2008) nicht aktivierbar. Durch Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die deletierte TRPM3-Variante in den gleichen Zellkompartimenten wie der TRPM3-Wildtyp lokalisiert war. FRET-Messungen und Kollokalisationsstudien bestätigten für TRPM3-Del eine Homomerenbildung sowie eine Proteininteraktion zwischen der TRPM3-Deletionsmutante und dem TRPM3-Wildtyp durch Heteromerenbildung. Hierbei konnten vergleichbare FRET-Effizienzen wie bei der Bildung von Homomeren bzw. Heteromeren zwischen den von Grimm identifizierten und charakterisierten zwei Isoformen des TRPM3-Proteins (Grimm, 2004) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die von Lexicon Pharmaceuticals Incorporated durchgeführte Deletion der Transmembrandomäne 1 eine Störung der Kanalstruktur des TRPM3-Proteins hervorruft, die eine partielle oder vollständige Deletion der Ligandenbindungstasche verursacht sowie eine Veränderung der Pore bedingt. Die Fähigkeit einer Multimerisierung von TRPM3-Del wird scheinbar nicht beeinflusst.

*Identifikation eines TRPM3-selektiven Blockers*

In dieser Arbeit konnte erstmals mit Mefenaminsäure ein potenter TRPM3-selektiver Inhibitor aus der Substanzklasse der Fenamate identifiziert werden. Fenamate werden als potente Inhibitoren von Cyclooxygenasen beschrieben und werden daher als NSAIDs eingesetzt (Cryer & Feldman, 1998). Die N-Phenyl-substituierten Anthranilinsäure Derivate stellen eine interessante Gruppe von kleinen Molekülen dar, die als pharmakologische Werkzeuge zur Charakterisierung und Regulation von TRP-Kanälen herangezogen werden können. Seit der ersten Beschreibung, von Flufenaminsäure als TRPM2-Blocker (Hill *et al.*, 2004) wurde die Effektivität von Flufenaminsäure von verschiedenen Gruppen validiert (Tesfai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003b; Guinamard *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Guilbert *et al.*, 2009). Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Wirksamkeit der Flufenaminsäure als TRP-Kanal-Blocker der bisherigen Publikationen bezüglich einer Inhibition der TRPM2- und TRPC6-Aktivität. Außer der beschriebenen Inhibition von TRPM2- und TRPC6-Kanälen, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Flufenaminsäure auch TRPM3- und TRPV4-Proteine inhibiert. Die Daten zeigen, dass sowohl Flufenaminsäure als auch andere getestete Fenamat-Derivate als Breitband-TRP-Kanal-Blocker klassifiziert werden können, da diese Substanzen mindestens vier verschiedene TRP-Kanäle aus drei unterschiedlichen TRP-Kanal-Unterfamilien mit vollständig unterschiedlichen Poren-Strukturen blockieren. Neben Phenylzinnamoyl-Strukturen repräsentieren Fenamate eine zweite Klasse von Breitband TRP-Kanal-Blockern (Kraft *et al.*, 2006; Harteneck *et al.*, 2007). Während die Flufenaminsäure eine geringere Wirksamkeit als ACA in der Inhibition der verschiedenen untersuchten TRP-Kanäle aufweist, scheinen andere Fenamate wie Tolfenaminsäure oder DCDPC eine zu ACA vergleichbare Wirksamkeit zu besitzen. Zudem weisen die Daten darauf hin, dass die untersuchten Substanzen Tolfenaminsäure bzw. DCDPC TRP-übergreifend mindestens 10-fach wirksamer im Block waren als Flufenaminsäure. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass Mefenaminsäure den TRPM3-Kanal von außen inhibiert und die Wirksamkeit des inhibitorischen Effekts abhängig vom extrazellulären pH-Wert ist. Für TRPM2 wurden vergleichbare Charakteristika für die Interaktion mit Flufenaminsäure beschrieben (Hill *et al.*, 2004), die jedoch auch wichtige Unterschiede aufweisen. Während im Fall von TRPM2 zusätzliche Faktoren wie die TRPM2-Aktivierung und die Zeitdauer nach Inhibitorgabe die Erholungsrate der TRPM2-Ströme modulieren, erholen sich TRPM3-Ströme unmittelbar nach dem Auswaschen des Inhibitors aus der extrazellulären Lösung. In Anbetracht, dass Flufenaminsäure ein Breitband-Inhibitor für TRP-Kanäle darstellt, zusammen mit der Tatsache, dass beide Fenamate von der Außenseite agieren, könnten beide

Fenamate Kanalporen-Inhibitoren darstellen. Diese Aussage wird durch die Tatsache gestützt, dass die Kanal-Proteine der TRPC-, der TRPM- und der TRPV-Unterfamilien jeweils untereinander hoch konservierte Poren-Strukturen besitzen. Im Vergleich dazu differieren die Sequenzen innerhalb der zweiten bzw. dritten Transmembrandomäne dramatisch in ihren Protein-Primärstrukturen, die allgemein als Bindungsdomäne für den aktivierenden Liganden beschrieben sind (Jordt & Julius, 2002).

Unsere Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass die spezifische Stimulation von TRPM3 die zytosolische Calciumkonzentration erhöht und zu einer Potenzierung der Insulinsekretion führt, wohingegen die spezifische Inhibition von TRPM3 durch Mefenaminsäure nahezu keinen Einfluss auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion ausübt.

Aufgrund der Anwendung von Mefenaminsäure in der Therapie als Schmerzmittel und Antirheumatikum in mehreren Ländern, ist seine modulierende Wirkung auf die TRPM3-vermittelte Potenzierung der Insulinsekretion von besonderem Interesse. Quellen wie die Datenbank des American Hospital Formulary Service oder die erhältlichen Packungsbeschreibungen von Mefenaminsäure-haltigen Schmerzmitteln empfehlen die Blutglukose-Konzentration in mit Mefenaminsäure-behandelten Diabetes-Patienten zu kontrollieren. Dieser für Mefenaminsäure charakteristische Hinweis stützt indirekt die klinische Relevanz der hier erhaltenen Ergebnisse sowie eine physiologische Relevanz von TRPM3 in der Blutglukose-Homeostase. Mefenaminsäure wird klinisch in hohen Konzentration von 500 – 1000 mg angewendet und weist damit einen Durchschnittswert von ungefähr 82,9 mM im Blutserum auf (Cryer & Feldman, 1998). Mit einer Proteinbindung von ungefähr 90 % Mefenaminsäure ist die daraus resultierende freie Serumkonzentration von 8,3  $\mu$ M im Bereich der halbmaximalen Inhibition von TRPM3 ( $IC_{50}$  6,6  $\mu$ M).

#### *TRPM3-vermittelte Insulinsekretion*

Pankreatische  $\beta$ -Zellen exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle inklusive des hier nachgewiesenen TRPM3 sowie eine große Anzahl weiterer TRP-Kanalproteine.

Wir konnten zeigen, dass pankreatische  $\beta$ -Zellen und INS-1E Zellen TRPM3-Kanäle exprimieren, die die gleichen pharmakologischen Eigenschaften teilen wie rekombinantes in HEK293 Zellen heterolog exprimiertes TRPM3-Protein. Dabei zeigten die TRPM3-Proteine Ähnlichkeiten in ihrer Aktivierbarkeit und Inhibition durch die Aktivatoren Pregnenolonsulfat, Nifedipin und *D-Erythro*-Sphingosin. Die in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung von TRPM3 in Insulin-sezernierenden Zellen verwendete Applikation von

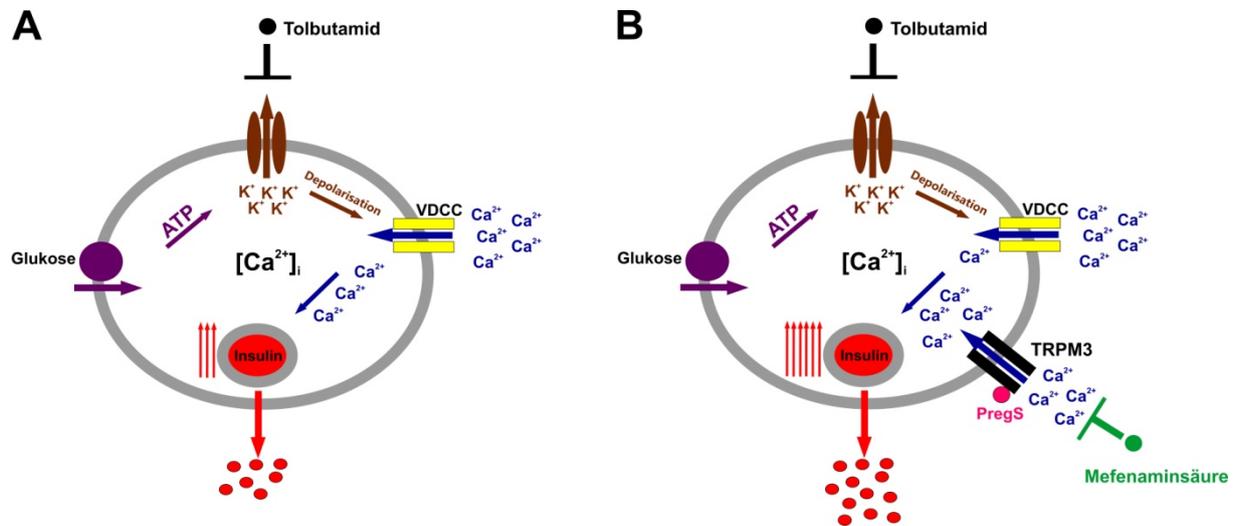
Pregnenolonsulfat als Aktivator führte zu einem raschen und direkten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in INS-1E Zellen bzw. in aus murinen Langerhans-Inseln isolierten  $\beta$ -Zellen. Die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  konnte durch den, in dieser Arbeit identifizierten, potenten und selektiven TRPM3-Inhibitor Mefenaminsäure in den untersuchten INS-1E Zellen und murinen  $\beta$ -Zellen blockiert werden. Interessanterweise inhibierte die Mefenaminsäure nicht den Tolbutamid- oder den durch Glukose-induzierten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg und zeigte, dass das TRPM3-Protein nicht an der  $K_{ATP}$ -abhängigen  $Ca^{2+}$ -Signalgebung direkt beteiligt ist. Als Funktion für das in den  $\beta$ -Zellen exprimierte TRPM3 konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Pregnenolonsulfat zur Potenzierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch einen zusätzlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration von pankreatischen  $\beta$ -Zellen führte und dieser Effekt durch sukzessive Applikation des TRPM3-selektiven Inhibitors Mefenaminsäure in der Plateauphase umkehrbar war.

Um eine gesteigerte Insulinsekretion durch Aktivierung von TRPM3 zu induzieren, wurde in dieser Arbeit mit pharmakologischen Konzentrationen von 25 - 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat gearbeitet. *In vivo* werden solch hohe Pregnenolonsulfatkonzentrationen nur während der Schwangerschaft erreicht. Da die Aktivierung von TRPM3 über Pregnenolonsulfat nicht direkt an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt ist, könnte TRPM3 eine Rolle bei der Änderung der Glukose-Homeostase in der Schwangerschaft spielen (Laatikainen & Peltonen, 1975; Kojima *et al.*, 1981; de Peretti & Mappus, 1983; Hill *et al.*, 2002; Heit *et al.*, 2006).

Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von TRPM3 und die damit einhergehende Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle in insulinoma Zellen an der Regulation der Biosynthese von Insulin beteiligt ist. Dabei induziert Pregnenolonsulfat eine Signalkaskade, die eine erhöhte Expression des Gen-regulierenden Zink-Finger Transkriptionsfaktor EGR-1 vermittelt und so zu einem Anstieg der mRNA-Konzentrationen von Insulin führt (Mayer *et al.*, 2011).

Die Abb. 5-2. zeigt zwei voneinander unabhängige Signalwege über die es zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen und zur Freisetzung des Insulins kommt. Erstrangig erfolgt die Glukose-induzierte Insulin-Sekretion über den bislang bekannten und postulierten Signalweg: die Veränderung des ADP/ATP-Verhältnisses aufgrund vermehrter Glykolyse führt zum Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Daraufhin kommt es zur Depolarisation, spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen sich und  $[Ca^{2+}]_i$  steigt. Die Insulin-haltigen Vesikel verschmelzen mit der Membran und Insulin wird sezerniert. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit deutlich, dass Pregnenolonsulfat durch Aktivierung der

Calcium-permeablen TRPM3-Kanäle in der Lage ist, die Glukose-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -abhängige Insulinfreisetzung in einem erheblichen Maße zu steigern (siehe Abb. 5-2.).



**Abb. 5-2. Mechanismus der Insulinsekretion unter Beteiligung von TRPM3.** (A) Dargestellt ist eine Insulin-sezernierende  $\beta$ -Zelle. Nach Glukose-Aufnahme wird ATP erzeugt, das ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle inhibiert und somit eine Membrandepolarisation auslöst. Dadurch aktivierte spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle vermitteln einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle und eine nachfolgende Freisetzung Insulin-gefüllter Vesikel. (B) In Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (PregS) tritt zusätzliches Calcium durch TRPM3-Kanäle in die Zelle, das zu einer vermehrten Freisetzung von Insulin führt. Mefenaminsäure blockiert diesen Effekt.

Die funktionelle Charakterisierung von TRPM3-Kanälen in weiteren TRPM3-exprimierenden Geweben mit Hilfe des selektiven Inhibitors Mefenaminsäure bildet die Basis zur zukünftigen Aufklärung der physiologischen Funktion von TRPM3-Kanälen.

## 6 Zusammenfassung

Transient Receptor Potential (TRP) -Kanäle bilden eine große Familie von Kationenkanalproteinen, die durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert und reguliert werden. Die Klassifikation der bislang identifizierten 28 humanen TRP-Proteine erfolgt in sechs TRP-Unterfamilien. Bei einigen Mitgliedern der TRPM-Kanal-Unterfamilie ist wenig über die physiologischen Rollen und zellulären Funktionen bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden eng verwandten konstitutiv aktiven,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen, nicht-selektiven Kationenkanäle TRPM1 (Melastatin) und TRPM3 funktionell charakterisiert. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass TRPM1 in murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiert wird. Eine Expression des Kanal-bildenden TRPM1-Proteins konnte zusätzlich in verschiedenen Melanin-produzierenden und Melanin-defizienten Melanozyten-Zelllinien detektiert werden. Ein diskutierter Zusammenhang zwischen der Regulation der Melaninsynthese und der Expression von TRPM1 war in dieser Arbeit nicht erkennbar. Zudem konnte die Expression des TRPM2-Proteins in Melanozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu TRPM1 scheint die Regulation von TRPM2 mit der Regulation der Melaninsynthese gekoppelt zu sein, da sich die Melaninproduktion reziprok zu der Proteinexpression von TRPM2 verhält.

Bei der Analyse der von Lexicon Pharmaceutical Incorporated generierten TRPM3-*Knockout*-Mauslinie fiel auf, dass die *Knockout*-Strategie zu der Translation eines Proteins mit einer *In-Frame*-Deletion führt. Dieses Protein war mit unserem anti-TRPM3-Antikörper in Organextrakten von TRPM3<sup>-/-</sup>-Mäusen detektierbar. Durch die funktionelle Charakterisierung der TRPM3-Deletionsmutante im heterologen Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass das verkürzte TRPM3-Protein konstitutiv nicht aktiv und nicht durch die bekannten selektiven TRPM3-Agonisten aktivierbar war. Lokalisationsstudien bestätigten eine Lokalisation der TRPM3-Deletionsmutante in den gleichen Kompartimenten wie das TRPM3-Wildtyp-Protein. Ebenso konnte eine Homomeren- sowie Heteromerenbildung zwischen dem deletierten TRPM3- und dem TRPM3-Wildtyp-Protein bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte mit Mefenaminsäure erstmals ein potenter TRPM3-selektiver Inhibitor aus der Substanzklasse der Fenamate, die als nicht-steroidale, anti-inflammatorische Wirkstoffe (NSAIDs) in der Schmerztherapie Anwendung finden, identifiziert werden. Weitere hier getestete Fenamat-Derivate konnten als Breitband-TRP-Kanalblocker klassifiziert werden. Die Substanzklasse der Fenamate bildet daher eine interessante Gruppe

von kleinen Molekülen, die als pharmakologische Werkzeuge zur Charakterisierung und Regulation von TRP-Kanälen herangezogen werden können.

Unsere Untersuchungen lieferten zudem Hinweise darauf, dass TRPM3 eine signifikante Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion spielt. Die spezifische Aktivierung von TRPM3 in Insulin-sezernierenden INS-1E Zellen und murinen pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt zum Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration und zu einer Potenzierung der Insulinsekretion, wohingegen die spezifische Inhibition von TRPM3 durch den, in dieser Arbeit identifizierten, selektiven TRPM3-Inhibitor Mefenaminsäure nahezu keinen Einfluss auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion ausübte.

## 7 Summary

Transient receptor potential (TRP) channels form a large family of cation channel proteins that are activated and regulated by different mechanisms. So far 28 human TRP proteins were identified and classified into six TRP subfamilies of which the transient receptor potential melastatin-like (TRPM) subfamily constitutes one of them. The physiological role and cellular function of some members of the TRPM channel subfamily are poorly understood. In the present work, the two closely related constitutively active,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable non-selective cation channels TRPM1 (Melastatin) and TRPM3 were functionally characterized. For the first time it was shown that TRPM1 is expressed in murine pancreatic  $\beta$ -cells. Expression of the channel forming TRPM1 protein could also be detected in various melanin-producing and melanin-deficient melanocytes. A discussed relationship between the regulation of melanin synthesis and expression of TRPM1 was not evident in this work. In addition, the expression of TRPM2 protein could be detected in melanocytes. In contrast to TRPM1, the regulation of TRPM2 appears to be coupled with the regulation of melanin synthesis as the melanin production behaves reciprocal to the protein expression of TRPM2.

The characterization of the TRPM3 knockout mouse line generated by Lexicon Pharmaceuticals Incorporated shows that the chosen inactivation strategy results in the translation of a TRPM3 protein with an in frame deletion of 89 AA. The protein was detectable with our anti-TRPM3 antibody in extracts of TRPM3 mice. Functional characterization of the TRPM3 deletion mutant in the heterologous expression system demonstrated that the channel showed neither a constitutive activity nor could be activated by the known selective agonists of TRPM3. Localization studies confirmed a localization of TRPM3-deletion mutant in the same cellular compartments as the wild-type TRPM3 protein. Also, the formation of homomers and heteromers between the truncated TRPM3 and the TRPM3 wild-type protein could be confirmed.

We identified mefenamic acid as potent selective inhibitor of TRPM3 within the class of fenamates, which are clinically used as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pain treatment. The results presented here demonstrate that mefenamic acid blocks TRPM3 from the outside and that the potency of its inhibitory effect depends on the extracellular pH. All other tested fenamat-derivatives could be classified as broad-range TRP-channel blockers. Thus, the class of fenamates represents an interesting group of small molecules that can be used as pharmacological tools for the characterization and modulation of TRP channels. Our

studies also provided evidence that TRPM3 plays a significant role in the regulation of insulin secretion. The specific activation of TRPM3 in insulin-secreting INS-1E cells and murine pancreatic  $\beta$ -cells leads to an increase of cytosolic calcium concentration and to a potentiation of insulin secretion, which could be blocked by mefenamic acid, the inhibitor characterized in this study.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ahmmed, G.U. & Malik, A.B. (2005). Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflügers Arch*, **451**, 131-142.
2. Ahn, J.H., Park, T.J., Jin, S.H. & Kang, H.Y. (2008). Human melanocytes express functional Toll-like receptor 4. *Exp Dermatol*, **17**, 412-417.
3. Alessandri-Haber, N., Yeh, J.J., Boyd, A.E., Parada, C.A., Chen, X., Reichling, D.B. & Levine, J.D. (2003). Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*, **39**, 497-511.
4. Audo, I., Kohl, S., Leroy, B.P., Munier, F.L., Guillonnet, X., Mohand-Said, S., Bujakowska, K., Nandrot, E.F., Lorenz, B., Preising, M., Kellner, U., Renner, A.B., Bernd, A., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Lancelot, M.E., Poloschek, C.M., Drumare, I., Defoort-Dhellemmes, S., Wissinger, B., Leveillard, T., Hamel, C.P., Schorderet, D.F., De, B.E., Berger, W., Jacobson, S.G., Zrenner, E., Sahel, J.A., Bhattacharya, S.S. & Zeitz, C. (2009). TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet*, **85**, 720-729.
5. Bari, M.R., Akbar, S., Eweida, M., Kuhn, F.J., Gustafsson, A.J., Luckhoff, A. & Islam, M.S. (2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the  $\beta$ -cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med*, **13**, 3260-3267.
6. Beech, D.J., Muraki, K. & Flemming, R. (2004). Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J Physiol*, **559**, 685-706.
7. Bellone, R.R., Brooks, S.A., Sandmeyer, L., Murphy, B.A., Forsyth, G., Archer, S., Bailey, E. & Grahn, B. (2008). Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics*, **179**, 1861-1870.
8. Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
9. Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
10. Blaustein, M.P. & Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, **79**, 763-854.
11. Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J. & Peppiatt, C.M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *FASEB J*, **16**, 1145-1150.

12. Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L. & Worley, P.F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, **386**, 284-288.
13. Cahalan, M.D. (2001). Cell biology. Channels as enzymes. *Nature*, **411**, 542-543.
14. Cantor, C. & Schimmel, P. (1980). Techniques for the study of biological structure and function. pp. 433-465. San Francisco: W.H. Freeman & Co.
15. Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J. & Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436-441.
16. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
17. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 411-425.
18. Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S.A., Stokes, A.J., Kinet, J.P., Fleig, A. & Penner, R. (2007). TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium*, **41**, 51-61.
19. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
20. Chubanov, V., Schnitzler, M., Waring, J., Plank, A. & Gudermann, T. (2005). Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **371**, 334-341.
21. Chubanov, V., Waldegger, S., Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M.C., Seyberth, H.W., Konrad, M. & Gudermann, T. (2004). Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2894-2899.
22. Chung, M.K., Lee, H. & Caterina, M.J. (2003). Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem*, **278**, 32037-32046.
23. Chung, M.K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M.J. (2004). TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem*, **279**, 21569-21575.
24. Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **426**, 517-524.
25. Clapham, D.E., 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.
26. Colsoul, B., Vennekens, R. & Nilius, B. (2012). Transient receptor potential cation channels in pancreatic  $\beta$  cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **161**, 87-110.

27. Craven, K.B. & Zagotta, W.N. (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*, **68**, 375-401.
28. Cryer, B. & Feldman, M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, **104**, 413-421.
29. Dadon, D. & Minke, B. (2010). Cellular functions of transient receptor potential channels. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 1430-1445.
30. Daskalakis, N. & Winn, M.P. (2006). Focal and segmental glomerulosclerosis. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2506-2511.
31. de Peretti, E. & Mappus, E. (1983). Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, **57**, 550-556.
32. Deeds, J., Cronin, F. & Duncan, L.M. (2000). Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors. *Hum Pathol*, **31**, 1346-1356.
33. den Dekker, E., Hoenderop, J.G., Nilius, B. & Bindels, R.J. (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, **33**, 497-507.
34. Devi, S., Kedlaya, R., Maddodi, N., Bhat, K.M., Weber, C.S., Valdivia, H. & Setaluri, V. (2009). Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297**, C679-C687.
35. Dhaka, A., Viswanath, V. & Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 135-161.
36. Di Virgilio, F., Steinberg, T.H. & Silverstein, S.C. (1990). Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium*, **11**, 57-62.
37. Diena, T., Melani, R., Caci, E., Pedemonte, N., Sondo, E., Zegarra-Moran, O. & Galietta, L.J. (2007). Block of CFTR-dependent chloride currents by inhibitors of multidrug resistance-associated proteins. *Eur J Pharmacol*, **560**, 127-131.
38. Drennan, D. & Ryazanov, A.G. (2004). Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, **85**, 1-32.
39. Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I. & Shyjan, A.W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, **58**, 1515-1520.
40. Dvorzhak, A.Y. (2008). Effects of fenamate on inhibitory postsynaptic currents in Purkinje's cells. *Bull Exp Biol Med*, **145**, 564-568.
41. Ebashi, S. (1972). Calcium ions and muscle contraction. *Nature*, **240**, 217-218.
42. Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Niemeyer, B.A. (2004). Ca<sup>2+</sup>-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem*, **279**, 34456-34463.

43. Fagni, L., Worley, P.F. & Ango, F. (2002). Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Sci STKE*, **2002**, re8.
44. Fang, D., Kute, T. & Setaluri, V. (2001). Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology. *Pigment Cell Res*, **14**, 132-139.
45. 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.
46. Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kelsell, R.E. & McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*, **26**, 159-178.
47. Förster, T. (1948). Intermolecular energy migration and fluorescence. pp. 55-75. *Annalen der Physik* 2.
48. Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G. & Ferrer-Montiel, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci*, **24**, 5307-5314.
49. Gaudet, R. (2008a). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst*, **4**, 372-379.
50. Gaudet, R. (2008b). TRP channels entering the structural era. *J Physiol*, **586**, 3565-3575.
51. Gaudet, R. (2009). Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol*, **133**, 231-237.
52. Gees, M., Colsoul, B. & Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a003962.
53. Goel, M., Sinkins, W.G. & Schilling, W.P. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem*, **277**, 48303-48310.
54. Gögelein, H., Dahlem, D., Englert, H.C. & Lang, H.J. (1990). Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Lett*, **268**, 79-82.
55. Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P. & Honore, E. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflügers Arch*, **455**, 1097-1103.
56. Graham, S., Ding, M., Sours-Brothers, S., Yorio, T., Ma, J.X. & Ma, R. (2007). Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for the impaired Ca<sup>2+</sup> signaling in glomerular mesangial cells in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, **293**, F1381-F1390.
57. Grimm, C. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Melastatin-verwandten TRP-Kationenkanals TRPM3. Dissertation an der Freien Universität Berlin.

58. 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.
59. Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G. & Harteneck, C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol Pharmacol*, **67**, 798-805.
60. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
61. Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H. & Ouadid-Ahidouch, H. (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297**, C493-C502.
62. Guinamard, R., Chatelier, A., Demion, M., Potreau, D., Patri, S., Rahmati, M. & Bois, P. (2004). Functional characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J Physiol*, **558**, 75-83.
63. Habjan, S. & Vandenberg, R.J. (2009). Modulation of glutamate and glycine transporters by niflumic, flufenamic and mefenamic acids. *Neurochem Res*, **34**, 1738-1747.
64. Hammock, L., Cohen, C., Carlson, G., Murray, D., Ross, J.S., Sheehan, C., Nazir, T.M. & Carlson, J.A. (2006). Chromogenic in situ hybridization analysis of melastatin mRNA expression in melanomas from American Joint Committee on Cancer stage I and II patients with recurrent melanoma. *J Cutan Pathol*, **33**, 599-607.
65. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, **9**, 163-173.
66. Harteneck, C. (2005). Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **371**, 307-314.
67. Harteneck, C., Frenzel, H. & Kraft, R. (2007). N-(p-amylocinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase  $\text{A}_2$  inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev*, **25**, 61-75.
68. Harteneck, C., Klose, C. & Krautwurst, D. (2011). Synthetic modulators of TRP channel activity. *Adv Exp Med Biol*, **704**, 87-106.
69. Harteneck, C., Plant, T.D. & Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*, **23**, 159-166.
70. Hassock, S.R., Zhu, M.X., Trost, C., Flockerzi, V. & Authi, K.S. (2002). Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood*, **100**, 2801-2811.
71. Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*, **119**, 142-147.

72. Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., Barton, A.J., Medhurst, A.D., Smith, G.D., Topp, S., Murdock, P., Sanger, G.J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C.D., Randall, A.D., Gloger, I.S. & Davis, J.B. (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, **88**, 205-215.
73. Heit, J.J., Karnik, S.K. & Kim, S.K. (2006). Intrinsic regulators of pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 311-338.
74. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci*, **118**, 917-928.
75. Hill, K., Benham, C.D., McNulty, S. & Randall, A.D. (2004). Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology*, **47**, 450-460.
76. Hill, M., Parizek, A., Klak, J., Hampl, R., Sulcova, J., Havlikova, H., Lapcik, O., Bicikova, M., Fait, T., Kancheva, R., Cibula, D., Pouzar, V., Meloun, M. & Starka, L. (2002). Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 3.3 $\beta$ -hydroxy-5-ene steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **82**, 241-250.
77. Hoenderop, J.G., Nilius, B. & Bindels, R.J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*, **85**, 373-422.
78. Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B. & Bindels, R.J. (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J*, **22**, 776-785.
79. Hoffmann, A., Grimm, C., Kraft, R., Goldbaum, O., Wrede, A., Nolte, C., Hanisch, U.K., Richter-Landsberg, C., Bruck, W., Kettenmann, H. & Harteneck, C. (2010). TRPM3 is expressed in sphingosine-responsive myelinating oligodendrocytes. *J Neurochem*, **114**, 654-665.
80. Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T. & Montell, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol*, **13**, 1153-1158.
81. Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T. & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, **397**, 259-263.
82. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. & Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7461-7466.
83. Hoogduijn, M.J., Cemeli, E., Ross, K., Anderson, D., Thody, A.J. & Wood, J.M. (2004). Melanin protects melanocytes and keratinocytes against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced DNA strand breaks through its ability to bind  $\text{Ca}^{2+}$ . *Exp Cell Res*, **294**, 60-67.
84. Hoogduijn, M.J., Smit, N.P., van der Laarse, A., van Nieuwpoort, A.F., Wood, J.M. & Thody, A.J. (2003). Melanin has a role in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in human melanocytes. *Pigment Cell Res*, **16**, 127-132.

85. Hunter, J.J., Shao, J., Smutko, J.S., Dussault, B.J., Nagle, D.L., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Moore, K.J. & Shyjan, A.W. (1998). Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics*, **54**, 116-123.
86. Hussain, A. & Inesi, G. (1999). Involvement of Sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPases in cell function and the cellular consequences of their inhibition. *J Membr Biol*, **172**, 91-99.
87. Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y. & Mori, Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ Res*, **88**, 325-332.
88. Jacobson, D.A. & Philipson, L.H. (2007). TRP channels of the pancreatic  $\beta$  cell. *Handb Exp Pharmacol*, 409-424.
89. Jordt, S.E. & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*, **108**, 421-430.
90. Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G. & Plant, T.D. (2003). Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem*, **278**, 3562-3571.
91. Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G. & Plant, T.D. (2002). TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C347-C359.
92. Kankaanranta, H. & Moilanen, E. (1995). Flufenamic and tolfenamic acids inhibit calcium influx in human polymorphonuclear leukocytes. *Mol Pharmacol*, **47**, 1006-1013.
93. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, **53**, 3976-3985.
94. Kim, D.S., Matsuda, T. & Cepko, C.L. (2008a). A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression. *J Neurosci*, **28**, 7748-7764.
95. Kim, D.S., Ross, S.E., Trimarchi, J.M., Aach, J., Greenberg, M.E. & Cepko, C.L. (2008b). Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol*, **507**, 1795-1810.
96. Kim, I.T. & Choi, J.B. (1998). Melanosomes of retinal pigment epithelium--distribution, shape, and acid phosphatase activity. *Korean J Ophthalmol*, **12**, 85-91.
97. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borrón, J.C. & Hearing, V.J. (1994). Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J*, **13**, 5818-5825.

98. Kojima, S., Yanaihara, T. & Nakayama, T. (1981). Serum steroid levels in children at birth and in early neonatal period. *Am J Obstet Gynecol*, **140**, 961-965.
99. Kraft, R., Grimm, C., Frenzel, H. & Harteneck, C. (2006). Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*, **148**, 264-273.
100. Kraft, R., Grimm, C., Grosse, K., Hoffmann, A., Sauerbruch, S., Kettenmann, H., Schultz, G. & Harteneck, C. (2004). Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C129-C137.
101. Kuhn, F.J., Heiner, I. & Luckhoff, A. (2005). TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflügers Arch*, **451**, 212-219.
102. Kuniba, H., Yoshiura, K., Kondoh, T., Ohashi, H., Kurosawa, K., Tonoki, H., Nagai, T., Okamoto, N., Kato, M., Fukushima, Y., Kaname, T., Naritomi, K., Matsumoto, T., Moriuchi, H., Kishino, T., Kinoshita, A., Miyake, N., Matsumoto, N. & Niikawa, N. (2009). Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet*, **54**, 304-309.
103. Kwan, H.Y., Huang, Y. & Yao, X. (2007). TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 907-914.
104. Laatikainen, T. & Peltonen, J. (1975). Foetal and maternal plasma levels of steroid sulphates in human pregnancy at term. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **79**, 577-588.
105. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
106. Lange, I., Yamamoto, S., Partida-Sanchez, S., Mori, Y., Fleig, A. & Penner, R. (2009). TRPM2 functions as a lysosomal Ca<sup>2+</sup>-release channel in  $\beta$  cells. *Sci Signal*, **2**, ra23.
107. Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.L., Scharenberg, A.M., Penner, R. & Kinet, J.P. (2002). TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, **109**, 397-407.
108. Le Poole, I.C., Mutis, T., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Ottenhoff, T., de Vries, R.R. & Das, P.K. (1993a). A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol*, **151**, 7284-7292.
109. Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Verkruijzen, R.P., Dutrieux, R.P., Dingemans, K.P. & Das, P.K. (1993b). Phagocytosis by normal human melanocytes in vitro. *Exp Cell Res*, **205**, 388-395.
110. Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.H., Feder, J.N., Janovitz, E.B., Levesque, P.C. & Blunar, M.A. (2003a). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem*, **278**, 20890-20897.

111. Lee, Y.M., Kim, B.J., Kim, H.J., Yang, D.K., Zhu, M.H., Lee, K.P., So, I. & Kim, K.W. (2003b). TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G604-G616.
112. LeRoith, D. (2002). B-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med*, **113 Suppl 6A**, 3S-11S.
113. Leuner, K., Kazanski, V., Müller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C. & Müller, W.E. (2007). Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J*, **21**, 4101-4111.
114. Li, M., Jiang, J. & Yue, L. (2006). Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol*, **127**, 525-537.
115. Li, Z., Sergouniotis, P.I., Michaelides, M., Mackay, D.S., Wright, G.A., Devery, S., Moore, A.T., Holder, G.E., Robson, A.G. & Webster, A.R. (2009). Recessive mutations of the gene TRPM1 abrogate ON bipolar cell function and cause complete congenital stationary night blindness in humans. *Am J Hum Genet*, **85**, 711-719.
116. Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I. & Friedman, J.M. (2003). Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 2**, 14531-14536.
117. Liman, E.R. (2010). A TRP channel contributes to insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. *Islets*, **2**, 331-333.
118. Lin, F.Y., Chen, Y.H., Lin, Y.W., Tsai, J.S., Chen, J.W., Wang, H.J., Chen, Y.L., Li, C.Y. & Lin, S.J. (2006). The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2622-2629.
119. Link, T.M., Park, U., Vonakis, B.M., Raben, D.M., Soloski, M.J. & Caterina, M.J. (2010). TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol*, **11**, 232-239.
120. Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B. & Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, **54**, 905-918.
121. Lu, Y., Zhu, W.Y., Tan, C., Yu, G.H. & Gu, J.X. (2002). Melanocytes are potential immunocompetent cells: evidence from recognition of immunological characteristics of cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res*, **15**, 454-460.
122. Mackintosh, J.A. (2001). The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J Theor Biol*, **211**, 101-113.
123. Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B. & Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*, **7**, 179-185.

124. Mayer, S.I., Müller, I., Mannebach, S., Endo, T. & Thiel, G. (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem*, **286**, 10084-10096.
125. McKemy, D.D., Neuhauser, W.M. & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-58.
126. McNulty, S. & Fonfria, E. (2005). The role of TRPM channels in cell death. *Pflügers Arch*, **451**, 235-242.
127. Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E. & Rink, T.J. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J*, **271**, 515-522.
128. Miller, A.J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C.L., Widlund, H.R. & Fisher, D.E. (2004). Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res*, **64**, 509-516.
129. Monteilh-Zoller, M.K., Hermosura, M.C., Nadler, M.J., Scharenberg, A.M., Penner, R. & Fleig, A. (2003). TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol*, **121**, 49-60.
130. Montell, C. (1989). Molecular genetics of Drosophila vision. *Bioessays*, **11**, 43-48.
131. Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, **2005**, re3.
132. Montell, C., Birnbaumer, L. & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, **108**, 595-598.
133. Montell, C. & Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, **2**, 1313-1323.
134. Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M. & Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, **307**, 1468-1472.
135. Morgans, C.W., Zhang, J., Jeffrey, B.G., Nelson, S.M., Burke, N.S., Duvoisin, R.M. & Brown, R.L. (2009). TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19174-19178.
136. 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.
137. Nakajima, Y., Moriyama, M., Hattori, M., Minato, N. & Nakanishi, S. (2009). Isolation of ON bipolar cell genes via hrGFP-coupled cell enrichment using the mGluR6 promoter. *J Biochem*, **145**, 811-818.

138. Nakamura, M., Sanuki, R., Yasuma, T.R., Onishi, A., Nishiguchi, K.M., Koike, C., Kadowaki, M., Kondo, M., Miyake, Y. & Furukawa, T. (2010). TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol Vis*, **16**, 425-437.
139. Nathan, J.D., Patel, A.A., McVey, D.C., Thomas, J.E., Prpic, V., Vigna, S.R. & Liddle, R.A. (2001). Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **281**, G1322-G1328.
140. Naylor, J., Li, J., Milligan, C.J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., Beri, D., Jiang, S., Seymour, V.A., McKeown, L., Kumar, B., Hartneck, C., O'Regan, D., Wheatcroft, S.B., Kearney, M.T., Jones, C., Porter, K.E. & Beech, D.J. (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ Res*, **106**, 1507-1515.
141. Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G., Nilius, B. & Bindels, R.J. (2003a). (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Pflügers Arch*, **446**, 401-409.
142. Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W. & Bindels, R.J. (2003b). Localization and regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 2731-2740.
143. Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 805-812.
144. Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U. & Flockerzi, V. (2003a). Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, **278**, 30813-30820.
145. Nilius, B. & Voets, T. (2004). Diversity of TRP channel activation. *Novartis Found Symp*, **258**, 140-149.
146. Nilius, B. & Voets, T. (2008). A TRP channel-steroid marriage. *Nat Cell Biol*, **10**, 1383-1384.
147. Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G. & Voets, T. (2004). TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C195-C205.
148. Nilius, B., Watanabe, H. & Vriens, J. (2003b). The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflügers Arch*, **446**, 298-303.
149. Oancea, E., Vriens, J., Brauchi, S., Jun, J., Splawski, I. & Clapham, D.E. (2009). TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci Signal*, **2**, ra21.
150. Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K.M., Flockerzi, V. & Philipp, S.E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem*, **280**, 22540-22548.
151. Oberwinkler, J. & Philipp, S.E. (2007). TRPM3. *Handb Exp Pharmacol*, 253-267.

152. Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K. & Mori, Y. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **274**, 27359-27370.
153. Orfanelli, U., Wenke, A.K., Doglioni, C., Russo, V., Bosserhoff, A.K. & Lavorgna, G. (2008). Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Res*, **18**, 1128-1140.
154. Patel, S. & Docampo, R. (2009). In with the TRP channels: intracellular functions for TRPM1 and TRPM2. *Sci Signal*, **2**, e69.
155. Pawley, J.B. (1995). Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York.
156. Pedersen, S.F., Owsianik, G. & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, **38**, 233-252.
157. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705-715.
158. Perez, C.A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J.A., Preuss, A.K., Zhang, H., Max, M. & Margolskee, R.F. (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci*, **5**, 1169-1176.
159. Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P. & Scharenberg, A.M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411**, 595-599.
160. Perraud, A.L., Schmitz, C. & Scharenberg, A.M. (2003). TRPM2 Ca<sup>2+</sup> permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*, **33**, 519-531.
161. Plant, T.D. & Schaefer, M. (2003). TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, **33**, 441-450.
162. Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M.K., 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 U S A*, **100**, 15166-15171.
163. Ramsey, I.S., Delling, M. & Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **68**, 619-647.
164. Razavi, R., Chan, Y., Afifiyan, F.N., Liu, X.J., Wan, X., Yantha, J., Tsui, H., Tang, L., Tsai, S., Santamaria, P., Driver, J.P., Serreze, D., Salter, M.W. & Dosch, H.M. (2006). TRPV1<sup>+</sup> sensory neurons control  $\beta$  cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell*, **127**, 1123-1135.
165. Reading, S.A. & Brayden, J.E. (2007). Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke*, **38**, 2322-2328.

166. Redinbaugh, M.G. & Turley, R.B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem*, **153**, 267-271.
167. Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P.L., Clapham, D.E. & Pollak, M.R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, **37**, 739-744.
168. Reiter, B., Kraft, R., Gunzel, D., Zeissig, S., Schulzke, J.D., Fromm, M. & Harteneck, C. (2006). TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J*, **20**, 1802-1812.
169. Rohacs, T. & Nilius, B. (2007). Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflügers Arch*, **455**, 157-168.
170. Runnels, L.W., Yue, L. & Clapham, D.E. (2002). The TRPM7 channel is inactivated by PIP<sub>2</sub> hydrolysis. *Nat Cell Biol*, **4**, 329-336.
171. Salinovich, O. & Montelaro, R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **156**, 341-347.
172. Sanchez, V., Lucas, M., Sanz, A. & Goberna, R. (1992). Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes. *Biosci Rep*, **12**, 199-206.
173. Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflügers Arch*, **451**, 35-42.
174. Schilling, W.P. & Goel, M. (2004). Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Novartis Found Symp*, **258**, 18-30.
175. Schlingmann, K.P. & Gudermann, T. (2005). A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *J Physiol*, **566**, 301-308.
176. Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann, N.L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W. & Konrad, M. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*, **31**, 166-170.
177. Schraermeyer, U. (1995). Transport of endocytosed material into melanin granules in cultured choroidal melanocytes of cattle - new insights into the relationship of melanosomes with lysosomes. *Pigment Cell Res*, **8**, 209-214.
178. Schraermeyer, U., Peters, S., Thumann, G., Kociok, N. & Heimann, K. (1999). Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp Eye Res*, **68**, 237-245.

179. Shen, Y., Heimel, J.A., Kamermans, M., Peachey, N.S., Gregg, R.G. & Nawy, S. (2009). A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci*, **29**, 6088-6093.
180. Siegel, R.M., Chan, F.K., Zacharias, D.A., Swofford, R., Holmes, K.L., Tsien, R.Y. & Lenardo, M.J. (2000). Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Sci STKE*, **2000**, 11.
181. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
182. Spafford, J.D. & Zamponi, G.W. (2003). Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 308-314.
183. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T.D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol*, **2**, 695-702.
184. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D.E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*, **29**, 645-655.
185. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. & Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem*, **278**, 22664-22668.
186. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, **79**, 1089-1125.
187. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 397-402.
188. Tesfai, Y., Brereton, H.M. & Barritt, G.J. (2001). A diacylglycerol-activated Ca<sup>2+</sup> channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J*, **358**, 717-726.
189. 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.
190. Tomita, S., Nicoll, R.A. & Brecht, D.S. (2001). PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol*, **153**, F19-F24.
191. Treves, S., De, M.M., Landfredi, M., Villa, A., Green, N.M., MacLennan, D.H., Meldolesi, J. & Pozzan, T. (1990). Calreticulin is a candidate for a calsequestrin-like function in Ca<sup>2+</sup>-storage compartments (calciosomes) of liver and brain. *Biochem J*, **271**, 473-480.
192. Tsatmali, M., Graham, A., Szatkowski, D., Ancans, J., Manning, P., McNeil, C.J., Graham, A.M. & Thody, A.J. (2000). alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. *J Invest Dermatol*, **114**, 520-526.

193. Tsavaler, L., Shapero, M.H., 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.
194. Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J. & Worley, P.F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP<sub>3</sub> receptors. *Neuron*, **21**, 717-726.
195. van Genderen, M.M., Bijveld, M.M., Claassen, Y.B., Florijn, R.J., Pearring, J.N., Meire, F.M., McCall, M.A., Riemsdag, F.C., Gregg, R.G., Bergen, A.A. & Kamermans, M. (2009). Mutations in TRPM1 are a common cause of complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet*, **85**, 730-736.
196. Vennekens, R. & Nilius, B. (2007). Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol*, 269-285.
197. Vennekens, R., Owsianik, G. & Nilius, B. (2008). Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des*, **14**, 18-31.
198. Vietri, M., De, S.C., Pietrabissa, A., Mosca, F. & Pacifici, G.M. (2000). Fenamates and the potent inhibition of human liver phenol sulphotransferase. *Xenobiotica*, **30**, 111-116.
199. Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. & Nilius, B. (2004a). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430**, 748-754.
200. Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Droogmans, G., Bindels, R.J. & Hoenderop, J.G. (2004b). 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.
201. Volpe, P., Alderson-Lang, B.H., Madeddu, L., Damiani, E., Collins, J.H. & Margreth, A. (1990). Calsequestrin, a component of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store of chicken cerebellum. *Neuron*, **5**, 713-721.
202. Vriens, J., Appendino, G. & Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol*, **75**, 1262-1279.
203. Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., Oberwinkler, J., Vennekens, R., Gudermann, T., Nilius, B. & Voets, T. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron*, **70**, 482-494.
204. Wagner, T.F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S.E. & Oberwinkler, J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic  $\beta$  cells. *Nat Cell Biol*, **10**, 1421-1430.
205. Watanabe, H., Davis, J.B., Smart, D., Jerman, J.C., Smith, G.D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C.D. & Nilius, B. (2002a). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, **277**, 13569-13577.

206. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, **424**, 434-438.
207. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G. & Nilius, B. (2002b). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**, 47044-47051.
208. Wedel, B.J., Vazquez, G., McKay, R.R., St, J.B. & Putney, J.W., Jr. (2003). A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP<sub>3</sub> receptor-independent process. *J Biol Chem*, **278**, 25758-25765.
209. 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 ADP-ribose. *J Biol Chem*, **277**, 23150-23156.
210. Wehrhahn, J., Kraft, R., Harteneck, C. & Hauschildt, S. (2010). Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, **184**, 2386-2393.
211. Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Schnitzler, M., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F. & Gudermann, T. (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19093-19098.
212. Wes, P.D., 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 U S A*, **92**, 9652-9656.
213. Winn, M.P., Daskalakis, N., Spurney, R.F. & Middleton, J.P. (2006). Unexpected role of TRPC6 channel in familial nephrotic syndrome: does it have clinical implications? *J Am Soc Nephrol*, **17**, 378-387.
214. Wu, L.J., Sweet, T.B. & Clapham, D.E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*, **62**, 381-404.
215. Xi, Q., Adebisi, A., Zhao, G., Chapman, K.E., Waters, C.M., Hassid, A. & Jaggar, J.H. (2008). IP<sub>3</sub> constricts cerebral arteries via IP<sub>3</sub> receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res*, **102**, 1118-1126.
216. Xu, H., Delling, M., Jun, J.C. & Clapham, D.E. (2006a). Oregon, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci*, **9**, 628-635.
217. Xu, H., Fu, Y., Tian, W. & Cohen, D.M. (2006b). Glycosylation of the osmosensitive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**, F1103-F1109.

218. Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P.S., Curtis, R. & Clapham, D.E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, **418**, 181-186.
219. Xu, S.Z., Zeng, F., Boulay, G., Grimm, C., Harteneck, C. & Beech, D.J. (2005). Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol*, **145**, 405-414.
220. Xu, X.Z., Moebius, F., Gill, D.L. & Montell, C. (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10692-10697.
221. Yildirim, E. & Birnbaumer, L. (2007). TRPC2: molecular biology and functional importance. *Handb Exp Pharmacol*, 53-75.
222. Yuan, J.P., Kiselyov, K., Shin, D.M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S.H., Dehoff, M.H., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Muallem, S. & Worley, P.F. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP<sub>3</sub> receptors. *Cell*, **114**, 777-789.
223. Zhang, W., Hirschler-Laszkiewicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Sun, S.C., Penn, L., Barber, D.L., Stahl, R., Carey, D.J., Cheung, J.Y. & Miller, B.A. (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.
224. Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. & Ryba, N.J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293-301.
225. Zhu, M.X. (2005). Multiple roles of calmodulin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflügers Arch*, **451**, 105-115.

## 9 Publikationen

### Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Klose C**, Straub I, Riehle M, Ranta F, Krautwurst D, Ullrich S, Meyerhof W, Harteneck C. (2011) Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br J Pharmacol.* **162**(8):1757-1769

Harteneck C, **Klose C**, Krautwurst D. (2011) Synthetic modulators of TRP channel activity. *Adv Exp Med Biol.* **704**:87-106

### Kongreßbeitrag:

**Klose C**, Straub I, Riehle M, Ranta F, Krautwurst D, Ullrich S, Meyerhof W, Harteneck C. (2011) Identification and characterization of selective TRP channel inhibitors. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.* **383** (Suppl.1), P273

## **10 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.